

LAURO MERA DE SOUZA

**ESTUDO DAS BIOMOLÉCULAS ENCONTRADAS NA CIFOMEDUSA  
*Phyllorhiza punctata*: ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Guilherme L. Sasaki

CURITIBA  
2005

## TERMO DE APROVAÇÃO


LAURO MERA DE SOUZA

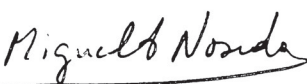
ESTUDO DAS BIOMOLÉCULAS ENCONTRADAS NA CIFOMEDUSA *Phyllorhiza punctata*: ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL

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

Orientador:

  
Prof. Dr. Guilherme Lanz Sassaki  
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, UFPR

  
Prof. Dr. Philip Albert James Gorin  
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, UFPR

  
Prof. Dr. Miguel Daniel Nosedá  
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, UFPR

  
Prof. Dr. Silvio Marques Zanata – UFPR  
Departamento de Patologia Básica, UFPR

Curitiba, 22 de fevereiro de 2005

## ORIENTAÇÃO

Orientador: Dr. Guilherme Lanzi Sasaki

Co-orientador: Dr. Marcello Iacomini

Dedico este trabalho aos profissionais que me guiaram durante esta pesquisa, Professores Guilherme L. Sasaki, Marcello Iacomini e Philip A. J. Gorin e à Dona Maria, minha mãe, à Adriane, minha irmã e ao meu sobrinho que esta por vir. Que Deus os abençoe.

“Uma coisa que aprendi nessa longa vida: toda nossa ciência, comparada com a realidade, é primitiva e infantil – ainda assim é a coisa mais preciosa que nós temos”.

Albert Einstein

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por tudo de bom que aconteceu nestes dois anos de mestrado, e por ter me dado forças para superar e aprender com as dificuldades.

À minha mãe, Maria por estar sempre presente e dando apoio, apesar de não entender nada do que eu faço e à minha irmã, Adriane por sua admiração ao meu trabalho.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Guilherme Lanzi Sasaki (Guiga), pela amizade, incentivo e por sempre estar disposto a ajudar. Agradeço pelos ensinamentos, inclusive nas conversas científicas que tivemos quando estávamos tomando cerveja ou pelos churrascos que fizemos juntos, alguns na Universidade usando tijolos pra fazer a churrasqueira e outros na churrasqueira portátil que chegou a furar o fundo. Agradeço principalmente pela sua competência em conduzir minha orientação.

Agradeço ao meu co-orientador, Prof. Dr. Marcello Iacomini, pela sua experiência, seu caráter e sua conduta científica, que apesar já estar aposentado ainda é uma pessoa muito importante no laboratório.

Ao professor Dr. Philip A. J. Gorin, que apesar de oficialmente não ser co-orientador sempre mostrou-se prestativo, com sua imensurável experiência e conhecimento que me enriqueceu muito. Agradeço pela amizade e pelas cervejas que tomamos juntos no “Bar do Padre”, no “Caldo de Piranha” ou “Seu Nilson” e também pelas cervejas e whisky no JAWS.

Aos professores do grupo de química de carboidratos, Miguel, Maria Eugênia, Fany, Carmem, Joana, Selma e aos demais professores do departamento de Bioquímica. Aos professores e amigos Leonardo e Rose Adele pelo companheirismo e pelas vezes em que almoçamos juntos, as quais sempre foram recheadas de bom humor. Ao professor Fábio Pedrosa que é um admirador de orquídeas.

Ao César, que foi meu primeiro contato na Bioquímica, pela amizade e por ter tido paciência de me ensinar o que é cromatografia e a Rosane que me indicou a Bioquímica.

Agradeço meus colegas de turma, Ana Helena, Diogo, Gerusa, Tatiane, Patrícia, Juliana, Giovana, Gustavo, Graciele e Marcelo (companheiro de cerveja), pela amizade e pelos churrascos que fizemos na casa da Giovana.

Aos amigos dos laboratórios E1, 247 e 252, Rodrigo Vassoler (um dia eu ainda vou trabalhar...), Fernanda, Caroline, Andréia, Fernanda. Ao Ricardo Wagner (sombra) e ao Thales que sempre estiveram dispostos a ajudar, continuem assim.

Ao Rodrigo Reis, pelas conversas, pelos “trabalhos” que fizemos juntos e pela amizade. Agradeço pelas imagens de microscopia das micro-algas e pelo tempero dos churrascos. Valeu!!!

À Elaine que me deu apoio num dos momentos mais difíceis, por ter aberto as portas de seu apartamento pra mim, sem restrições. Eu não me esqueci disso.

Aos alunos de iniciação científica Roger e Marcel que estiveram me ajudando em parte deste trabalho.

Aos amigos dos outros laboratórios, Paula, Sérgio, Alan, Marco, Adriano, Rosiane, Andréia (GLC) e Rodrigo Faria pela amizade. À Ana Paula pela ajuda no espectrofotômetro.

Ao Phelipe (garoto insolente) que antes do Aikido fazia parte da turma da cerveja, mas agora é da geração saúde.

Aos amigos ausentes que fizeram parte de minha história na Bioquímica, Renato, Rafaela (Rafinha) e Fábio Rosado.

À Coordenação do Curso de Pós Graduação em Bioquímica.

Ao professor Ney P. M. Filho e toda a equipe do Centro de Microscopia Eletrônica pelas análises de EDS.

À professora Maria Angélica Haddad e ao Miodeli, pela coleta e identificação das águas-vivas, pelas conversas e livros emprestados.

Ao CNPq, FINEP, PRONEX-Carboidratos, PADCT e Fundação Araucária, pelo suporte financeiro.

Um agradecimento especial para Luis (Luisera), Leverci (Levera), Juliano (Presuntinho), Elielson (Robocop), Rosalino e Ricardo (ET e Rodolfo), Catia Zela Sá (Catiassá), Maisa, Paola, Vanessa (Nessinha), Fábio (Biofa, a tartaruga do TAMAR), Sandro (Carioca), Oscar, Alexandre (Pikachu) Alci Junior, Anderson (Antracks) e Erlon meus grandes amigos de graduação.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABELAS	xi
LISTA DE ABREVEATURAS, SIGLAS E SIMBOLOS	xii
RESUMO	xiv
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	01
1.1 CNIDÁRIOS.....	02
1.1.1 Estrutura corpórea dos cnidários.....	03
1.1.2 Alimentação, nutrição e defesa.....	05
1.1.2.1 Simbiose e trocas metabólicas .....	05
1.2 CLASSE SCYPHOZOA.....	07
1.2.1 <i>Phyllorhiza punctata</i> .....	07
1.3 OS LIPÍDEOS E A SIMBIOSE.....	10
1.3.1 Aplicações quimiotaxonômicas dos ácidos graxos.....	10
1.3.2 Os ácidos graxos e as trocas metabólicas.....	11
1.3.3 Lipídeos encontrados em medusas.....	12
1.2.3.1 Lipídeos contendo ácidos graxos halogenados.....	13
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	15
2.1 OBJETIVO GERAL.....	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	17
3.1. OBTENÇÃO DO MATERIAL BIOLÓGICO.....	18
3.2. MATERIAIS, EQUIPAMENTOS E UTILIZAÇÃO GERAL.....	18
3.3. MÉTODOS ANALÍTICOS GERAIS.....	19
3.3.1 Métodos cromatográficos.....	19
3.3.1.1 Cromatografia em camada delgada (CCD).....	19
3.3.1.2 Cromatografia em coluna.....	19
3.3.1.3 Cromatografia gasosa e espectrometria de massa (CG-EM).....	20
3.3.1.4 Cromatografia de gel permeação (GPC).....	21
3.3.2 Métodos espectrofotométricos.....	21

3.3.3 Espectrometria de Massa.....	22
3.3.3.1 ESI-MS ( <i>electrospray ionisation mass spectrometry</i> ).....	22
3.3.4 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	22
3.3.4.1 Preparo das amostras.....	22
3.3.4.2 Experimentos de RMN unidimensionais (1D) e bidimensionais (2D).....	23
3.3.5 Determinação dos elementos químicos.....	23
3.3.6 Determinação da composição monossacarídica .....	24
3.3.7 Composição de ácidos graxos totais.....	25
3.4 ANÁLISE DO MATERIAL BIOLÓGICO.....	25
3.4.1 Análise lipídica.....	25
3.4.1.1 Extração.....	25
3.4.1.2 Fracionamento e Isolamento.....	26
3.4.1.3 Análise dos ácidos graxos e carboidratos dos glicolipídeos.....	27
3.4.2 Análise dos carboidratos.....	29
3.4.2.1 Extrações.....	29
3.4.2.2 Precipitação com etanol.....	29
3.4.2.3 Tratamento com dimetilsulfóxido (Me <sub>2</sub> SO).....	30
3.4.2.4 Análise de metilação do polissacarídeo.....	30
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>32</b>
4.1 COLETA E IDENTIFICAÇÃO DAS MEDUSAS.....	33
4.2 EXTRAÇÕES E RENDIMENTOS.....	33
4.3 ANÁLISE QUÍMICA ELEMENTAR.....	36
4.4 ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA TOTAL.....	38
4.5 ANÁLISE DO MUCO.....	40
4.6 ANÁLISE DE ÁCIDOS GRAXOS TOTAIS.....	45
4.7 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS GLICOLIPÍDEOS.....	49
4.7.1 Extração e particionamento.....	49
4.7.2 Isolamento e purificação dos glicolipídeos.....	49
4.7.3 Composição de ácidos graxos de EL1AF8 e EL1OF5.....	50
4.7.4 Determinação da estrutura do SQDG.....	54
4.7.5 Determinação da estrutura do MGD.....	58

4.8 ANÁLISE DO POLISSACARÍDEO.....	63
<b>5. CONCLUSÕES.....</b>	<b>67</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>69</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 01</b> – FORMAS COPÓREAS DOS CNIDÁRIOS E ALTERNÂNCIA DE GERAÇÕES.....	04
<b>FIGURA 02</b> – <i>Phyllorhiza punctata</i> von Lendenfeld, 1884 E SUA MICRO-ALGA SIMBIÓTICA.....	09
<b>FIGURA 03</b> –EXEMPLOS DE LIPÍDEOS ENCONTRADOS EM MEDUSAS.....	14
<b>FIGURA 04</b> – CCD DAS FRAÇÕES ELUÍDAS EM COLUNA DE TROCA IÔNICA ANTES DA HIDRÓLISE	42
<b>FIGURA 05</b> – CCD DAS FRAÇÕES ELUÍDAS EM COLUNA DE TROCA IÔNICA APÓS A HIDRÓLISE....	43
<b>FIGURA 06</b> – MOSTRANDO A PRESEÇA DE MICROALGAS EM <i>P. punctata</i> .....	47
<b>FIGURA 07</b> – CCD DA FASE EL1AF8 APÓS FRACIONAMENTO EM COLUNA DE SÍLICA GEL.....	51
<b>FIGURA 08</b> – CCD DA FASE EL1OF5 APÓS FRACIONAMENTO EM COLUNA DE SÍLICA GEL .....	52
<b>FIGURA 09</b> – ESPECTRO DE ESI-MS DA FRAÇÃO EL1AF8 (SQDG).....	55
<b>FIGURA 10</b> – ESPECTRO PARCIAL DE RMN 2D (TOCSY) DO SQDG.....	56
<b>FIGURA 11</b> – ESPECTROS PARCIAIS DE 2D RMN (HMQC E TOCSY) DO SQDG.....	57
<b>FIGURA 12</b> – ANÁLISE POR CCD E CG-EM APÓS HIDRÓLISE DO MGD.....	59
<b>FIGURA 13</b> – ESPECTRO PARCIAL DE RMN 2D (TOCSY) DO MGD.....	60
<b>FIGURA 14</b> – ESPECTROS PARCIAIS DE 2D RMN (HMQC E TOCSY) DO MGD.....	61
<b>FIGURA 15</b> – ANÁLISE DE GPC DA FRAÇÃO ALPESD.....	64
<b>FIGURA 16</b> – CURVA DE ABSORBÂNCIA DA FRAÇÃO ALPESD.....	65
<b>FIGURA 17</b> – ESPECTRO DE RMN DE <sup>13</sup> C DA FRAÇÃO ALPESD.....	66
<b>FLUXOGRAMA 01</b> – EXTRAÇÃO, ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DOS GLICOLIPÍDEOS.....	28
<b>FLUXOGRAMA 02</b> – EXTRAÇÃO, ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DOS CARBOIDRATOS.....	31

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 01</b> – RENDIMENTOS DOS EXTRATOS E DE SEU FRACIONAMENTO.....	35
<b>TABELA 02</b> – MICROANÁLISE DE RAIOS-X, MOSTRANDO OS DIFERENTES ELEMENTOS QUÍMICOS PRESENTES NAS DIFERENTES PARTES DE <i>P. punctata</i> .....	37
<b>TABELA 03</b> – COMPOSIÇÃO DE MONOSSACARÍDEOS PRESENTES NA MEDUSA INTACTA E EM PARTES SEPARADAS DE SEU CORPO.....	39
<b>TABELA 04</b> – COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES OBTIDAS PELA DEGRADAÇÃO DO MATERIAL CONTIDO NO PRECIPITADO DO MUCO.....	44
<b>TABELA 05</b> – COMPOSIÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS PRESENTES NA MEDUSA INTACTA E EM PARTES SEPARADAS DE SEU CORPO.....	48
<b>TABELA 06</b> – COMPOSIÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS OBTIDOS DOS GLICOLÍPÍDEOS ISOLADOS.....	53
<b>TABELA 07</b> – DADOS ESPECTROSCÓPICOS DE RMN DE $^1\text{H}$ E $^{13}\text{C}$ DOS GLICOLÍPÍDEOS.....	62

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

$\alpha$	- configuração anomérica da ligação glicosídica $\alpha$
$\beta$	- configuração anomérica da ligação glicosídica $\beta$
$\delta$	- deslocamento químico
%	- porcentagem
1 D	- monodimensional
$^{13}\text{C}$	- carbono 13
$^1\text{H}$	- próton
2 D	- bidimensional
Abs	- absorvância
$\text{Ac}_2\text{O}$	- anidrido acético
$\text{AgCO}_3$	- carbonato de prata
AGME	- ácido graxo metil éster
AGMI	- ácido graxo monoinsaturado
AGPI	- ácido graxo poliinsaturado
AGS	- ácido graxo de cadeia saturada
ALPE	- extrato alcalino – precipitado em etanol
ALPEPD	- extrato alcalino – solúvel em etanol e precipitado em dimetil-sulfóxido
ALPESD	- extrato alcalino – solúvel em etanol e dimetil-sulfóxido
ALSE	- extrato alcalino – solúvel em etanol
AQPE	- extrato aquoso – precipitado em etanol
AQSE	- extrato aquoso – solúvel em etanol
Ara	- arabinose
CCD	- cromatografia em camada delgada
CG-EM	- cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massa
$\text{CH}_3\text{I}$	- iodeto de metila
$\text{Cl}^-$	- íon cloreto
COSY	- <i>Correlation Spectroscopy</i>
$\text{D}_2\text{O}$	- água deutarada
d.i.	- diâmetro interno
EL1	- extrato lipídico 1
EL1A	- extrato lipídico – fase aquosa
EL1O	- extrato lipídico – fase orgânica
EL2	- extrato lipídico 2
ESI-MS	- <i>Electrospray Ionization Mass Spectrometry</i>
$\text{Et}_2\text{O}$	- éter etílico
EtOH	- etanol
Gal	- galactose
Galp	- galactopirranose
Glc	- glucose
Gli	- glicerol
GPC	- cromatografia de gel permeação
$\text{H}_2\text{O}$	- água
$\text{H}_2\text{SO}_4$	- ácido sulfúrico

He	- hélio
HMQC	- <i>Heteronuclear Multiple Quantum Correlation Spectroscopy</i>
HOAc	- ácido acético
HPSEC	- cromatografia de exclusão estérica
Hz	- hertz
IE-EM	- impacto de elétrons-espectrometria de massa
IM	- íon molecular
<i>J</i>	- constante de acoplamento
MALLS	- detector de espalhamento de luz a laser com multiângulos
Me	- metil
Me <sub>2</sub> -SO	- dimetil-sulfóxido
Me <sub>2</sub> -SO- <i>d</i> 6	- dimetil-sulfóxido deuterado
MeOD	- metanol deuterado
MeOH	- metanol
MGD	- monogalactosildiacilglicerol
MHz	- megahertz
min	- minutos
Na <sup>+</sup>	- íon sódio
NaB <sup>2</sup> H <sub>4</sub>	- boroidreto de sódio deuterado
NaBH <sub>4</sub>	- boroidreto de sódio
NaCl	- cloreto do sódio
NH <sub>2</sub>	- grupo amina
nm	- nanômetros
pg	- página
ppm	- parte por milhão
PrOH	- propanol
Rib	- ribose
RMN	- Ressonância Magnética Nuclear
ROESY	- <i>Rotating-Frame Overhauser Effect Spectroscopy</i>
rpm	- rotação por minuto
R <sub>t</sub>	- tempo de retenção
SQDG	- sulfoquinovosildiacilglicerol
TFA	- ácido trifluoracético
TOCSY	- <i>Total Correlation Spectroscopy</i>
v/v	- volume por volume

## RESUMO

A cifomedusa *Phyllorhiza punctata* é nativa da fauna marinha australiana, no litoral paranaense foram coletados exemplares os quais foram submetidos a análises para determinação de seus compostos, como lipídeos e carboidratos. Uma grande diversidade de ácidos graxos foi encontrada, constituindo-se de ácidos graxos saturados, monoinsaturados e poliinsaturados. O ácido graxo C<sub>22:6ω3</sub> considerado como biomarcador de micro-algas da divisão Dinophyta foi encontrado e atribuído à simbiose existente entre *P. punctata* e micro-algas desta divisão. Ácidos graxos poliinsaturados totalizaram 31,1% na medusa intacta, porém estavam ausentes nos braços orais e na umbrela estes ácidos graxos somaram 26,8%, considerando que as microalgas foram observadas na umbrela, elas poderiam ser as responsáveis pela síntese destes ácidos graxos. A composição de ácidos graxos e monossacarídeos apresentou diferenças em diferentes partes do corpo da medusa. Os ácidos graxos mais abundantes foram o ácido palmítico e o ácido esteárico e os monossacarídeos foram arabinose e glucose encontrados em todas as partes do corpo em concentrações diferentes. Extrações lipídicas foram realizadas utilizando misturas de solventes orgânicos e dois glicolipídeos foram encontrados, purificados por cromatografia em coluna e em camada delgada de sílica gel. Os glicolipídeos foram caracterizados estruturalmente por análises de cromatografia gasosa e espectrometria de massa (CG-EM e ESI-MS) e espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN). Os experimentos RMN bidimensional (COSY, TOCSY e HMQC) forneceram importantes informações sobre a estrutura dos glicolipídeos que foram identificados como monogalactosildiacilglicerídeo (MGD) e sulfoquinovosildiacilglicerídeo (SQDG). Extrações, aquosa e alcalina, forneceram frações contendo carboidratos e proteínas. No extrato alcalino foi encontrado um polissacarídeo, purificado e, então caracterizado por RMN de <sup>13</sup>C e análise de seus derivados metilados por CG-EM. O polissacarídeo consistia de uma α-glucana ramificada, que foi identificada como glicogênio de acordo com o número e a posição das ramificações, no entanto como amido pela coloração e perfil de absorbância quando complexado com lugol.

## 1. INTRODUÇÃO

---

## 1.1 CNIDÁRIOS

O filo Cnidaria abrange uma grande variedade de animais estritamente aquáticos sendo subdividido em quatro classes: Anthozoa, Hydrozoa, Cubozoa e Scyphozoa. Os representantes mais conhecidos deste filo são as hidras, um dos poucos cnidários de água doce, as medusas (ou águas-vivas), as anêmonas-do-mar e os corais (BARNES, 1990).

Em relação à forma do corpo (Figura 01 A e B, pg 4) os cnidários podem ser divididos em: forma medusóide, geralmente de vida livre e natante, como as águas-vivas, e forma polipóide ou pólipos, geralmente menores e fixos ao substrato onde se encontram os corais como os representantes mais conhecidos. Embora individualmente menores que as medusas, os corais podem formar gigantescas colônias conhecidas como recifes de corais, como a Grande Barreira de Corais na Austrália. Os recifes abrigam uma inúmera variedade de animais constituindo um dos ecossistemas mais ricos, frágeis e de maior biodiversidade do planeta.

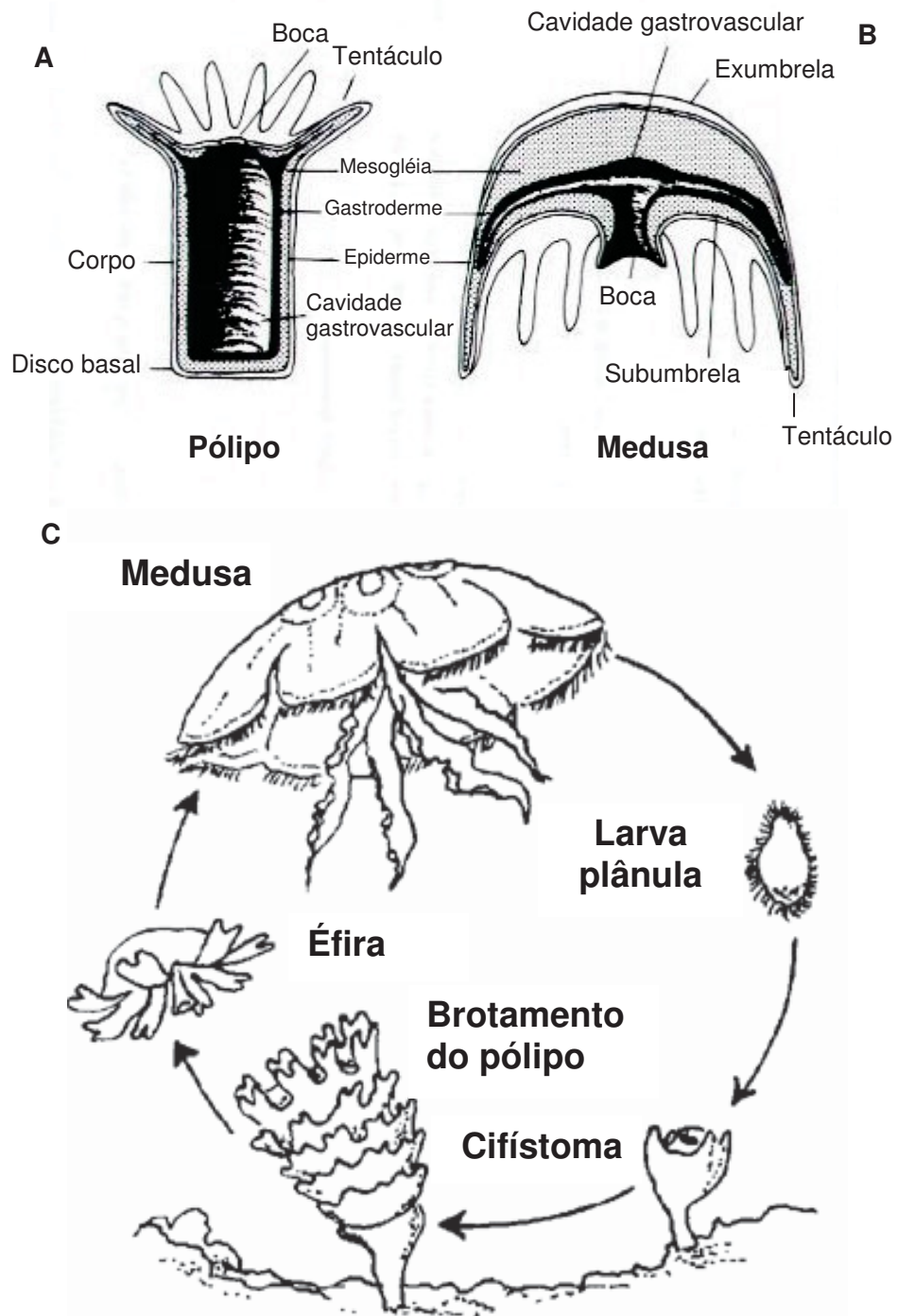
Os pólipos e as medusas podem fazer parte do ciclo de vida de um mesmo cnidário, num processo chamado de alternância de gerações (Figura 01C, pg 4) onde o pólipo por reprodução assexuada dá origem a uma forma jovem livre chamada de éfira, a qual se desenvolve para forma adulta (medusa) que pode se reproduzir de forma sexuada. O óvulo fecundado dá origem a uma larva chamada plânula a qual, então, se desenvolve para a forma polipóide (chamada cifístoma) fechando um ciclo e iniciando outro. A alternância de gerações ou metagênese, porém, não ocorre em todos os cnidários. Na classe Anthozoa na qual são agrupados os corais e anêmonas-do-mar não ocorre este tipo de ciclo sendo que os pólipos são predominantes (BARNES, 1990).

### 1.1.1 Estrutura corpórea dos cnidários

A parede corpórea dos cnidários consiste de uma epiderme externa, uma gastroderme interna separada por um tecido conectivo gelatinoso, chamado mesogléia. Os tentáculos aparecem como projeções das margens do corpo e a boca geralmente central, voltada para cima nas formas polipóides e para baixo nas formas medusóides, podendo ser circundada por estruturas chamadas de braços orais. Embora estas características sejam típicas dos cnidários, os membros da ordem Rhizostomeae são desprovidos de tentáculos e não apresentam boca central, mas sim várias pequenas bocas secundárias na área dos braços orais (BARNES, 1990).

A mesogléia consiste de fibras embebidas em uma matriz hidratada, podendo ou não conter células. As fibras que compõem a mesogléia podem ser dissolvidas pela enzima collagenase (CHAPMAN, 1970) e sua composição de aminoácidos é similar a do colágeno (RIGBY e HAFEY, 1972). Em algumas espécies foi observado que o colágeno perfazia mais de 60% da constituição da mesogléia, rico em resíduos de hidroxilisina ligadas a carboidratos (KIMURA, MIURA e PARK, 1983). Miura e Kimura (1985), analisando as estruturas das proteínas da mesogléia de *Stomolophus nomurai* descobriram se tratar de um heterotrímico similar ao colágeno do tipo V de vertebrados. A composição da mesogléia pode variar de acordo com as espécies ou ainda na mesma espécie encontrada em diferentes localizações (ARAI, 1997).

**FIGURA 01** – FORMAS COPÓREAS DOS CNIDÁRIOS E ALTERNÂNCIA DE GERAÇÕES



As imagens (A e B) representam as duas formas básicas nas quais os cnidários podem ser encontrados, Pólipio e Medusa respectivamente, imagens retiradas do *site* <http://www.afcd.gov.hk/conservation/Images/polyp.jpg>. A imagem (C) representa o típico ciclo reprodutivo dos cnidários que apresentam alternância de gerações, imagem retirada do site: <http://water.dnr.state.sc.us/marine/pub/seascience/jellyfi.html>.

### 1.1.2 Alimentação, nutrição e defesa

Os cnidários utilizam uma grande variedade de fontes nutricionais incluindo presas animais, matéria orgânica dissolvida e substâncias derivadas da simbiose com micro-algas (SEBENS, 1987).

A maioria dos cnidários alimenta-se de zooplâncton embora alguns utilizem animais maiores, a presa sendo capturada pelos tentáculos e imobilizada por células urticantes chamadas cnidócitos, as quais contém o nematocisto e uma cápsula portadora de um líquido tóxico, que é disparado quando recebe um estímulo injetando o veneno na vítima. Estas células servem tanto para defesa do animal quanto para captura de alimentos e são peculiares a este filo (BARNES, 1990).

#### 1.1.2.1 Simbiose e trocas metabólicas

Alguns cnidários apresentam uma relação endosimbiótica com algas unicelulares, as quais podem aparecer tanto nos pólipos quanto nas medusas. Muitos corais apresentam este tipo de relação e são beneficiados pelos produtos da fotossíntese da alga, ocorrendo da mesma forma em algumas medusas. Estas algas são chamadas de zooxantelas.

Zooxantelas são dinoflagelados que dentro do hospedeiro apresentam uma forma cocóide, sem flagelos e com ranhuras na superfície, quando cultivados podem recuperar os flagelos (ARAI, 1997). Ranhuras e mobilidade são característicos de dinoflagelados (FREUDENTHAL, 1962; LOEBLICH e SHERLEY, 1979).

A sistemática das zooxantelas presentes em Scyphozoa não é clara, entretanto o dinoflagelado *Symbiodinium microadriaticum* foi primeiro descrito como

uma nova espécie usando culturas de zooxantelas derivadas de *Cassiopea* sp. (FREUDENTHAL, 1962).

A localização das algas pode variar de acordo com a espécie hospedeira. Em medusas dos gêneros *Cassiopea* e *Mastigias* a maioria é encontrada em células na mesogléia, em *Cassiopea xamachana* elas estão presentes em bandas estreitas abaixo epitélio exumbrelar e subumbrelar, especialmente próximas de músculos. (BLANQUET e RIORDAN, 1981).

O dióxido de carbono é o primeiro substrato para fixação de carbono pela fotossíntese de zooxantela, a qual pode fixar CO<sub>2</sub> proveniente do metabolismo do hospedeiro, esse processo pode ser facilitado pela sua localização, geralmente próxima a tecidos com alta taxa de metabolismo, como músculos. O CO<sub>2</sub> metabólico pode ser insuficiente para manter as taxas de fotossíntese necessárias para a alga, deste modo faz necessário que esta utilize fontes de carbono direto da água do mar. A presença da enzima anidrase carbônica permite a utilização de carbonato como fonte de carbono inorgânico (ARAI, 1997).

Nutrientes como nitrogênio e fósforo e outros elementos são necessários para sobrevivência da zooxantela, uma fonte de nitrogênio é o amônio produzido pelo metabolismo do hospedeiro. A medusa *Linuche unguiculata* pode absorver e metabolizar fosfato, amônio, nitrato e até mesmo aminoácidos da água do mar (WILKERSON e KREMER, 1992). Entretanto parece que a principal fonte de nitrogênio da alga neste sistema é também o amônio (ARAI, 1997).

Uma porção dos produtos da fotossíntese é transferida para o hospedeiro. As zooxantelas isoladas de *C. frondosa* e *Rhizostoma* sp., quando incubadas em uma solução contendo NaH<sup>14</sup>CO<sub>3</sub>, na presença de luz e do tecido do hospedeiro homogeneizado, liberam 20-23% dos produtos da fotossíntese no meio como

compostos orgânicos solúveis em água (TRENCH, 1971). Muscatine (1967) mostrou que o principal exudato de zooxantelas, simbiontes de corais, era o glicerol.

## 1.2 CLASSE SCYPHOZOA

Os membros da classe Scyphozoa são cnidários pelágicos onde a forma de medusa é dominante. As cifomedusas apresentam algumas características que as diferenciam de outras classes, como pode ser visto pelo seu tamanho, maior que o das hidromedusas e sua mesogléia que apresenta células amebóides (BARNES, 1990).

A classe Scyphozoa é dividida em quatro ordens: Stauromedusae, Coronatae, Semaestomeae e Rhizostomeae, sendo a última representada pelos animais em estudo neste trabalho, *Phyllorhiza punctata*.

### 1.2.1 *Phyllorhiza punctata*

*Phyllorhiza punctata* (von Lendenfeld, 1884) (Figura 02, pg 9), também conhecida como água-viva pintada, pertencente à ordem Rhizostomeae e à família Magistiidae, é uma espécie proveniente da fauna marinha australiana, originalmente descrita na região do Oceano Indo-Pacífico, tem aparecido próxima de portos de navios transoceânicos, como na Baía de San Diego, Califórnia (GALIL, SPANIER e FERGUSON, 1990; LARSON e ARNESON, 1990). *P. punctata* tem sido regularmente observada na costa brasileira. Sua chegada no Brasil, assim como em outros lugares como Havaí, Caribe e Golfo do México, provavelmente ocorreu com a chegada de navios das regiões onde ela é nativa, podendo ter chegado nestes

lugares aderida ao corpo de navios ou na água de lastro enquanto ainda em forma de pólipos ou mesmo larva.

Como outros representantes da ordem Rhizostomeae, *P. punctata* é desprovida de tentáculos e não apresenta uma boca central, e sim várias pequenas bocas. Outra característica de *P. punctata* é apresentar uma relação simbiótica com micro-algas (Figura 06, pg 47), entretanto diferenças têm sido observadas entre exemplares de *P. punctata* que ocorrem no Golfo do México e exemplares de outras populações, como as que ocorrem no Brasil. Segundo Graham et al.,(2001) a população de *P. punctata* que ocorre no Golfo do México apresenta diferenças na pigmentação e no tamanho. Exemplares de outras populações de *P. punctata* apresentam uma coloração marrom, proveniente da colonização pelas micro-algas, enquanto as que ocorrem no Golfo do México não apresentam simbiose e sua coloração é mais clara. O seu tamanho pode variar de 35 cm a 65 cm de diâmetro, enquanto nas outras regiões não passa de 40 cm.

Grande parte das necessidades energéticas de *P. punctata* pode ser suprida pelos produtos da fotossíntese das micro-algas, entretanto a população do Golfo do México que não apresenta tal simbiose e como forma de compensação energética apresenta hábitos predatórios contra ovos e larvas de peixes e de camarões, podendo gerar um risco ambiental e econômico (GRAHAM et al., 2001).

**FIGURA 02** – *Phyllorhiza punctata* von Lendenfeld, 1884



Imagem da cifomedusa *Phyllorhiza punctata*, retirada do site [www2.bishopmuseum.org/HBS/invertguide/species\\_pdf/phyllorhizapunctata.pdf](http://www2.bishopmuseum.org/HBS/invertguide/species_pdf/phyllorhizapunctata.pdf); foto: J. Grovhoug.

### 1.3 OS LIPÍDEOS E A SIMBIOSE

O estudo dos lipídeos de seus componentes, os ácidos graxos, tem fornecido importantes informações no que diz respeito ao estudo dos cnidários e também das suas relações simbióticas com micro-algas.

Muitas classes de lipídeos são encontradas nos cnidários, e para alguns lipídeos como os fosfolipídeos, tem sido atribuído, um papel na estabilização da estocagem de toxinas nos nematocistos, isto depende tanto da estabilidade química destes lipídeos como de sua conformação e estrutura molecular (NAKHEL et al., 1988).

#### 1.3.1 Aplicações quimiotaxonômicas dos ácidos graxos

A determinação estrutural de lipídeos presentes nos mais diferentes organismos, além de fornecer dados sobre seus possíveis papéis nos organismos, pode ser utilizada como uma importante ferramenta quimiotaxonômica. Ácidos graxos de fungos podem ser utilizados como auxiliares taxonômicos, ajudando na diferenciação de estirpes do mesmo gênero (GRAHAM et al., 1995; STAHL e KLUG, 1996; SILVA et al., 1998). Ácidos graxos de fungos liquenizados também têm sido utilizados como ferramentas de auxílio à taxonomia (SASSAKI, 2001a; SASSAKI et al., 2001b).

Aplicação quimiotaxonômica também tem sido utilizada no estudo de micro-algas. Zhukova e Aizdaicher (1995) determinaram a composição de ácidos graxos de 15 espécies de micro-algas marinhas e apontaram para alguns desses ácidos graxos que podem ser utilizados como importantes marcadores quimiotaxonômicos.

A importância desse estudo, no entanto, vai além de sua aplicação como ferramenta quimiotaxonômica, uma vez que dinoflagelados estudados neste trabalho são amplamente encontrados em simbiose com cnidários. Sendo assim, a determinação de lipídeos e ácidos graxos em alguns cnidários simbióticos pode fornecer importantes informações não só sobre o próprio cnidário, mas também sobre seus fotobiontes, ou ainda auxiliar na compreensão dos hábitos alimentares de cnidários simbióticos ou não.

A determinação da composição de ácidos graxos de grupos específicos de lipídeos como os lipídeos polares também fornecem importantes informações taxonômicas sobre micro-algas simbiontes. Em 2003, Zhukova e Titlyanov, isolaram 3 tipos morfofisiológicos diferentes de dinoflagelados, simbiontes de corais (*Millepora intricata*, *Pocillopora damicornis*, *Seriatopora caliendrum*, *Seriatopora hystrix* e *Stylophora pistillata*, coletados no litoral de Okinawa) que haviam sido mantidos em condições ambientais idênticas, e encontram significativas diferenças na composição de ácidos graxos de lipídeos polares e triacilgliceróis entre as microalgas. Estas diferenças foram atribuídas à diversidade genética apresentada pelos dinoflagelados que podem estar associados com as diversas espécies de corais daquela região.

### 1.3.2 Os ácidos graxos e as trocas metabólicas

A capacidade de translocação de nutrientes entre organismos simbiontes há muito tempo tem sido estudada. Muscatine (1967), um dos pioneiros neste tipo de pesquisa, mostrou que o glicerol é um dos principais compostos liberados por microalgas isoladas de corais e moluscos (*Pocillopora damicornis* e *Tridacna crocea* respectivamente). Segundo o referido autor, a liberação de glicerol ocorre em

quantidades significantes somente na presença de algum componente presente no tecido hospedeiro, e que micro-algas isoladas da *Tridacna* respondem ao tratamento com tecido homogeneizado de *Pocillopora* e vice-versa.

Tem sido demonstrado que os ácidos graxos também se apresentam como produtos de translocação entre organismos simbiotes, Papina et al., (2003) determinaram a composição de ácidos graxos do coral hospedeiro *Montipora digitata* e de sua micro-alga simbiótica separadamente, e observaram que significantes quantidades de ácidos graxos poliinsaturados estavam presentes tanto no coral hospedeiro quanto na zooxantela e atribuíram isso ao fato de que a micro-alga estaria suprindo o coral com tais ácidos graxos. A presença no tecido hospedeiro de alguns ácidos graxos como C<sub>18:4ω3</sub>, C<sub>22:5ω3</sub> e C<sub>22:6ω3</sub> (ácidos 6, 9, 12, 15 octadecatetraenóico, 7, 10, 13, 16, 19 docosapentaenóico e 4, 7, 10, 13, 16, 19 docosahexaenóico, respectivamente), considerados marcadores específicos para dinoflagelados (ZHUKOVA e AIZDAICHER, 1995), confirmam a suspeita de que não apenas ácidos graxos saturados estariam sendo fornecidos pelos fotobiontes aos seus hospedeiros, mas também diversos ácidos graxos poliinsaturados.

### 1.3.3 Lipídeos encontrados em medusas

Diversas classes de lipídeos (Figura 03) têm sido, ao longo do tempo, encontradas em medusas, incluindo fosfolipídeos, fosfonolipídeos, gliceril-éteres, triacilgliceróis, lipídeos halogenados, colesterol, etc (STILLWAY, 1974; WHITE e HAGER, 1977; NAKHEL, MASTRONICOLIS e MEIMAROGLOU, 1988; MU, WESÉN e SUNDIN, 1997; KARIOTOGLOU e MASTRONICOLIS, 2001 e 2003).

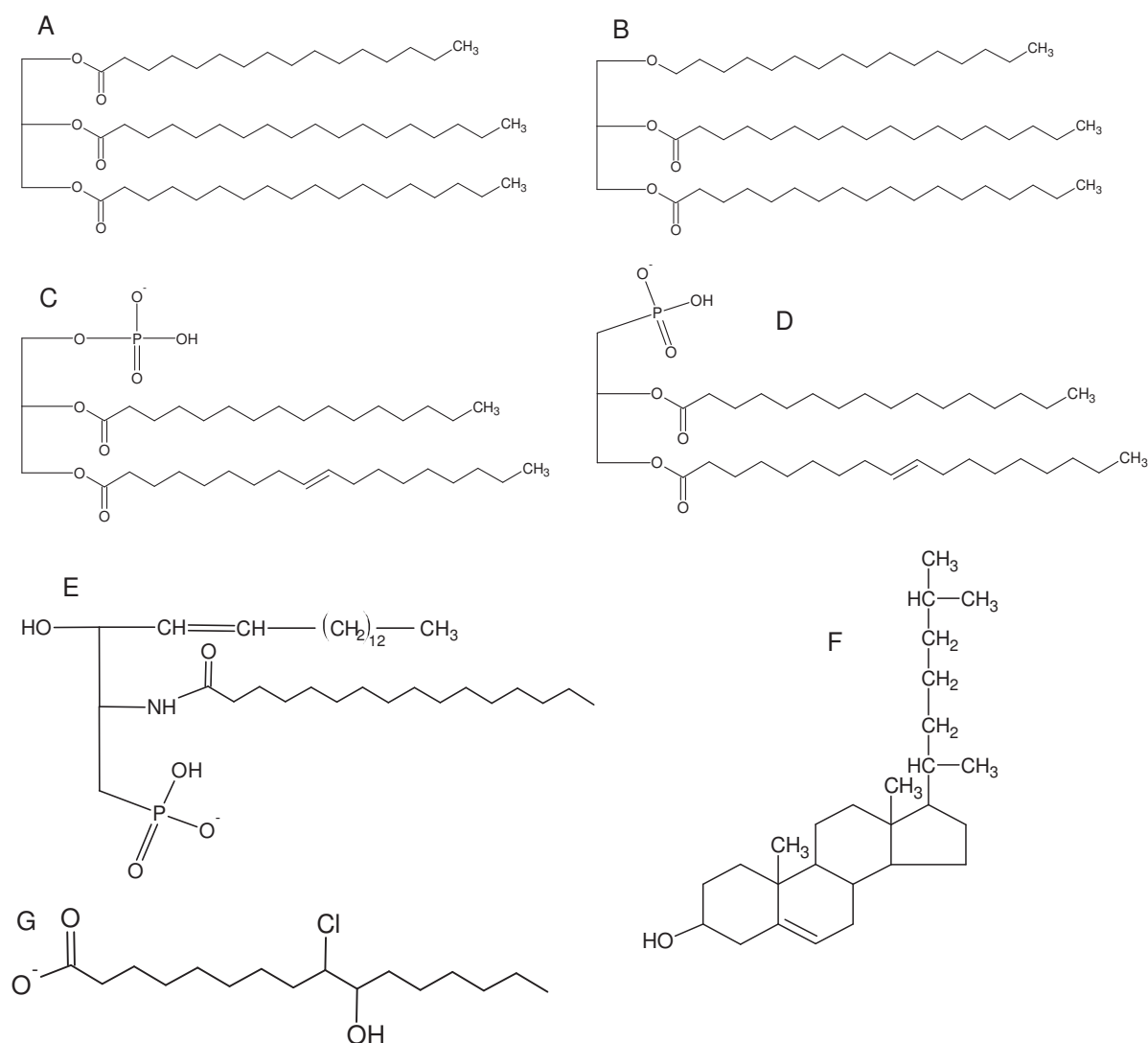
Em 1974, Stillway examinou lipídeos presentes nos nematocistos do hidrozoário conhecido como Caravela Portuguesa (*Physalia physalis*) e encontrou lipídeos fosfonados, colesterol e ácidos graxos livres. Na cifomedusa *Pelagia noctiluca* a determinação da composição de lipídeos mostrou a presença de significativa quantidade de lipídeos polares constituídos de glicerofosfolipídeos e esfingofosfolipídeos. Os lipídeos estão concentrados em grandes quantidades nas gônadas e nos tentáculos onde se concentram os nematocistos, locais onde são armazenadas as toxinas (NAKHEL et al., 1988). Na água-viva *Aurelia aurita*, diversos esfingofosfolipídeos foram identificados principalmente como ceramidas aminoetilfosfonadas entre outros análogos metilados (KARIOTOGLOU e MASTRONICOLIS, 2001). Assim como os fosfolipídeos, os fosfolipídeos são elementos estruturais da membrana celular e podem ter função na permeabilidade e estabilização da membrana (KARIOTOGLOU e MASTRONICOLIS, 2003).

#### 1.3.3.1 Lipídeos contendo ácidos graxos halogenados

O interesse no estudo de compostos orgânicos halogenados tem crescido nas últimas décadas. Em parte este interesse pode ter resultado do aumento dos níveis de poluentes, especialmente os organoclorados como, por exemplo, o diclorodifeniltricloroetano (DDT) derivado das atividades industriais (MU et al., 1997). Dentre os hidrocarbonetos halogenados (Figura 03G), os ácidos graxos clorados têm sido encontrados como componentes dos lipídeos de águas-vivas (WHITE e HAGER, 1977), entre outros organismos marinhos, sendo considerados os maiores constituintes dos compostos orgânicos halogenados em peixes, bivalves e águas-vivas (MU et al., 1997).

Os ácidos graxos halogenados encontrados em medusas são os ácidos 9-cloro-10-hidroxipalmítico, 10-cloro-9-hidroxipalmítico, 9-cloro-10-hidroxiesteárico, 10-cloro-9-hidroxiesteárico, 11-cloro-12-hidroxiesteárico e 12-cloro-11-hidroxiesteárico (WHITE e HAGER, 1977).

**FIGURA 03** –EXEMPLOS DE LIPÍDEOS ENCONTRADOS EM MEDUSAS



Estrutura de alguns lipídeos encontrados em medusas: (A) triacilglicerol, (B) gliceril-éter, (C) fosfolípideo (ácido fosfatídico), (D) fosfonolípideo, (E) esfingofosfonolípideo, (F) colesterol e (G) ácido graxo halogenado (ácido 9-cloro-10-hidroxipalmítico).

## **2. OBJETIVOS**

---

## 2.1 OBJETIVO GERAL

No intuito de estabelecer um conhecimento detalhado sobre as moléculas que são encontradas na cifomedusa *Phyllorhiza punctata*, o objetivo geral deste trabalho foi:

- Extração, purificação e análise estrutural, qualitativa e quantitativa de carboidratos e lipídeos presentes na espécie em estudo.

## 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a composição de monossacarídeos e de ácidos graxos totais presentes em *P. punctata*;
- Extrair e isolar glicolipídeos do organismo em estudo;
- Extrair e isolar carboidratos do organismo em estudo;
- Caracterizar a estrutura química fina das moléculas encontradas empregando técnicas químicas, espectrométricas e espectroscópicas, utilizando CG-EM, ESI-MS e RMN;

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

---

### 3.1. OBTENÇÃO DO MATERIAL BIOLÓGICO

Os exemplares de medusas foram coletados na Baía de Guaratuba (PR-Brasil), durante os meses de Fevereiro a Abril de 2003 e 2004 pela equipe de pesquisa da Professora Maria Angélica Haddad (Depto. de Zoologia – UFPR) com auxílio de barco e rede. Os animais coletados foram transportados em sacos plásticos com água do mar e no laboratório eles foram congelados e liofilizados.

Para realizar as análises de composição química, açúcares e ácidos graxos totais, os animais foram estudados na sua forma íntegra e divididos em partes denominadas de guarda-chuva, braços orais e muco (material gelatinoso formado durante o descongelamento das medusas).

### 3.2. MATERIAIS, EQUIPAMENTOS E UTILIZAÇÃO GERAL

-Balanças: Acculab LA-200 e Mettler Toledo AB 204	Gravimetria geral.
-Capela: Casplast de polipropileno	Exatidão de substâncias tóxicas.
-CG-EM: CG-Varian 3300 acoplado a EM-Finnigan 4.10 ITD e Varian Saturn 2000R	Análise de ácidos graxos e monossacarídeos derivatizados
-Coluna capilar: OV-225 Quadrex (30 m x 0.25 mm d.i.)	Separação de alditóis acetatos e ácido graxo metil ésteres.
-Espectrofotômetro: Hitachi U-2001	Análise de absorvância no visível.
-Evaporador rotatório Fisatom: 802	Evaporação sob pressão reduzida
-Liofilizador: Edwards freeze dryer <i>Moldulyo</i>	Secagem por sublimação de compostos aquosos.
-Microscópio eletrônico: Jeol – JMF6360LV, <i>Scanning Electronic Microscope</i> ;	Análise de EDS ( <i>Energy Dispersion Spectroscopy</i> ).
-Microscópio óptico Olympus;	Visualização de estruturas microscópicas;
-Resinas catiônica e aniônica: Dowex	Cromatografia, remoção de Na <sup>+</sup> ;
-pHmetro: Micronal B 374;	Concentração hidrogeniônica.
-RMN: Avance DRX Bruker 400 MHz NMR;	Análise estrutural refinada por <sup>13</sup> C e <sup>1</sup> H.
-Silica gel-60: Merck (alufolien 20 x 20, 0.2 mm e 2 mm, N. 1.05553) e pó (70-230 mesh);	Cromatografia em camada delgada e coluna cromatográfica de adsorção.

### 3.3. MÉTODOS ANALÍTICOS GERAIS

#### 3.3.1 Métodos cromatográficos

##### 3.3.1.1 Cromatografia em camada delgada (CCD)

As análises em CCD foram realizadas em placas de sílica gel-60 (ver item 3.2) com 7 cm de altura com uso de solventes, como fase móvel, apropriados para cada classe de compostos analisados. A visualização das bandas foi feita com a utilização de reveladores específicos para cada grupo de compostos analisados, como: para carboidratos e glicolipídeos, orcinol- $\text{H}_2\text{SO}_4$  (SKIPSKI, 1975) e grupos amina ( $\text{NH}_2$ ), ninhidrina, pelo aquecimento a  $100^\circ\text{C}$ .

##### 3.3.1.2 Cromatografia em coluna

As colunas cromatográficas (30 cm x 2 cm d.i.) foram montadas com sílica gel-60 com as partículas de tamanho entre 0.2-0.5 mm (Merck). As amostras foram aplicadas e eluídas, inicialmente com  $\text{Et}_2\text{O}-\text{CHCl}_3-\text{MeOH}$  (95:4:1 v/v/v) e então com diferentes misturas de  $\text{CHCl}_3-\text{MeOH}$  aumentando a concentração de MeOH de 5 para 50%. A eluição ocorreu a um fluxo de  $\sim 1 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$  e frações de 10 ml foram coletadas.

Cromatografia de troca iônica foi realizada em colunas (10 cm x 2 cm d.i.) montada com resinas catiônica e aniônica (Dowex), e eluídas com  $\text{H}_2\text{O}$  e NaCl (5, 10 e 15%). A coluna foi montada com as duas resinas que foram separadas por um papel filtro.

### 3.3.1.3 Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-EM)

Os açúcares e ácidos graxos foram devidamente convertidos em seus respectivos derivados voláteis (alditol acetato ou alditol acetato parcialmente metilado e ácido graxo metil éster respectivamente) e analisados por CG-EM; cromatógrafo gasoso Varian 3300 acoplado a um espectrômetro de massa Finnigan ITD 800 (*ion trap detector*). A coluna utilizada na separação dos componentes foi uma coluna capilar preenchida com OV-225 (Quadrex – 30 m x 0.25 mm d.i.) e He (5.0 analítico) foi utilizado como gás de arraste a um fluxo de 2 ml.min<sup>-1</sup>. A programação de temperatura foi adaptada para cada grupo de compostos analisados e desenvolvida como segue:

- programa **A** (alditol acetato)

temperatura do injetor: 250°C; temperatura inicial do cromatógrafo de 50°C mantida por 1 min e aumentada para 230°C a 40°C.min<sup>-1</sup> e mantida constante nesta temperatura até o final da análise (25 min).

- programa **B** (alditol acetato parcialmente metilado)

temperatura do injetor: 250°C; temperatura inicial do cromatógrafo de 50°C mantida por 1 min aumentada para 220°C a 40°C.min<sup>-1</sup> e mantida constante nesta temperatura até o final da análise (30 min).

- programa **C** (ácido graxo metil éster)

temperatura do injetor: 250°C; temperatura inicial do cromatógrafo de 50°C mantida por 1 min aumentada para 210°C a 40°C.min<sup>-1</sup>, mantida por 14 min e então elevada para 230°C a 40°C min<sup>-1</sup> e mantida constante nesta temperatura até o final da análise (30 min).

Os cromatogramas obtidos foram analisados no software ITDS (*Ion Trap Data System* 4.10) e os picos identificados através de seus respectivos tempos de retenção relativo ( $R_t$ ) comparados com padrões conhecidos e confirmados pelo perfil de fragmentação resultantes do impacto de elétrons com energia de 70 eV. A janela de massa utilizada foi: 1) 80-220  $m/z$ , para alditóis acetato e alditóis acetato parcialmente metilados e 2) 40-450  $m/z$  para ácidos graxos metil ésteres.

#### 3.3.1.4 Cromatografia de gel permeação (GPC)

A análise de homogeneidade dos polissacarídeos foi realizada em um cromatógrafo de exclusão estérica de alta pressão (HPSEC) WATERS, equipado com dois detectores, um detector de índice de refração diferencial WATERS 2410 e outro detector de espalhamento de luz em multiângulos (MALLS) WYATT TECHNOLOGY modelo DAWN DSP. A separação cromatográfica foi realizada empregando-se 4 colunas de gel permeação WATERS ligadas em série com limites de exclusão de  $1 \cdot 10^6$   $1 \cdot 10^5$   $1 \cdot 10^4$   $1 \cdot 10^3$  Da. O solvente utilizado na solubilização e na eluição foi 0.1M  $\text{NaNO}_3$ -0.02%  $\text{NaN}_3$ , com fluxo de  $0,6 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ .

#### 3.3.2 Métodos espectrofotométricos

Realizado em um espectrofotômetro Hitachi 2001U – UV/Visível. Foi utilizado para determinar a curva de absorbância da amostra e padrões de polissacarídeos complexados com iodo (solução de lugol), sendo realizada uma varredura na faixa do espectro visível (400-800 nm). Os valores de absorbância obtidos foram lançados

no software Microsoft Excel e assim foram construídos gráficos mostrando a curva de absorvância de cada análise.

### 3.3.3 Espectrometria de massa

#### 3.3.3.1 ESI-MS (*electrospray ionization mass spectrometry*)

Esta técnica foi empregada na determinação dos íons moleculares (IM) provenientes dos glicolípídeos, sem promover sua fragmentação. O experimento foi realizado em um equipamento Bruker modelo Esquire 3000 Plus e desenvolvido no modo de ionização negativo provendo íons moleculares  $[M]^-$ . A amostra foi solubilizada em 0,01% de acetato de amônio em MeOH e os seguintes parâmetros foram adotados: saída do capilar -166.0 v, tempo de acumulação 1474  $\mu$ s e janela de massa de 500-1000  $m/z$ .

Esta análise foi realizada no Istituto G. Ronzoni, em Milão/Itália.

### 3.3.4 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

#### 3.3.4.1 Preparo das amostras

Os espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$  (1D e 2D) foram realizados em um espectrômetro Bruker Avance DRX 400 MHz e as amostras analisadas em tubos de quartzo de 20 cm de comprimento e 5 mm d.i. As amostras de glicolípídeos purificadas tiveram os prótons hidroxílicos trocados por deutério através de repetidas solubilizações com  $\text{CDCl}_3$ -MeOD- $\text{D}_2\text{O}$  (1:1:0.5, v/v/v) seguidas de evaporação. As

amostras foram solubilizadas em  $\text{CDCl}_3$  ou  $\text{Me}_2\text{SO}-d_6$  e os espectros obtidos a  $30^\circ\text{C}$  e  $70^\circ\text{C}$  respectivamente. O espectro do polissacarídeo foi obtido em  $\text{Me}_2\text{SO}-d_6$  a  $70^\circ\text{C}$  e  $\text{Me}_4\text{Si}$  foi utilizado como padrão interno ( $\delta = 0$ ).

#### 3.3.4.2 Experimentos de RMN unidimensionais (1D) e bidimensionais (2D)

Os espectros unidimensionais de  $^1\text{H}$  foram obtidos em 400 MHz com relação ao núcleo de  $^1\text{H}$  enquanto os espectros de  $^{13}\text{C}$  obtidos com carbono desacoplado com 100.623 MHz em relação ao núcleo de  $^{13}\text{C}$ .

O completo assinalamento dos  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  dos glicolipídeos foi conseguido através dos experimentos bidimensionais, como: COSY (*Correlation Spectroscopy*), técnica homonuclear utilizada para correlacionar os deslocamentos químicos dos núcleos de  $^1\text{H}$  acoplados aos  $^1\text{H}$  vicinais, C-1  $\rightarrow$  C-2, C-2  $\rightarrow$  C-3, por exemplo. TOCSY (*Total Correlation Spectroscopy*), técnica homonuclear utilizada para correlacionar núcleos de  $^1\text{H}$  de todo o sistema, sendo possível correlacionar H-1 com H-2, H-3, etc, por exemplo. HMQC (*Heteronuclear Multiple Quantum Correlation Spectroscopy*), técnica heteronuclear que correlaciona os núcleos de  $^1\text{H}$  e seu correspondente  $^{13}\text{C}$ . ROESY (*Rotating-Frame Overhauser Effect Spectroscopy*), técnica homonuclear capaz de mostrar interações espaciais de prótons distantes até 3 Å um do outro.

#### 3.3.5 Determinação dos elementos químicos

As amostras liofilizadas (umbrela, braços orais e muco) foram submetidas a análises de Raios-X para determinação de sua composição química. O experimento

EDS (*energy dispersion spectroscopy*) foi realizado em um equipamento Jeol – JMF6360LV – *Scanning Electronic Microscope* sob condições de baixo vácuo. Neste experimento, os elétrons mais fortemente ligados ao núcleo são removidos por um feixe de elétrons, deixando estados não ocupados, quando estes são ocupados pelos elétrons das camadas mais afastadas ocorre a liberação de energia que é detectada pelo equipamento no comprimento de onda dos Raios-X. Cada elemento químico é identificado pelo equipamento pelas diferenças na energia emitida.

Estas análises foram realizadas pelo Prof. Ney P. M. Filho do CME (Centro de Microscopia Eletrônica) da UFPR.

### 3.3.6 Determinação da composição monossacarídica

Para determinação da composição dos monossacarídeos, 10 mg de cada amostra (umbrela, braços orais, muco e o animal intacto) foram hidrolisados com TFA 2M por 8 horas a 100°C e o material hidrolisado foi evaporado até a secura e então sucessivamente reduzido com NaBH<sub>4</sub> e acetilado com Ac<sub>2</sub>O-piridina (1:1 v/v) a 100°C por 2 horas, resultando em uma mistura de alditóis acetato a qual foi submetida à análise por CG-EM. A separação foi realizada (programa **A**, item 3.3.1.3) em uma coluna capilar de sílica fundida (Quadrex-OV-225). Os monossacarídeos, na forma de seus respectivos alditóis acetatos, foram identificados comparando seus respectivos valores de R<sub>t</sub> e seus perfis de IE-EM, *m/z* 80-220 (JANSSON et al., 1976)

### 3.3.7 Composição de ácidos graxos totais

Os ácidos graxos foram analisados por CG-EM na forma de ácido graxo metil éster (AGME) obtidos pelo refluxo das amostras (10 mg) em uma solução de 3% HCl em MeOH por 6 horas a 80°C (MORRISON, 1986). As amostras foram neutralizadas com AgCO<sub>3</sub> e os AGME's resultantes foram extraídos pelo particionamento com *n*-hexano (1ml - duas vezes) e remoção da fase de *n*-hexano contendo AGME's. O *n*-hexano foi evaporado à temperatura ambiente (~25°C) e as amostras foram solubilizadas em acetona para serem analisadas por CG-EM. Foi utilizada uma coluna de sílica OV-225 (citada anteriormente) e com a programação de temperatura **B** (item 3.3.1.3). Os AGME's foram identificados pelos seus respectivos valores de R<sub>f</sub> e IE-EM (*m/z* 40-450) comparados com padrões (Sigma Co.).

## 3.4 ANÁLISE DO MATERIAL BIOLÓGICO

### 3.4.1 Análise lipídica

#### 3.4.1.1 Extração

Depois de liofilizadas, as medusas intactas (147 g) foram submetidas à extração com CHCl<sub>3</sub>:MeOH:EtOH (1:1:1 v/v, 600 ml) sob constante agitação em temperatura ambiente (~25°C) por 12 h. O extrato resultante (EL1 46,3 g) foi filtrado e o resíduo desta extração foi submetido à extração com CHCl<sub>3</sub>-MeOH (2:1 v/v 300ml) (SASSAKI et al., 1999) em refluxo a 70°C por 2 h, este processo foi repetido por 2 vezes, produzindo o extrato EL2 (7,5 g). Os extratos foram evaporados até a

secura com temperatura de  $\sim 40^{\circ}\text{C}$  em evaporadores rotatórios sob pressão reduzida e, então, armazenados em refrigerador.

#### 3.4.1.2 Fracionamento e Isolamento

O extrato lipídico EL1 foi particionado entre  $\text{CHCl}_3$  e  $\text{H}_2\text{O}$  (1:1 v/v, 200 ml) produzindo, assim, duas frações, uma orgânica (EL1O – 4.2 g) e outra aquosa (EL1A – 42.1 g) (Fluxograma 01, pg 28). As frações foram então analisadas por CCD (sílica gel-60, Merck) utilizando  $\text{CHCl}_3$ -MeOH- $\text{H}_2\text{O}$  (65:25:4, v/v/v) como fase móvel. A presença de glicolípídeos foi examinada usando uma solução reveladora específica para carboidratos, orcinol- $\text{H}_2\text{SO}_4$ , desenvolvida a  $100^{\circ}\text{C}$  (SKIPSKI, 1985) e confirmada posteriormente por RMN e GC-EM.

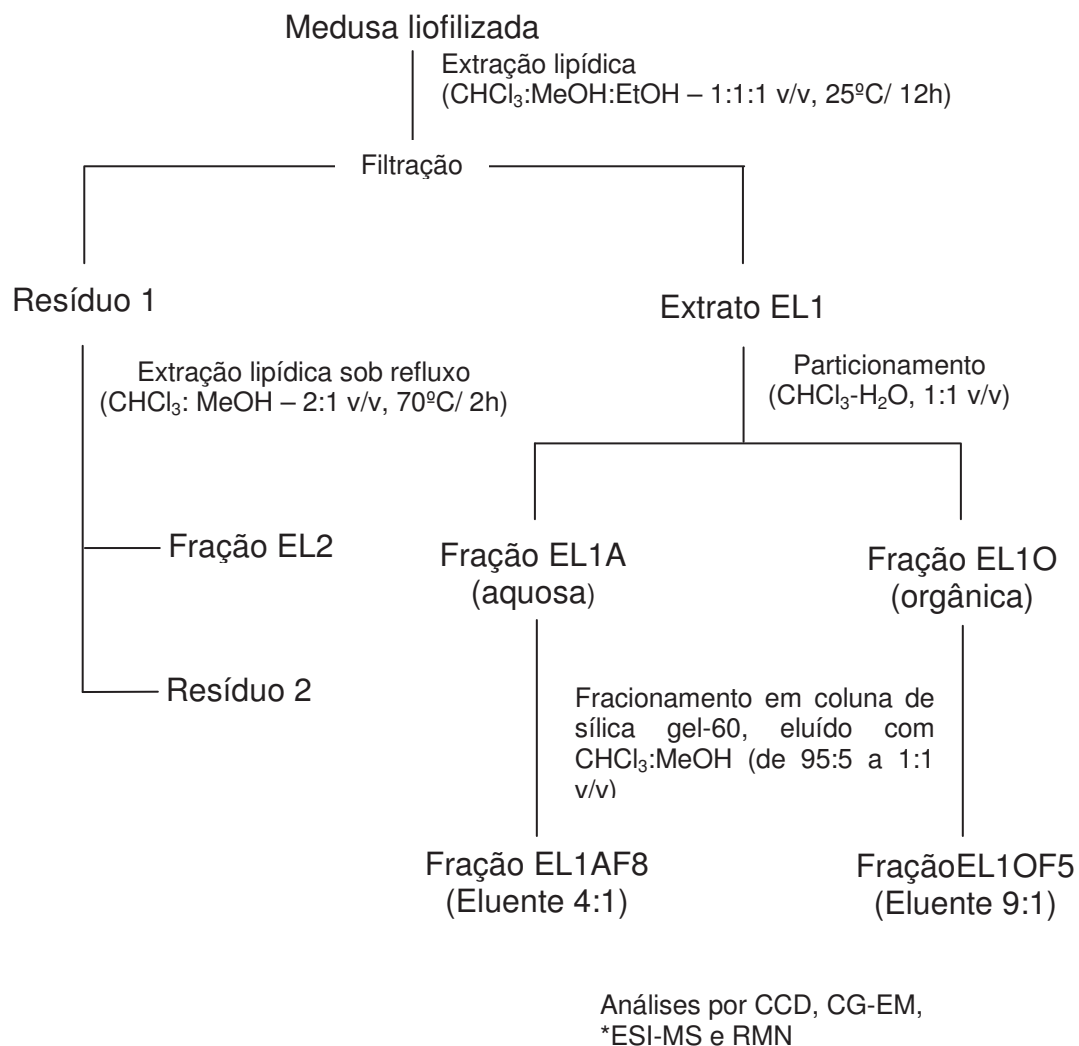
As frações EL1O e EL1A foram aplicadas em colunas preenchidas com sílica gel-60 (Merck) e foram eluídas com  $\text{Et}_2\text{O}$ - $\text{CHCl}_3$ -MeOH (95:4:1 v/v/v) e então eluídas com diferentes misturas de  $\text{CHCl}_3$ -MeOH, iniciando com 95:5 (v/v) seguido de um aumento gradual na concentração de MeOH (até 50%, v/v) e um fluxo de  $\sim 1\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ . Frações de 10 ml foram coletadas de ambas as colunas e analisadas por CCD como descrito anteriormente. As frações positivas para orcinol- $\text{H}_2\text{SO}_4$  foram apropriadamente combinadas e dois glicolípídeos foram obtidos, sendo um da fração EL1O e outro da EL1A. Os glicolípídeos foram, então, purificados por CCD preparativa (sílica gel-60, Merck de 2 mm de espessura), utilizando a mesma fase móvel descrita anteriormente.

#### 3.4.1.3 Análise dos ácidos graxos e carboidratos dos glicolipídeos

Alíquotas (~2 mg) das frações obtidas pela CCD preparativa foram metanolizadas em uma solução de HCl 3% em MeOH por 4 h a 80°C (MORRISON, 1986), a solução foi neutralizada com AgCO<sub>3</sub> e então os AGME's, resultantes da esterificação, foram extraídos com *n*-hexano e analisados por CG-EM, conforme descrito no item 3.4.2.

A fase metanólica, a qual continha o metil-glicosídeo formado durante a metanólise foi separada do resíduo de AgCl formado durante o processo de neutralização. O solvente foi evaporado e o material submetido a hidrólise com TFA 1M a 100°C por 8 h. O material hidrolisado foi reduzido com NaBH<sub>4</sub> e acetilado (Ac<sub>2</sub>O-piridina), produzindo alditóis acetatos os quais foram analisados por CG-EM (item 3.3.6).

**FLUXOGRAMA 01: EXTRAÇÃO, ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DOS GLICOLIPÍDEOS.**



\*Experimento realizado apenas na fração EL1AF8

### 3.4.2 Análise dos carboidratos

#### 3.4.2.1 Extrações

O resíduo seco (93,2 g) da extração lipídica foi submetido a extrações aquosas (400ml) sob refluxo a 100°C por 2 h, repetidas por 3X. O extrato aquoso foi filtrado e evaporado até um volume reduzido. O resíduo desta extração (28,4 g) foi, então, submetido à extração alcalina com hidróxido de sódio (NaOH) 2% sob refluxo a 100°C na presença de NaBH<sub>4</sub> por 2 h. O extrato alcalino foi neutralizado com HOAc e evaporado até um pequeno volume (Fluxograma 02, pg 31).

#### 3.4.2.2 Precipitação com etanol

Os extratos aquoso e alcalino foram tratados com EtOH (3 volumes) para que houvesse a precipitação das macromoléculas. As frações solúvel em EtOH, AQSE (51,2 g) e precipitada em EtOH, AQPE (13,6 g) foram obtidas do extrato aquoso. As frações ALSE (26,4 g) e ALPE (2,0 g) (solúvel e precipitado em etanol, respectivamente) foram obtidas do extrato alcalino. As frações foram separadas por centrifugação (8000 rpm por 10 min.). As frações precipitadas em EtOH foram posteriormente dialisadas contra um gradiente de água, em membrana de 12-14 kDA. A presença de carboidratos foi investigada em todas as frações pelo método do fenol-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (DUBOIS, et al; 1956).

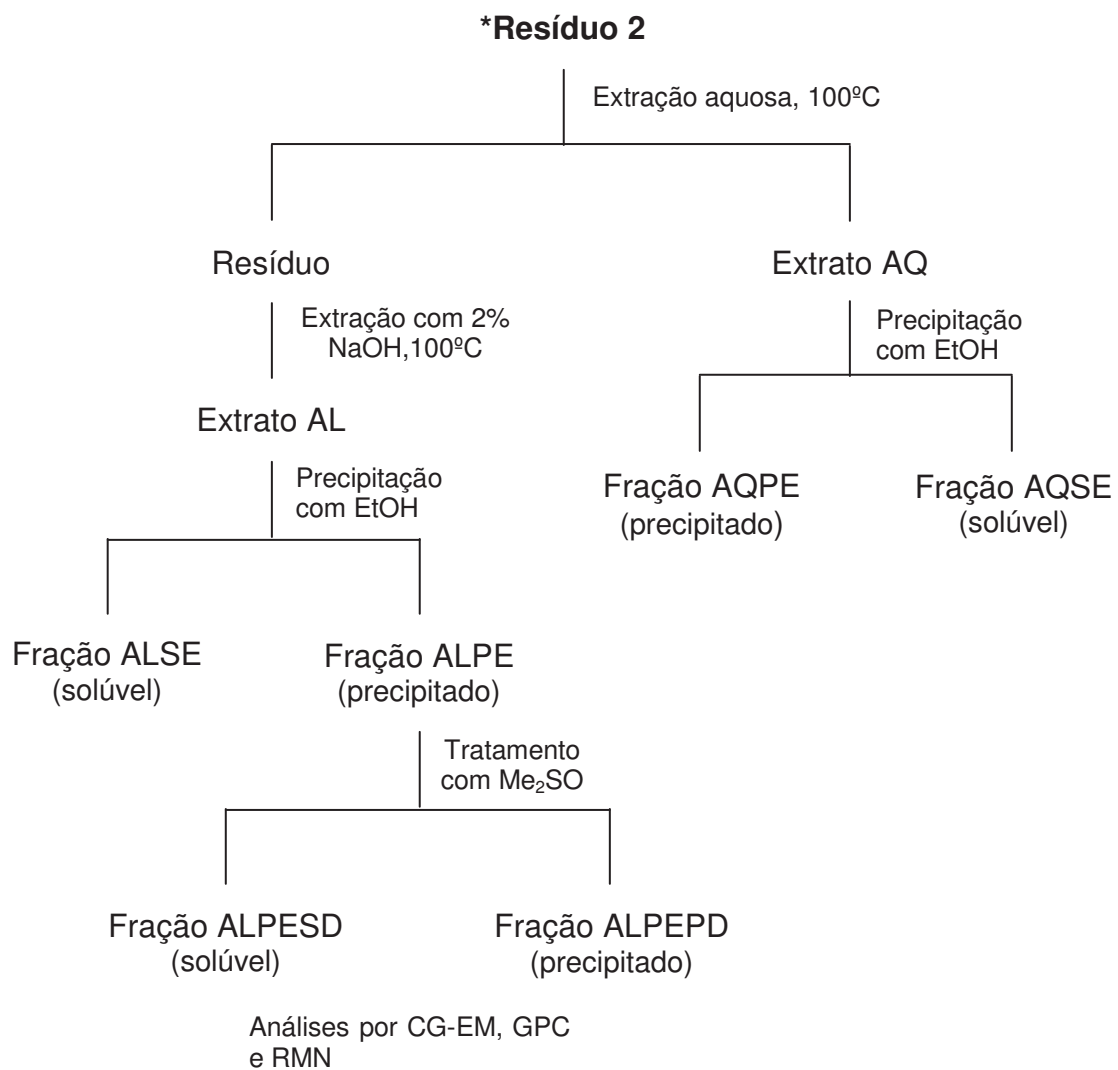
#### 3.4.2.3 Extração com dimetilsulfóxido (Me<sub>2</sub>SO)

A fração ALPE foi suspensa em Me<sub>2</sub>SO e deixada por 16 h sob agitação magnética a 80°C resultando na obtenção de duas frações, uma solúvel (ALPESD) e outra insolúvel (ALPEPD) que foram separadas por centrifugação (8000 rpm, 20 min.). As frações foram evaporadas até *secura* para cálculo de rendimento e uma alíquota foi submetida à análise de homogeneidade.

#### 3.4.2.4 Análise de metilação do polissacarídeo

Uma alíquota de 10 mg foi solubilizada em Me<sub>2</sub>SO e NaOH, a esta mistura foi adicionada CH<sub>3</sub>I (500 µl) sendo agitada em vortex por 10 min, este procedimento foi repetido por 3 vezes (CIUCANU e KEREK, 1984). Esta solução foi deixada em repouso por 14 h e, então, neutralizada (HOAc) e particionada entre CHCl<sub>3</sub> e H<sub>2</sub>O. A fase aquosa foi removida e descartada e a orgânica lavada duas vezes com H<sub>2</sub>O e evaporada, resultando no polissacarídeo *per-O*-metilado. Este foi parcialmente hidrolisado pela adição de uma solução aquosa contendo 50% de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (v/v) mantida por 1 h em banho de gelo (0°C), sendo então diluída para concentração de 1M pela adição de H<sub>2</sub>O, e a completa hidrólise foi realizada a 100°C por 14 h. A solução foi neutralizada com carbonato de bário e os resultantes monossacarídeos parcialmente *O*-metilados foram reduzidos com (NaB<sup>2</sup>H<sub>4</sub>) e acetilados, como descrito anteriormente, e analisados por CG-EM seguindo a programação cromatográfica **B**. Os picos referentes aos 1-deutério-alditois acetatos parcialmente *O*-metilados foram identificados pelos seus respectivos valores de R<sub>t</sub> e perfil de fragmentação quando comparados com padrões (SASSAKI et al., 2005).

**FLUXOGRAMA 02: EXTRAÇÃO, ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DOS CARBOIDRATOS**



\* Refere-se ao resíduo da segunda extração lipídica

## **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

---

#### 4.1 COLETA E IDENTIFICAÇÃO DAS MEDUSAS

Os exemplares de *P. punctata* foram coletados durante os meses de fevereiro e março, neste período no Brasil ocorre o desenvolvimento da forma medusa adulta desta espécie que pode ser avistada nadando próximo da superfície. Devido a este hábito foi possível fazer coleta seletiva da espécie pelo lançamento de redes na superfície da água. A identificação foi realizada pela Professora Maria Angélica Haddad do Depto. de Zoologia – UFPR.

Caracteristicamente, *P. punctata* apresenta simbiose com uma microalga, o que pode explicar seu hábito natatório de superfície, porém segundo Graham et al, (2001) exemplares coletados no Golfo do México não apresentam esta relação simbiótica.

#### 4.2 EXTRAÇÕES E RENDIMENTOS

As medusas coletadas tiveram a massa úmida determinada, em seguida foram congeladas e liofilizadas. A massa seca correspondeu a ~5% da massa úmida, deve ser considerado ainda a presença de grande concentração de sais presentes no material.

O material seco (147 g) foi submetido a diferentes processos extrativos, começando pela extração com solventes orgânicos (CHCl<sub>3</sub>-MeOH-EtOH – 1:1:1 v/v). Como produto desta extração foram obtidos pigmentos e outras substâncias lipossolúveis, como lipídeos e glicolipídeos. O rendimento desta extração foi de 46,3 g (31,5%), como mostrado na Tabela 01 (pg 35), que apresenta os demais rendimentos. A seguir, o resíduo foi submetido à extração com CHCl<sub>3</sub>-MeOH (2:1,

v/v) obtendo-se um rendimento (5,1%) muito inferior quando comparado com o rendimento da primeira extração. Esta diferença deve-se principalmente a alta concentração de sais (principalmente NaCl) encontrados no primeiro extrato.

O material residual das extrações com solventes orgânicos foi submetido a extrações aquosas à 100°C sob refluxo. Como produto foi obtido uma mistura contendo carboidratos de alta e baixa massa molecular com proteínas e glicoproteínas, sendo que o rendimento desta extração foi de 64,8 g. O extrato aquoso foi submetido a um tratamento com etanol gelado (3 volumes) para que houvesse a separação das moléculas de alta e baixa massa molecular. Observou-se, então, a formação de um precipitado formado por moléculas de alta massa molecular insolúveis em etanol, que foi separado por centrifugação obtendo-se uma fração solúvel (79%) e outra insolúvel (21%) em etanol. Como era esperado, foi encontrada uma alta quantidade de sais na fração solúvel o que justifica a diferença nos rendimentos.

A última extração foi realizada com NaOH (2%) à 100°C e na presença de NaBH<sub>4</sub> para prevenir a degradação dos carboidratos. O rendimento total foi 28,4 g e o extrato foi tratado com etanol, como descrito anteriormente, obtendo-se uma fração insolúvel (7%) e outra solúvel (93%) onde também foi observada alta quantidade de sais.

**TABELA 01:** RENDIMENTOS DOS EXTRATOS E DE SEUS FRACIONAMENTOS.

Extrato/Fração	Massa (em g)	Rendimento (%)
<b>Extrato CHCl<sub>3</sub>-EtOH-MeOH</b>	<b>46,3</b>	<b>31,5</b>
<i>*Fase orgânica</i>	4,2	9,0
<i>*Fase aquosa</i>	42,1	91,0
<b>Extrato CHCl<sub>3</sub>-MeOH</b>	<b>7,5</b>	<b>5,1</b>
<b>Extrato aquoso</b>	<b>64,8</b>	<b>44,1</b>
<i>**Solúvel em EtOH</i>	51,2	79
<i>**Insolúvel em EtOH</i>	13,6	21
<b>Extrato alcalino</b>	<b>28,4</b>	<b>19,3</b>
<i>**Solúvel em EtOH</i>	26,4	93
<i>**Insolúvel em EtOH</i>	2,0	7
<b>Material total</b>	<b>147,0</b>	<b>100</b>

\* - Frações obtidas após particionamento do extrato em CHCl<sub>3</sub>-H<sub>2</sub>O.

\*\* - Frações obtidas após tratamento do extrato com etanol.

### 4.3 ANÁLISE QUÍMICA ELEMENTAR

A medusa liofilizada dividida em três partes (umbrela, braços orais e muco) foi analisada em microscópio eletrônico para avaliação de composição química. Como esperado, todas as três partes apresentaram altas concentrações de sais, principalmente representados pelos elementos Na e Cl, como pode ser visto na Tabela 02 (pg 37), a qual mostra a relação dos elementos químicos detectados pela análise de EDS. Os átomos de H não são detectados por este experimento.

Apesar das elevadas concentrações de sais mostrados pelo experimento de EDS, pode-se observar que os principais elementos que constituem a matéria orgânica (carbono, nitrogênio e oxigênio) apresentaram as maiores proporções, apesar de ter havido variações em cada parte do corpo analisada. As maiores proporções de constituintes de matéria orgânica foram encontradas nos braços orais, com 73,6%. Embora menores do que nos braços orais, as proporções destes elementos na umbrela e no muco foram maiores que os demais elementos encontrados, 64,3% e 58,9% respectivamente.

**TABELA 02** – MICROANÁLISE DE RAIOS-X, MOSTRANDO OS DIFERENTES ELEMENTOS QUÍMICOS PRESENTES NAS DIFERENTES PARTES DE *P. punctata*.

Elemento	Braços orais		Umbrela		Muco	
	Elemento wt. %	Átomo %	Elemento wt. %	Átomo %	Elemento wt. %	Átomo %
C	37,3	54,5	24,2	39,5	23,2	39,5
N	5,3	6,6	4,1	5,7	2,8	4,0
O	11,3	12,5	15,7	19,1	12,0	15,4
Na	11,1	8,5	12,5	10,6	13,8	12,3
Mg	1,7	1,3	3,3	2,7	3,1	2,6
Si	0,4	0,2	---	---	0,2	0,2
P	1,2	0,6	0,5	0,3	0,4	0,3
S	2,5	1,4	5,3	3,2	2,9	1,8
Cl	27,5	13,6	31,0	17,2	39,3	22,7
K	0,9	0,4	1,4	0,7	1,0	0,5
Ca	0,8	0,4	2,0	1,0	1,3	0,7

Análise química elementar realizada pelo experimento de EDS (*Energy Dispersion Spectroscopy*) pelo Prof. Ney P. M. Filho do Centro de Microscopia Eletrônica – UFPR.  
wt. % - porcentagem baseada no peso atômico

#### 4.4 ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA TOTAL

A composição de monossacarídeos (Tabela 03, pg 39) apresentou diferenças entre as diferentes partes da medusa. No muco, os principais monossacarídeos encontrados foram a arabinose (48%) e a glucose (29%), enquanto nos braços orais eles representaram 28% e 27%, respectivamente, do total. A composição monossacarídica encontrada na umbrela apresentou grande diferença em relação as outras partes, sendo composta predominantemente por glucose (72%) e apenas 11% de arabinose foi encontrada. Na medusa intacta, foi observado que a composição de monossacarídeos era mais semelhante com a composição da umbrela, apresentando 62% de glucose e 18% de arabinose. Ribose também foi encontrada em grandes quantidades no muco (10%) e nos braços orais (11%), porém foi encontrada apenas 2% na umbrela e 4% na medusa intacta.

Glicerol (18%) e *myo*-inositol (2%) foram encontrados nos braços orais. O glicerol foi encontrado, também, na umbrela em pequena quantidade (1%), e totalmente ausente no muco. O *myo*-inositol foi encontrado em quantidades muito pequenas na medusa intacta, não sendo possível sua quantificação, e não foi observado em nenhuma outra parte. Outros monossacarídeos também foram encontrados nas amostras e estão apresentados na Tabela 03.

**TABELA 03** – COMPOSIÇÃO DE MONOSSACARÍDEOS PRESENTES NA MEDUSA INTACTA E EM PARTES DIFERENTES DO SEU CORPO.

Monossacarídeo	$*R_t$	% de monossacarídeos no:			
		Muco	B. orais	Umbrela	**Intacto
Glicerol	5:49	--	18	1	2
Ribose	10:23	10	11	2	4
Arabinose	10:45	48	28	11	18
Manose	16:43	10	3	3	4
Galactose	17:43	3	11	11	9
Glucose	18:33	29	27	72	62
<i>myo</i> -Inositol	18:57	--	2	--	tr.

\*  $R_t$  – Tempos de retenção relativos de cada componente monossacarídico analisado por CG-EM em coluna OV-225.

\*\* Refere-se ao corpo da medusa intacto.

#### 4.5 ANÁLISE DO MUCO

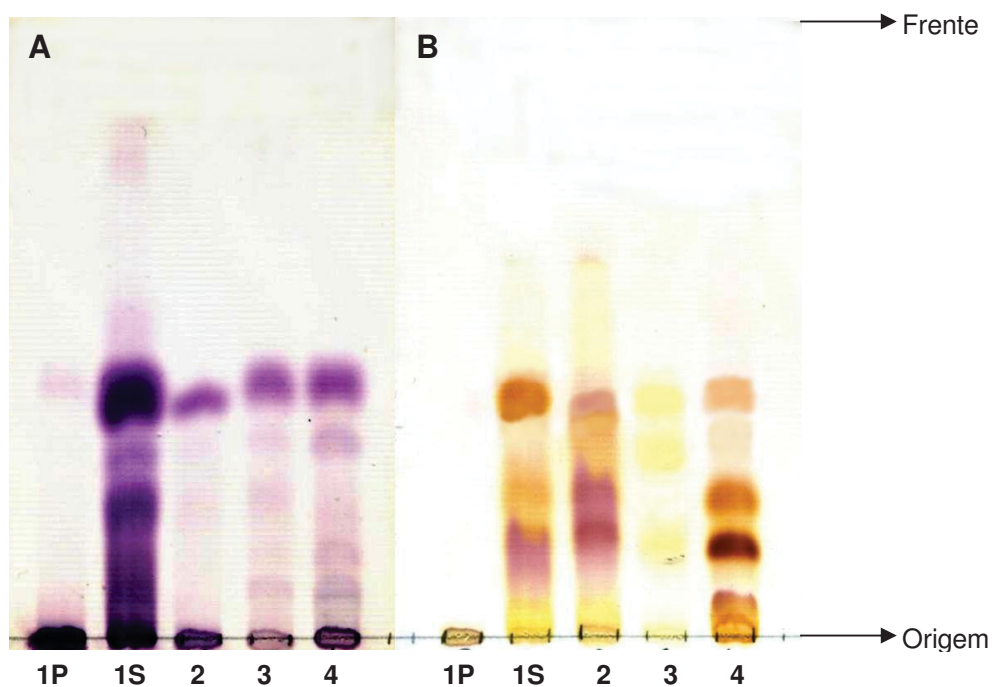
Durante o processo de degelo da medusa intacta, um material gelatinoso extravasou e foi denominado de muco. Este material foi tratado com etanol para precipitar as macromoléculas, obtendo-se uma fração solúvel e outra precipitada. Investigando a presença de carboidratos a fração solúvel foi analisada por CCD, que se mostrou ser composta por ribose livre, obtida sem hidrólise prévia. Para confirmação, a amostra foi reduzida com  $\text{NaB}^2\text{H}_4$ , acetilada e analisada por CG-EM, o resultado confirmou a presença de ribose livre. Utilizando-se ninhidrina para visualizar as bandas na CCD, verificou-se a presença de compostos aminados, porém não identificados.

O precipitado etanólico, obtido do muco, mostrou-se composto por uma mistura de proteínas e carboidratos, contendo uma alta proporção de arabinose, como pode ser observado para todo o muco (Tabela 03, pg 39). Para abtenção dos carboidratos presentes na fração precipitada em EtOH, esta foi submetida a hidrólise alcalina (NaOH aquoso, 10%) a 100°C na presença de  $\text{NaBH}_4$  por 6 h. Sob estas condições houve rompimento de ligações peptídicas sem afetar as ligações O-glicosídicas. A solução foi, então, neutralizada com HOAc e re-precipitada com etanol (3 volumes). A fração precipitada foi examinada por RMN de  $^{13}\text{C}$ , o qual mostrou, mesmo após a hidrólise alcalina, um alto conteúdo protéico, a fração que permaneceu solúvel em etanol foi aplicada em uma coluna de troca iônica, preenchida com uma mistura de resina catiônica e aniônica separadas por um papel filtro. As frações coletadas desta coluna foram nomeadas 1, 2, 3, 4 e foram eluídas com  $\text{H}_2\text{O}$  e NaCl aquoso 5%, 10% e 15% respectivamente. As frações obtidas foram armazenadas em freezer e houve formação de um precipitado na fração 1 que

passou a se chamar 1S (solúvel) e 1P (precipitado) e, então, foram analisadas por CCD (Figura 04) e CG-EM. As análises mostram a presença de bandas positivas para açúcares (orcinol-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) e para grupos NH<sub>2</sub> (ninhidrina), possivelmente de aminoácidos, que apresentaram valores de R<sub>f</sub> muito próximos. Após hidrólise total deste material foi detectada a presença de arabinose (Figura 05), que, possivelmente, estava ligada aos aminoácidos, cuja composição não foi determinada. As análises por CG-EM confirmaram a presença de arabinose em grande quantidade, mas também mostrou a presença, em pequenas quantidades e não detectadas por CCD, de outros monossacarídeos como manose, galactose e glucose. A composição monossacarídica completa esta apresentada na Tabela 04 (pg 44).

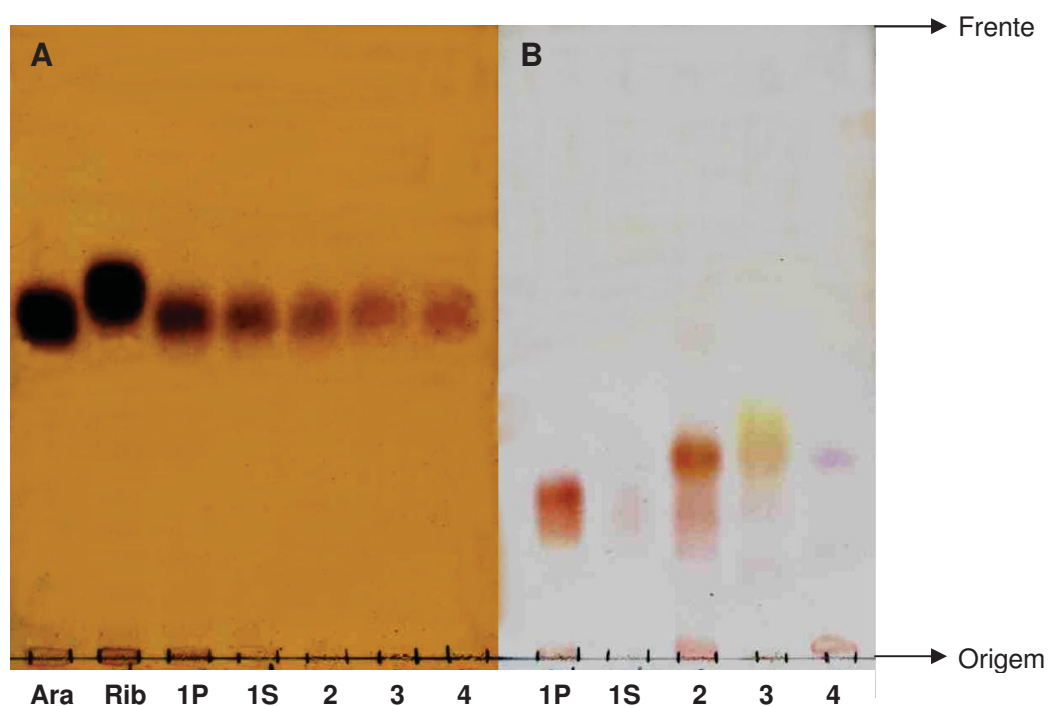
Kimura, Miura e Park (1983) e Miura e Kimura (1985) mostraram que o colágeno é um dos componentes predominantes na medusa *Stomolophus nomurai*, encontrado principalmente na mesogléia e apresentando resíduos de hidroxilisina glicosilados (glucosilgalactosilhidroxilisina e galactosilhidroxilisina). Embora a determinação completa da composição do muco não tenha sido realizada é possível que este material contenha colágeno e faça parte da mesogléia de *P. punctata*.

**FIGURA 04** – CCD DAS FRAÇÕES ELUÍDAS EM COLUNA DE TROCA IÔNICA ANTES DA HIDRÓLISE



O material denominado de muco foi precipitado com EtOH e degradado com NaOH 10%, neutralizado e re-precipitado com EtOH. A fração solúvel foi submetida à cromatografia de troca iônica e analisadas por CCD, usando EtOAc-*n*-PrOH-HOAc-H<sub>2</sub>O (4:2:2:1 v/v). A Figura **04-A** mostra a presença de açúcares (visualização com orcinol) enquanto a Figura **04-B** mostra a presença de grupos NH<sub>2</sub>, atribuídos à presença de aminoácidos (visualização com ninhidrina). As frações **1P** e **1S** referem-se à 1ª eluição realizada com H<sub>2</sub>O, que foi armazenada em freezer formando um precipitado (**1P**) e uma fração solúvel (**1S**). As frações **2**, **3** e **4** foram as frações eluídas com NaCl 5, 10 e 15% respectivamente. Os valores de R<sub>f</sub> foram calculados para as principais bandas positivas para os açúcares, e foram encontradas bandas positivas correspondentes para aminoácidos: **1P** = 0 - **1S** = 0,40 - **2** = 0,38 - **3** e **4** = 0,41.

**FIGURA 05** – CCD DAS FRAÇÕES ELUÍDAS EM COLUNA DE TROCA IÔNICA APÓS A HIDRÓLISE



As frações obtidas da coluna de troca iônica foram hidrolisadas com TFA 2M por 8 h a 100°C, evaporadas até *secura* e analisadas por CCD utilizando EtOAc-*n*-PrOH-HOAc-H<sub>2</sub>O (4:2:2:1 v/v) como solvente. Na Figura **05-A** foram visualizadas (com orcinol) bandas correspondentes a arabinose, confirmadas por CG-EM. Na Figura **05-B** foram visualizadas bandas (com ninhidrina) correspondentes à presença de grupos NH<sub>2</sub> atribuídos aos aminoácidos, que não mais apresentaram valores de R<sub>f</sub> similares aos dos açúcares. Os valores de R<sub>f</sub> foram: **Ara** = 0,54 – **Rib** = 0,58 – **1P**, **1S**, **2**, **3** e **4** = 0,54 na Figura **05-A** e **1P** = ~0,24 – **1S** = ~0,23 – **2** = 0,31 – **3** e **4** = ~0,32 na Figura **05-B**.

**TABELA 04** – COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES OBTIDAS PELA HIDRÓLISE DO MATERIAL CONTIDO NO PRECIPITADO DO MUCO

Monossacarídeo	* $R_t$	% de monossacarídeos nas frações:				
		1S	1P	2	3	4
Arabinose	10:45	81	87	63	80	48
Manose	16:43	5	6	11	4	14
Galactose	17:43	1	1	5	4	10
Glucose	18:33	13	6	21	12	28

O material contido no precipitado etanólico do muco foi degradado com NaOH e re-precipitado com EtOH. A fase solúvel foi passada em coluna de troca iônica e as frações coletadas foram hidrolisadas, reduzidas, acetiladas e analisadas por CG-EM em coluna OV-225.

\*  $R_t$  – Tempos de retenção relativos de cada monossacarídico.

#### 4.6 ANÁLISE DE ÁCIDOS GRAXOS TOTAIS

Como observado para os monossacarídeos, a composição de ácidos graxos também apresentou variações nas diferentes partes do corpo da medusa (Tabela 05, pg 48). Em termos gerais, os principais ácidos graxos encontrados foram os ácidos palmítico e esteárico. Ácido palmítico (C<sub>16:0</sub>) foi encontrado no muco (30%), na umbrela (34%) e nos braços orais (50%), enquanto que o ácido esteárico (C<sub>18:0</sub>) estava presente em 35% no muco, 12,8% na umbrela e 20,5% nos braços orais. Altas proporções de ácido mirístico (C<sub>14:0</sub>) e oléico (C<sub>18:1</sub>) foram encontradas em todas as partes, bem como consideráveis quantidades de ácido aracdônico (C<sub>20:4 $\omega$ 6</sub>; 7,3%) foram observadas no muco. O ácido 4, 7, 10, 13, 16, 19 docosahexaenóico (C<sub>22:6 $\omega$ 3</sub>; 8,3%) foi encontrado basicamente na umbrela. Os demais ácidos graxos estão apresentados na Tabela 05 (pg 48).

O ácido graxo C<sub>22:6 $\omega$ 3</sub> tem sido considerado como um marcador específico para dinoflagelados (GRAEVE et al., 1994; ZHUKOVA e AIZDAICHER, 1995). Este ácido graxo foi observado em uma quantidade relativamente alta apenas na umbrela, onde análises de microscopia óptica revelaram grande concentração de micro-algas (Figura 06, pg 47). Entretanto este ácido graxo também foi encontrado em pequenas concentrações no muco, onde não foram encontradas microalgas por análise em microscópio óptico. Isto pode indicar a translocação deste ácido graxo da micro-alga para o tecido hospedeiro. Este dado concorda com os dados obtidos por Papina et al., (2003) os quais compararam a composição de ácidos graxos obtidos de tecidos isolados de coral hospedeiro e de sua microalga simbiótica isolada.

Como não foi possível confirmar a translocação do ácido graxo ou de outra molécula entre os dois organismos, deve ser considerada a possibilidade do ácido graxo  $C_{22:6\omega3}$  ter sido obtido durante a alimentação. No entanto, exemplares de *P. punctata* foram mantidos no laboratório na tentativa de isolar suas microalgas. Os animais foram mantidos em H<sub>2</sub>O trazida do mar e em foto-período de 12 h, apesar de nenhum nutriente ou alimento ter sido adicionado os animais sobreviveram por ~3 meses. Isto sugere que suas necessidades energéticas estavam sendo supridas de alguma forma pelas micro-algas simbiotes.

A análise dos ácidos graxos realizada no animal intacto mostrou grande quantidade de ácidos graxos saturados (AGS), mas também foi possível detectar a presença de ácidos graxos monoinsaturados (AGMI) e ácidos graxos poliinsaturados (AGPI). Quando as partes do corpo da medusa foram analisadas separadamente foi possível observar que as proporções de AGS, AGMI e AGPI na umbrela eram muito semelhantes às encontradas na medusa inteira, onde foram observadas grandes quantidades de AGPI. Papina et al., (2003) mostraram a presença de grandes quantidades de AGPI em zooxantelas, sendo que grandes concentrações das microalgas foram observadas justamente na umbrela, podendo contribuir para a presença de AGPI nesta parte da medusa. Neste trabalho as proporções de AGMI e AGPI diminuíram consideravelmente no muco e nos braços orais. As menores quantidades de ácidos graxos de cadeia insaturada foram encontradas nos braços orais, os quais apresentaram apenas AGMI (13%). As análises de microscopia óptica não demonstraram a presença de micro-algas nestas partes da medusa o que reforça a hipótese de que os AGPI encontrados na umbrela (26,8%) são sintetizados pelas zooxantelas.

Embora em pequenas quantidades ácidos graxos de cadeia impar (ácidos pentadecanóico, C<sub>15:0</sub> e heptadecanóico, C<sub>17:0</sub>) também foram encontrados em quase todas as amostras. O ácido graxo pentadecanóico (C<sub>15:0</sub>) só não foi encontrado na umbrela.

**FIGURA 06** – MICROFOTOGRAFIA MOSTRANDO A PRESEÇA DE MICROALGAS EM *P. punctata*

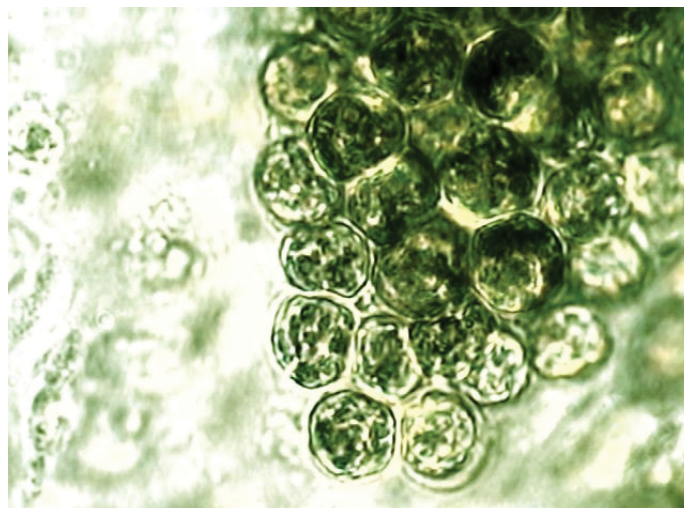


Imagem obtida de corte próximo à extremidade da umbrela de *P. punctata* mostrando a presença de microalgas.

**TABELA 05** – COMPOSIÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS PRESENTES NA MEDUSA INTACTA E NAS PARTES DO CORPO SEPARADAS

Ácido Graxo	$*R_t$	% de ácidos graxos			
		Muco	B. Orais	Umbrela	**Intacta
C <sub>12:0</sub> (ác. láurico)	6.13	--	0.65	1.2	1.2
C <sub>14:0</sub> (ác. mirístico)	6.59	4.5	12.0	8.9	7.5
C <sub>15:0</sub> (ac. pentadecanóico)	7.23	2.0	0.7	--	0.6
C <sub>16:0</sub> (ác. palmítico)	7.53	30.3	49.9	33.7	26.0
C <sub>16:1</sub> (ác. palmitoléico)	8.02	0.95	3.8	5.8	3.8
C <sub>17:0</sub> (ác. heptadecanóico)	8.30	5.0	1.8	1.1	1.7
C <sub>18:0</sub> (ác. esteárico)	9.16	34.9	20.5	12.8	17.7
C <sub>18:1</sub> (ác. oléico)	9.25	9.4	9.2	9.7	9.3
C <sub>18:2</sub> C (ác. <i>cis</i> -linoléico)	9.36	--	--	2.2	1.7
C <sub>18:2</sub> T (ác. <i>trans</i> -linoléico)	9.45	0.7	--	0.7	0.7
C <sub>18:3</sub> (ác. linolênico)	9.56	--	--	0.9	1.2
C <sub>20:0</sub> (ác. araquídico)	10.13	--	1.45	--	1.1
C <sub>20:3</sub> <sup>Δ8,11,14</sup>	10.26	--	--	4.7	5.0
C <sub>20:3</sub> <sup>Δ11,14,17</sup>	10.47	--	--	1.0	2.6
C <sub>20:4</sub> <sup>Δ5,8,11,14</sup> (ác. aracdônico)	12.44	7.3	--	3.7	6.2
C <sub>20:5</sub> <sup>Δ5,8,11,14,17</sup>	13.37	1.9	--	5.3	6.3
C <sub>22:2</sub> <sup>Δ13,16</sup>	16.45	3.1	--	--	--
C <sub>22:6</sub> <sup>Δ4,7,10,13,16,19</sup>	17.59	***tr.	--	8.3	7.4
Σ AGS		76,7	87	57,7	55,8
Σ AGMI		10,3	13	15,5	13,1
Σ AGPI		13,0	--	26,8	31,1

\*  $R_t$  – Tempos de retenção relativos de cada ácido graxo analisado por CG-EM em coluna OV-225, após sua esterificação à ácido graxo metil éster (AGME).

\*\* Refere-se ao corpo inteiro da medusa.

\*\*\* tr.- encontrado em quantidades não quantificáveis.

Σ AGS, Σ AGMI e Σ AGPI referem-se à somatória dos ácidos graxos saturados, monoinsaturados e poliinsaturados respectivamente.

## 4.7 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS GLICOLIPÍDEOS

### 4.7.1 Extração e particionamento

Foram realizadas 3 extrações sucessivas com solventes orgânicos, 1 com  $\text{CHCl}_3$ -EtOH-MeOH (1:1:1 v/v) produzindo EL1 e outras duas com  $\text{CHCl}_3$ -MeOH (1:1 v/v) produzindo a fração EL2. A presença de carboidratos foi investigada por CCD utilizando orcinol- $\text{H}_2\text{SO}_4$  (SKIPSKI et al., 1985). Embora quantidades elevadas de sais presentes nos extratos tenham impedido a correta corrida cromatográfica em CCD, foi possível detectar a presença de carboidratos no extrato EL1. A detecção de carboidratos sugere a presença de glicolipídeos neste extrato, diferindo do extrato EL2, o qual não mostrou a presença de carboidratos.

O extrato EL1 foi particionado entre  $\text{CHCl}_3$  e  $\text{H}_2\text{O}$  (1:1 v/v) e como resultado foram obtidas 2 frações chamadas de EL1A e EL1O (ver pg 28) as quais foram examinados por CCD apresentando bandas positivas para glicolipídeos.

### 4.7.2 Isolamento e purificação dos glicolipídeos

As frações EL1A e EL1O foram aplicadas em colunas preenchidas com sílica gel-60 (ver item 3.3.1.2, pg 19). A fração EL1O apresentava quantidades consideráveis de pigmentos provenientes da extração. Para remoção destes pigmentos esta fração foi eluída com  $\text{Et}_2\text{O}$ - $\text{CHCl}_3$ -MeOH (95:4:1 v/v/v). A EL1O livre de pigmentos e a fração EL1A foram eluídas por sucessivas misturas de  $\text{CHCl}_3$ -MeOH com aumentos graduais na polaridade do solvente (item 3.4.1.2, pg 26).

O material eluído das colunas foi coletado separadamente e analisado por CCD, foram obtidas bandas positivas para glicolípídeos. As frações que apresentaram mesmo  $R_f$  foram combinadas e novamente analisadas por CCD onde foram obtidas bandas positivas com valores de  $R_f$  0,58 proveniente da fração EL1A eluída da coluna com  $\text{CHCl}_3$ -MeOH (4:1 v/v) e  $R_f$  0,81 da proveniente da fração EL1O eluída com  $\text{CHCl}_3$ -MeOH (9:1 v/v), as frações foram chamadas de EL1AF8 (Figura 06 A e B, pg 51) e EL1OF5 (Figura 07, pg 52) respectivamente.

A análise por CCD mostrou que a fração EL1AF8 (Figura 07A) não se apresentava pura e foi purificada por CCD preparativa (Figura 07B). A fração foi aplicada em toda a extensão da placa de CCD (20 cm) e somente suas extremidades (direita e esquerda) foram reveladas com orcinol- $\text{H}_2\text{SO}_4$  para localização exata da posição da banda correspondente ao glicolípídeo de interesse, em seguida a camada de sílica na posição da banda positiva foi removida e o material extraído da sílica com  $\text{CHCl}_3$ -MeOH (2:1, v/v) sob constante agitação magnética.

Os valores de  $R_f$  obtidos para os glicolípídeos foram similares àqueles do sulfoquinovosildiacilglicerol (SQDG) e monogalactosildiacilglicerol (MGD, Figura 08, pg 52) obtidos do líquen *Dictyonema glabratum* (SASSAKI et al., 1999; 2001c). As estruturas foram caracterizadas e confirmadas por espectroscopia, espectrometria e cromatografia.

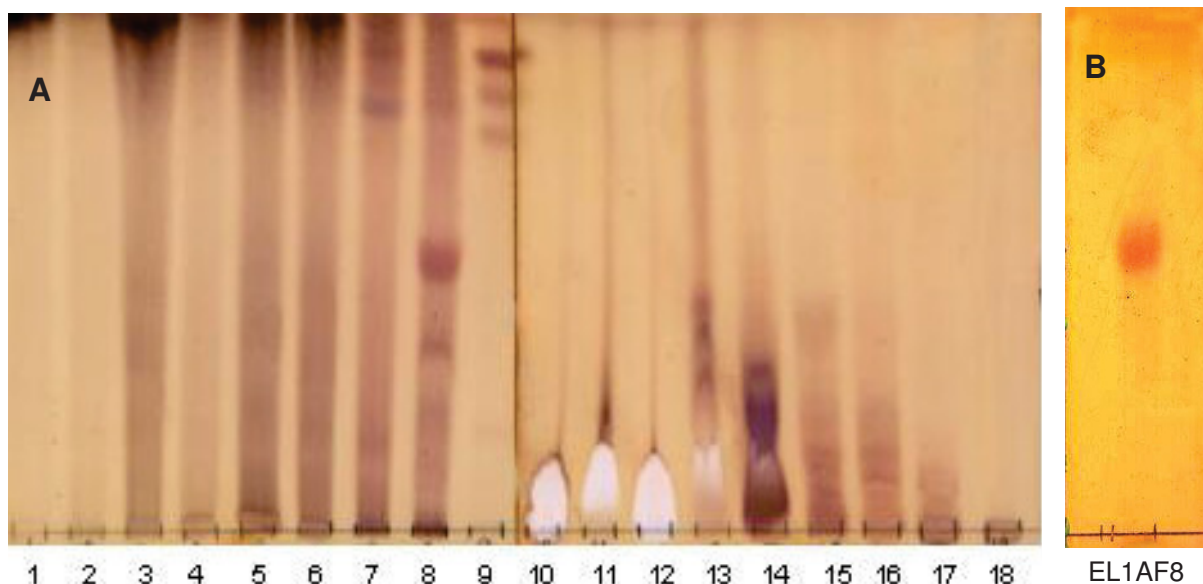
#### 4.7.3 Composição de ácidos graxos de EL1AF8 e EL1OF5

A análise dos ácidos graxos obtidos dos glicolípídeos foi realizada por CG-EM (itens 3.3.1.3, pg 20), e como pode ser visto (Tabela 06, pg 53), a composição de

ácidos graxos é diferente entre os glicolípídeos. A fração EL1OF5 apresentou 8 ácidos graxos sendo que os mais proeminentes foram o ácido mirístico (13%), ácido palmítico (37%), ácido esteárico (28%) e ácido oléico (10%). A fração EL1AF8 apresentou uma composição menos complexa, mas curiosamente composta apenas por ácidos graxos saturados, sendo estes os ácidos mirístico (18%), palmítico (59%) e esteárico (23%).

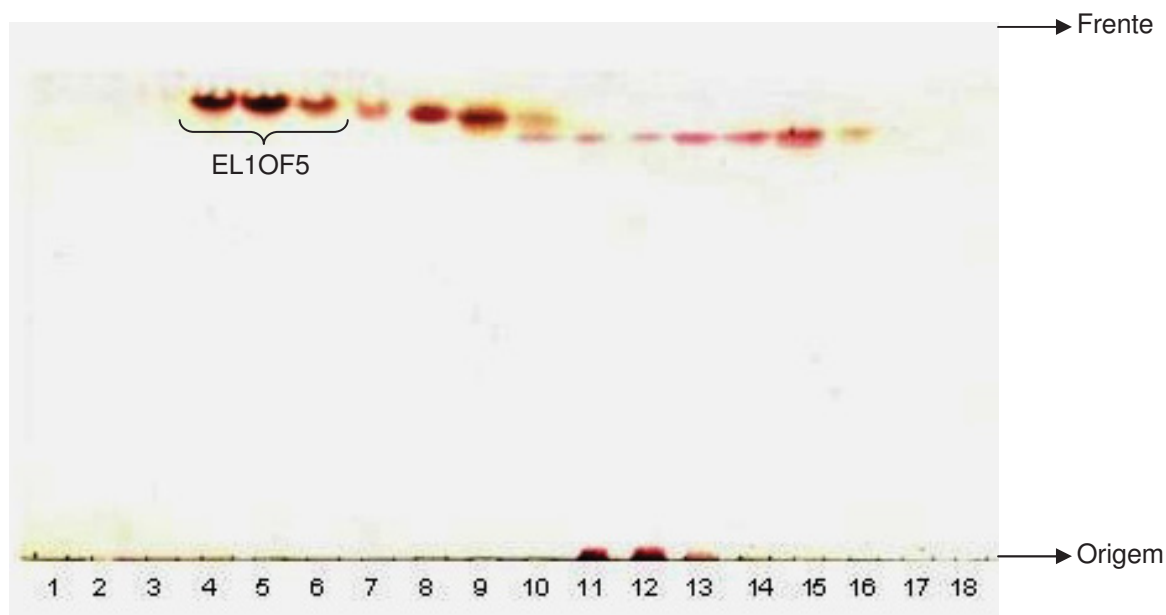
Na fração EL1OF5 foram encontrados dois AGMI, o ácido palmitoléico ( $C_{16:1}$ ) e o ácido oléico ( $C_{18:1}$ ) somando apenas 13% do total de ácidos graxos encontrados e os ácidos graxos de cadeia ímpar, ácido pentadecanóico e ácido heptadecanóico, também foram encontrados nesta fração.

**FIGURA 07** – CCD DA FRAÇÃO EL1A APÓS FRACIONAMENTO EM COLUNA DE SÍLICA GEL (A) E PURIFICAÇÃO EM CCD PREPARATIVA DA FRAÇÃO EL1F8 (B)



A fase orgânica do extrato lipídico foi aplicada em coluna de sílica gel-60, e eluída com concentrações crescentes de MeOH em  $CHCl_3$ . As frações coletadas foram analisadas por CCD (A) utilizando  $CHCl_3$ -MeOH- $H_2O$  (65:25:4, v/v) como solvente e visualizadas com orcinol- $H_2SO_4$  (SKIPSKI, 1985). A fração 8 (eluída com  $CHCl_3$ -MeOH, 4:1 v/v) apresentou uma banda com  $R_f$  similar ao do SQDG (SASSAKI et al., 1999 e 2001c) e foi purificada por CCD preparativa (B).

**FIGURA 08** – CCD DA FASE EL1O APÓS SEU FRACIONAMENTO EM COLUNA DE SÍLICA GEL



A fase aquosa do extrato lipídico foi aplicada em coluna de sílica gel-60, e eluída com concentrações crescentes de MeOH em  $\text{CHCl}_3$ . As frações coletadas foram analisadas por CCD utilizando  $\text{CHCl}_3$ -MeOH- $\text{H}_2\text{O}$  (65:25:4, v/v) como solvente e visualizadas com orcinol- $\text{H}_2\text{SO}_4$  (SKIPSKI, 1985). As bandas das frações 4, 5 e 6 (eluídas com  $\text{CHCl}_3$ -MeOH, 9:1 v/v) apresentaram  $R_f$  similar ao MGD e foram combinadas (chamadas de EL1OF5) para análises de RMN. As demais frações, embora tenham positivas com orcinol- $\text{H}_2\text{SO}_4$ , não apresentaram sinais de açúcares por RMN.

**TABELA 06** – COMPOSIÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS OBTIDOS DOS GLICOLIPÍDEOS ISOLADOS.

Ácido graxo	$*R_t$	% de ácidos graxos nas frações:	
		EL1AF8	EL1OF5
C <sub>12:0</sub> (ác. láurico)	6:13	-	2
C <sub>14:0</sub> (ác. mirístico)	7:00	18	13
C <sub>15:0</sub> (ác. pentadecanóico)	7:23	-	2
C <sub>16:0</sub> (ác. palmítico)	7:53	59	37
C <sub>16:1</sub> (ác. palmitolêico)	8:01	-	3
C <sub>17:0</sub> (ác. heptadecanóico)	8:30	-	5
C <sub>18:0</sub> (ác. esteárico)	9:15	23	28
C <sub>18:1</sub> (ác. oléico)	9:36	-	10
Σ AGS		100	87
Σ AGMI		--	13

\*  $R_t$  – Tempos de retenção relativos de cada ácido graxo analisado por CG-EM em coluna OV-225, após sua esterificação à ácido graxo metil éster (AGME).

Σ AGS e Σ AGMI referem-se à somatória dos ácidos graxos saturados e mono-insaturados respectivamente.

#### 4.7.4 Determinação da estrutura do SQDG

Como EL1AF8 teve propriedades cromatográficas similares às das do SQDG (SASSAKI et al., 1999 e 2001c) foi primeiramente submetida à análise por ESI-MS em modo negativo (Figura 09, pg 55). Como resultado dois íons moleculares  $[M]^-$  em  $m/z$  766 e 794 foram obtidos, consistentes com a estrutura para SQDG proposta (Figura 09). Comparando-se os ácidos graxos obtidos da fração EL1AF8, estes íons mostram que a porção glicerol estava esterificada pela seguinte combinação de ácidos graxos:  $C_{14:0} + C_{16:0}$  dando  $m/z$  766 e  $C_{14:0} + C_{18:0}$  ou  $C_{16:0} + C_{16:0}$  dando  $m/z$  794.

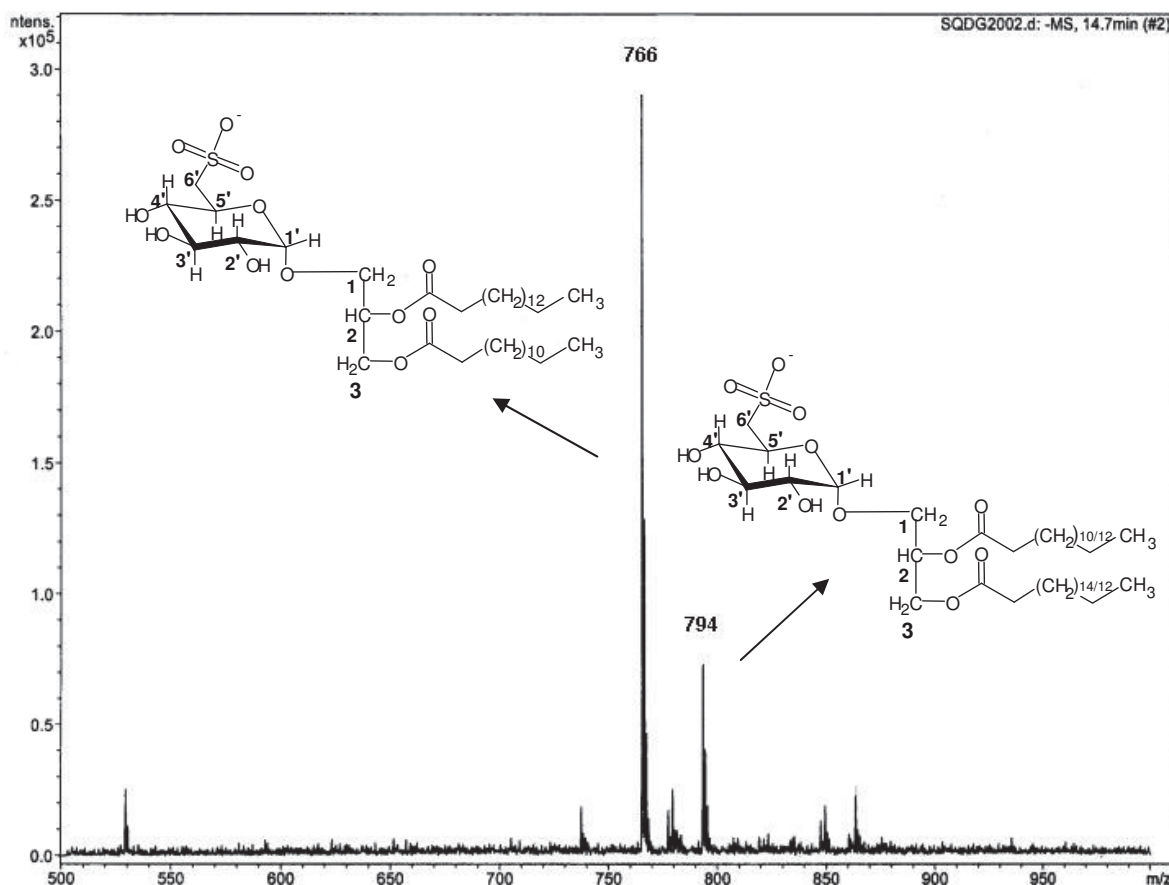
Apesar da estrutura de SQDG apresentar uma unidade sulfoquinovosil, apenas os dados obtidos por ESI-MS e CCD não confirmam esta estrutura, mostrando apenas presença de uma unidade sulfodesoxihexosil, restando assim dúvidas quando sua configuração hidroxílica, que foi caracterizada por análises de RMN, como segue:

HMQC, COSY e TOCSY foram realizados na fração EL1AF8 e comparados com os disponíveis na literatura (SASSAKI et al., 2001c, d). A completa conectividade dada pelo experimento de TOCSY (Figuras 10 e 11B e C, pg 56 e 57), com as correlações de cada próton dadas pelo experimento de COSY, ocorreu de H-2' a H-6', o que demonstra prótons *vic*-diaxiais de H-2' a H-5', e H-6', confirmando assim a configuração hidroxílica para uma unidade de quinovose (6-desoxi-glucose).

HMQC (Figura 11A, pg 57) confirmou a presença da unidade sulfodesoxihexosil com sinais de  $^{13}C/^1H$  em  $\delta$  55.6/2.69 e 55.6/3.05 (C-6/H-6<sup>a</sup> e H-6<sup>b</sup>). O sinal  $^{13}C/^1H$  em  $\delta$  99.4/4.68 (C-1/H-1) foi consistente para uma configuração  $\alpha$ -glicopiranosídica.

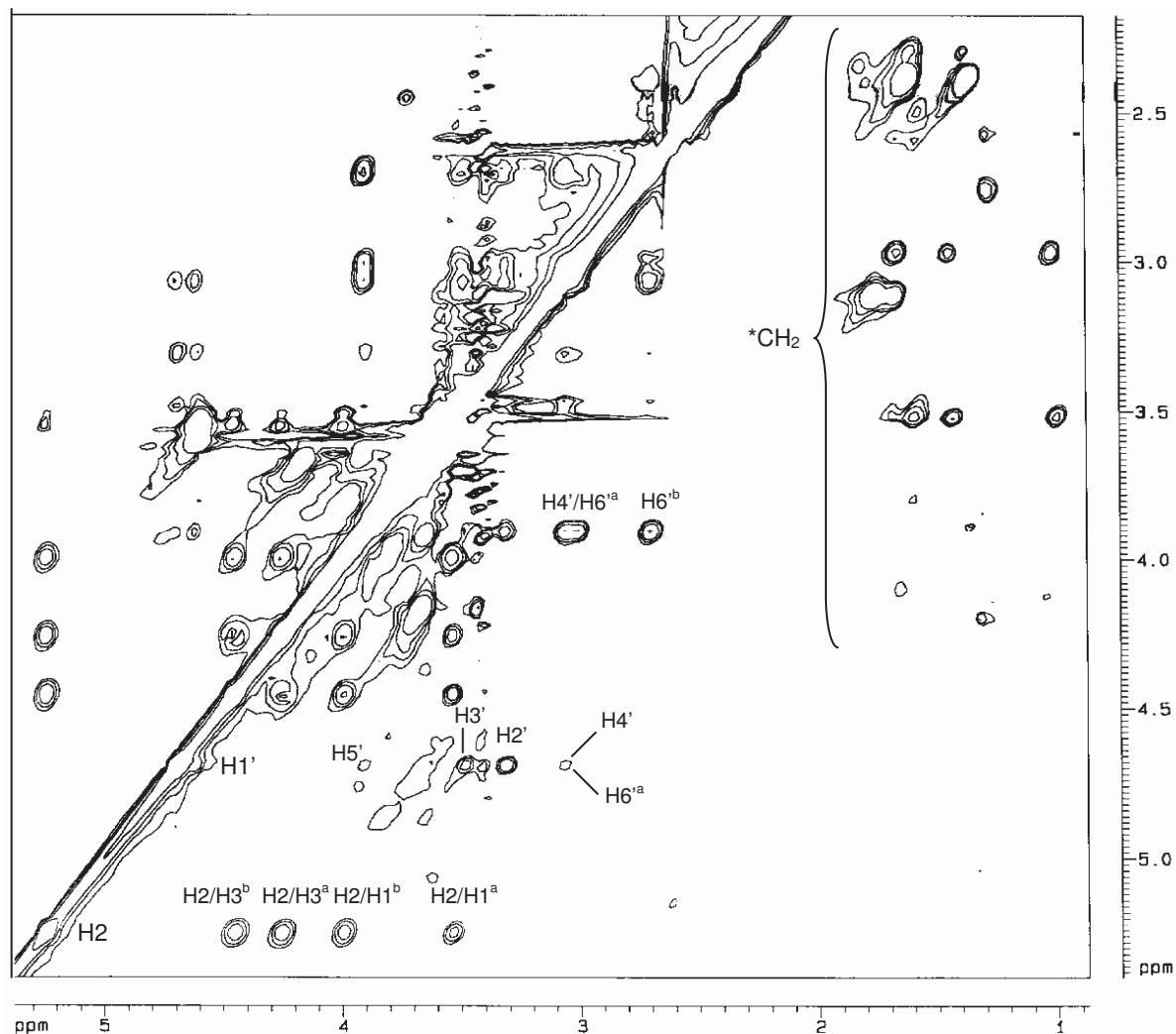
O espectro de HMQC continha sinais da unidade de glicerol em  $\delta$  70.8/5.21 (C-2/H-2), 66.0/3.53 e 3.98 (C-1/H-1<sup>a</sup> e H-1<sup>b</sup>), e 63.7/4.24 e 4.44 (C-3/H-3<sup>a</sup> e H-3<sup>b</sup>), assinalados pelos experimentos de COSY-TOCSY. O espectro de ROESY confirmou que o sinal de H-1' da unidade de quinovose apresentava correlação com os sinais H1<sup>a</sup> e H1<sup>b</sup> em  $\delta$  3.53 e 3.98, correspondendo ao C-1 da unidade de glicerol. O completo assinalamento de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C está mostrado na Tabela 07 (pg 62).

**FIGURA 09 – ESPECTRO DE ESI-MS DA FRAÇÃO EL1AF8 (SQDG)**



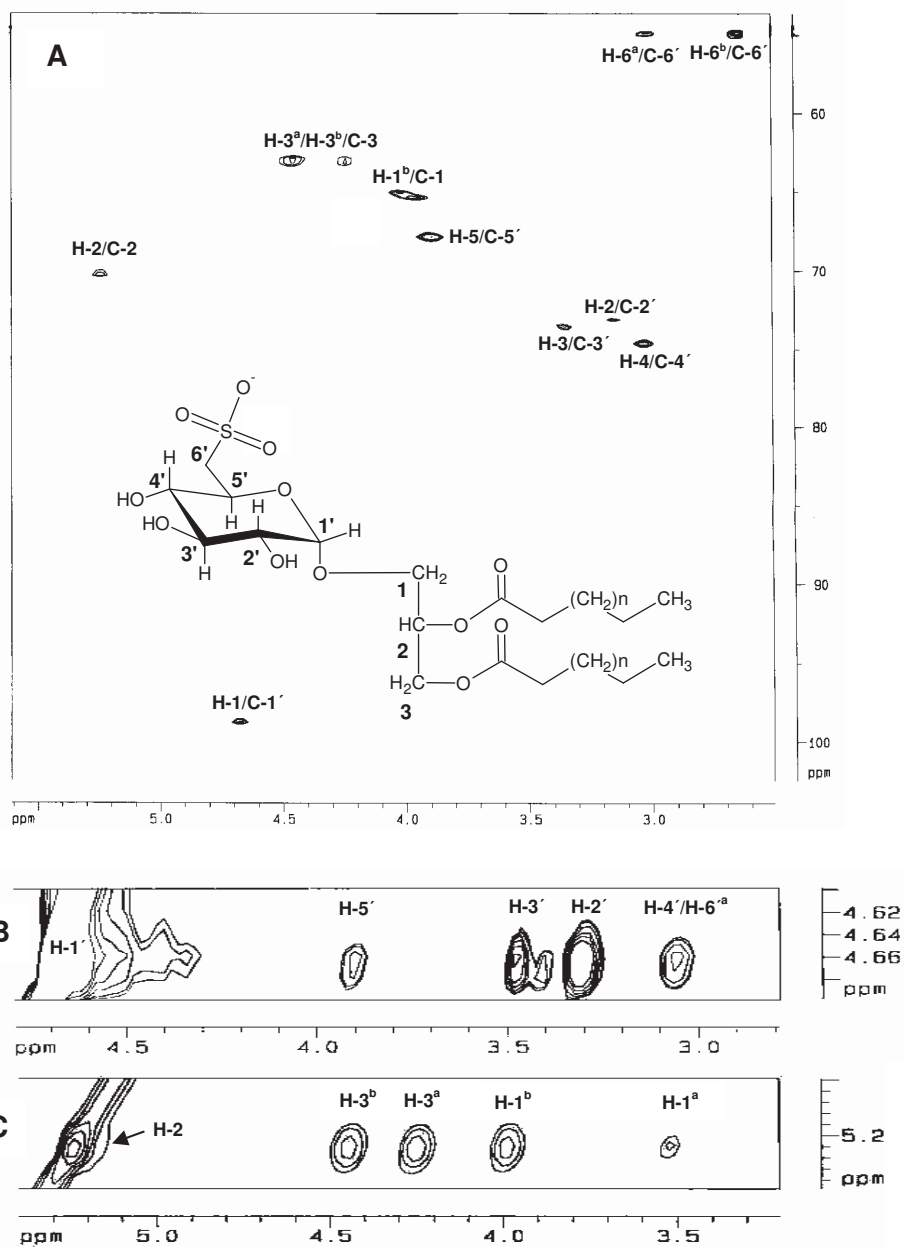
Os íons moleculares [M]<sup>-</sup> confirmam a presença de uma unidade sulfodesoxihexosil e mostram que a unidade de glicerol está esterificada pela seguinte combinação de ácidos graxos: C<sub>14:0</sub> + C<sub>16:0</sub> dando  $m/z$  766 e C<sub>14:0</sub> + C<sub>18:0</sub> ou C<sub>16:0</sub> + C<sub>16:0</sub> dando  $m/z$  794.

FIGURA 10 – ESPECTRO PARCIAL DE RMN 2D  $^1\text{H}$  (TOCSY) DO SQDG



Espectro de 2D RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$  – TOCSY da fração EL1AF8 em  $\text{Me}_2\text{SO}_d_6$ , os sinais  $\text{H}_2$ ,  $\text{H}_3^b$ ,  $\text{H}_3^a$ ,  $\text{H}_1^b$ ,  $\text{H}_1^a$  são referentes à unidade de glicerol e  $\text{H}_1'$ ,  $\text{H}_2'$ ,  $\text{H}_3'$ ,  $\text{H}_4'$ ,  $\text{H}_6'^a$  e  $\text{H}_6'^b$  referentes à unidade de sulfoquinovose.  $^*\text{CH}_2$  refere-se aos sinais de lipídeos. Os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) estão mostrados na Tabela 07 (p. 62).

FIGURA 11 – ESPECTROS PARCIAIS DE RMN 2D (HMQC E TOCSY) DO SQDG.

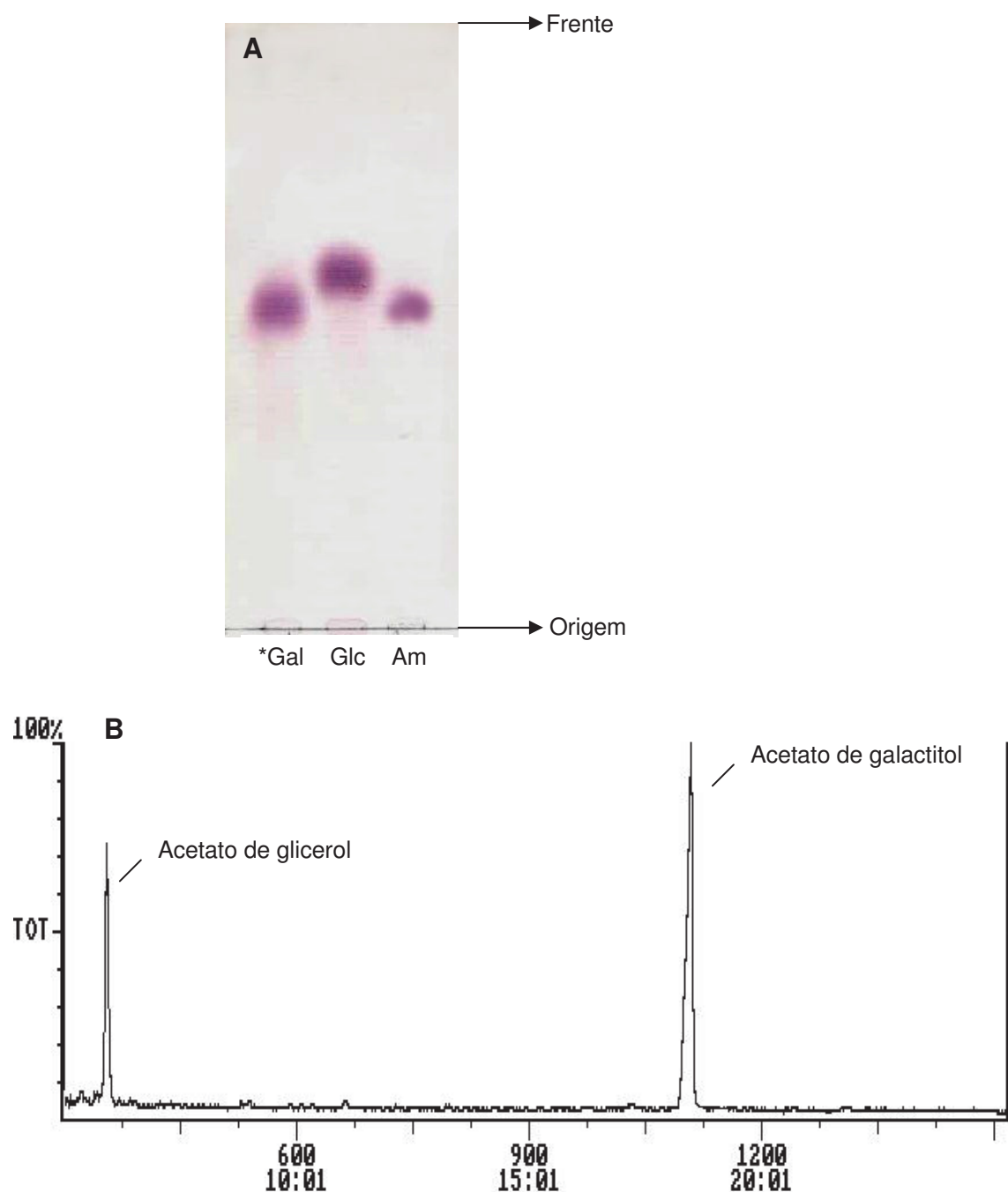


Espectro parcial de HMQC (A) mostrando que o sinal de  $^{13}\text{C}$  em  $\delta$  55.6 corresponde ao  $\text{CH}_2$ -6 ligado diretamente a um átomo de enxofre, apresentando correlação com sinais de H-6 em  $\delta$  3.05a e 2.69b. Espectro parcial de TOCSY mostrando correlações entre os prótons das unidades sufoquinovosil (B) e glicerol (C) respectivamente.

#### 4.7.5 Determinação da estrutura do MGD

Após hidrólise ácida do glicolípido presente na fração EL1OF5 a composição monossacarídica foi analisada por CG-EM na forma de alditol acetato, onde foi encontrado galactose e glicerol em uma razão molar similar, 1:1 (Figuras 12A e B, pg 59). Esta fração foi submetida ao mesmo conjunto de experimentos de RMN (HMQC, TOCSY, COSY e ROESY) como o realizado na fração EL1AF8. O experimento bidimensional de HMQC (Figura 14A, pg 61) mostrou uma única unidade de galactose piranosídica (Gal $\beta$ ) com uma configuração anomérica do tipo  $\beta$ , mostrado pela correlação  $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ -1 em  $\delta$  103.4/4.09. Esta configuração foi confirmada pelo espectro de próton ( $^1\text{H}$ ) o qual apresentou um acoplamento de H1 a H2 de  $J = 8,5$  Hz. O espectro de HMQC também mostrou sinais dupletes de  $\text{CH}_2$  na região de carboidrato em  $\delta$  3.76/62.1, que corresponde ao C-6' da unidade de  $\beta$ -Gal $\beta$  e aqueles em  $\delta$  3.56<sup>a</sup>; 3.73<sup>b</sup>/67.7, 5.12/69.9 e 4.025<sup>a</sup>; 4.205<sup>b</sup>/62.1 sendo respectivamente do C-1 (deslocamento para campo baixo), C-2, e C-3 da unidade de glicerol esterificada por ácidos graxos. O C-6' da unidade de  $\beta$ -Gal $\beta$  e o C-3 do glicerol foram resolvidos pela correlação usando COSY e TOCSY (Figura 13 e 14B, pg 60 e 61). O experimento de ROESY, como descrito para o glicolípido EL1AF8 apresentou correlação entre o H-1 da unidade de  $\beta$ -Gal $\beta$  com os H-1<sup>a</sup> e H-1<sup>b</sup> da unidade de glicerol. A presença de ácidos graxos foi evidenciada pelos sinais em  $\delta$  14.4 ( $\text{CH}_3$ ), sinais de  $\delta$  23.3 a 35.0 de  $\text{CH}_2$  com um sinal predominante em  $\delta$  30.3 e duplas ligações dos ácidos graxos foram encontrados em  $\delta$  5.40/126.5 e 5.44/127.0 (Tabela 07, pg 62).

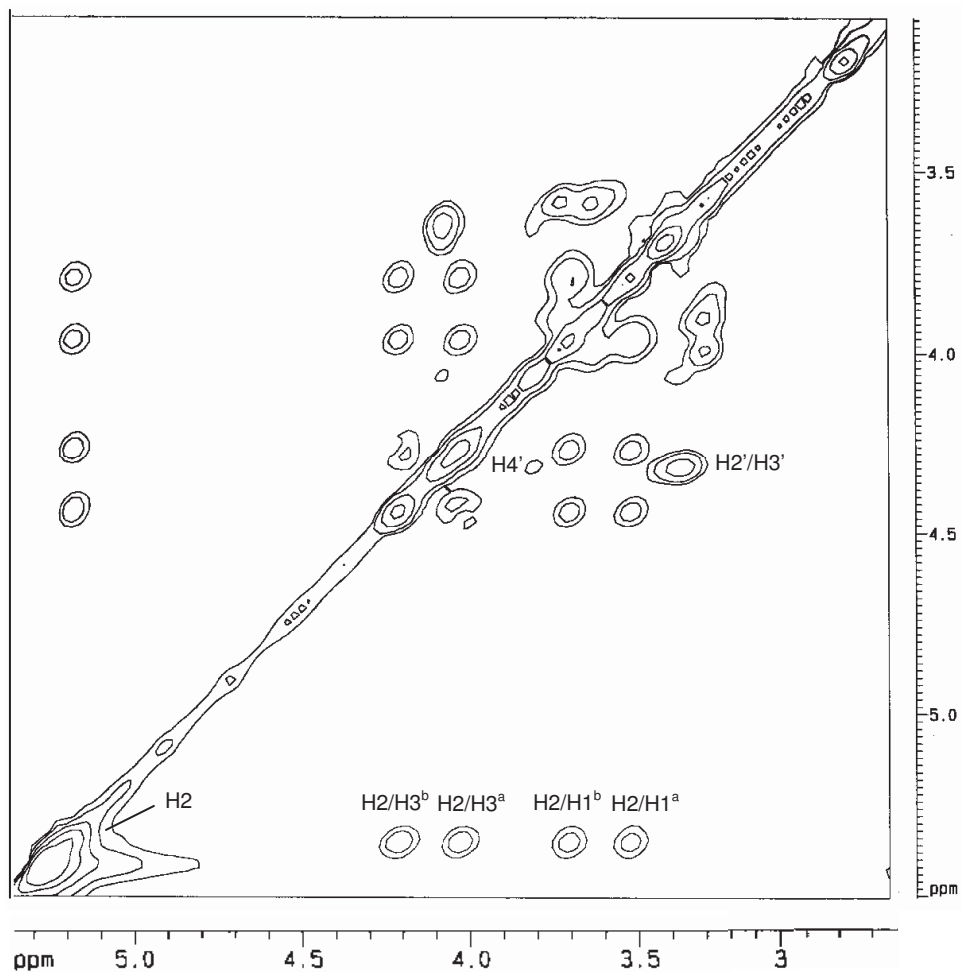
**FIGURA 12** – ANÁLISE POR CCD E CG-EM APÓS HIDRÓLISE DO MGD



Para determinação do componente monossacarídico a fração EL1OF5 foi hidrolisada com TFA 2M por 8 h, evaporada e analisada por CCD (A) com EtOAc-*n*-PrOH-HOAc-H<sub>2</sub>O (4:2:2:1 v/v) como solvente, a visualização feita com orcinol-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> apresentou uma banda positiva com R<sub>f</sub> (0,54) similar ao da galactose. O resultado foi confirmado por CG-EM (B) após redução/acetilação, mostrando além do acetato de galactitol a presença do acetato de glicerol.

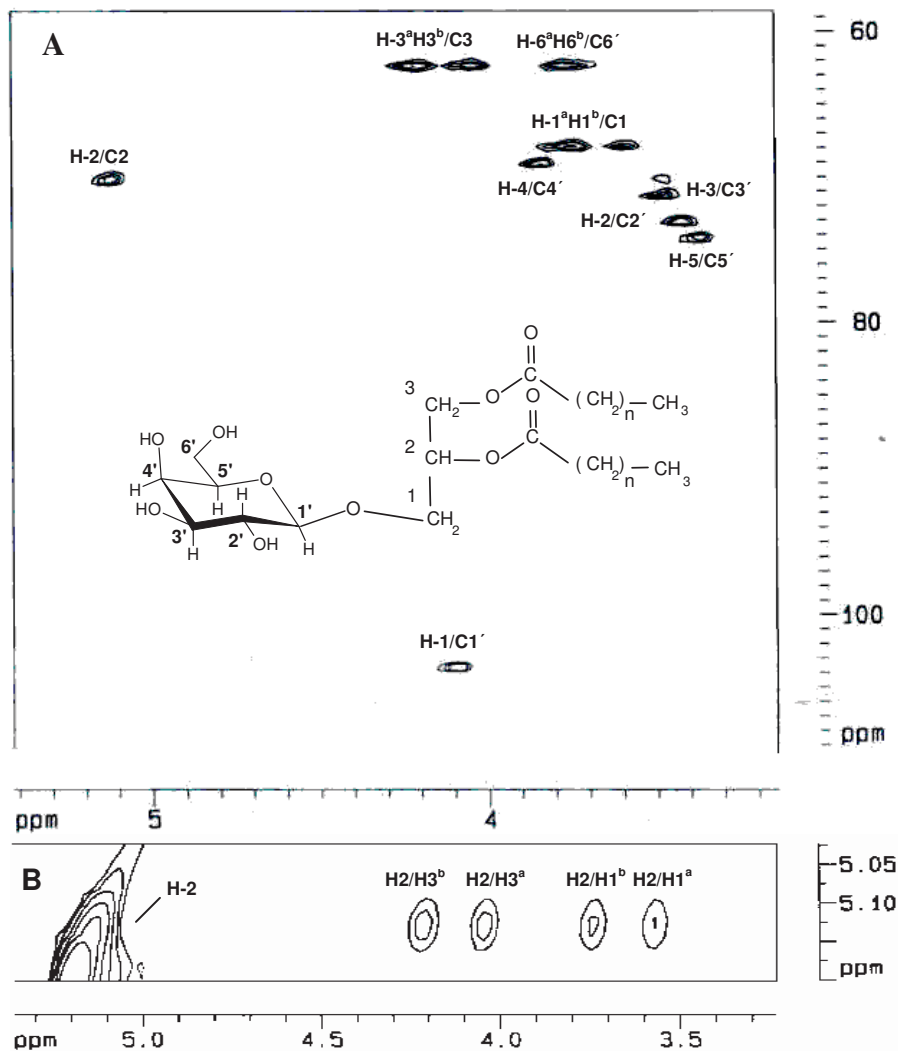
\* Gal – Galactose; Glc – Glucose; Am – amostra ( fração EL1OF5).

**FIGURA 13** – ESPECTRO PARCIAL DE RMN 2D  $^1\text{H}$  (TOCSY) DO MGD



Espectro de 2D RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$  – TOCSY da fração EL1OF5 em  $\text{CDCl}_3$ , os sinais dos acoplamentos da unidade de glicerol (H2, H3<sup>b</sup>, H3<sup>a</sup>, H1<sup>b</sup>, H1<sup>a</sup>). A unidade de  $\beta$ -galactopiranosose apresentou alguns acoplamentos, H4', H2'/H3'. Os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) estão mostrados na Tabela 07 (pg 62).

FIGURA 14 – ESPECTROS PARCIAIS DE 2D RMN (HMQC E TOCSY) DO MGD.



Espectro parcial de HMQC (A) mostrando a correlação em  $\delta$  103.4 e 4.087 ( $^{13}\text{C}$ ,  $^1\text{H}$  respectivamente)  $J_{\text{H1-H2}} = 8.5$  Hz indicando uma configuração  $\beta$ -galactopiranosídica. (B) Espectro parcial de TOCSY da unidade de glicerol ligada ao MGD. As correlações de H-2 são observados em  $\delta$  3.56 e  $\delta$  3.73 correspondem ao H-1<sup>a</sup> H1<sup>b</sup>,  $\delta$  4.025 e  $\delta$  4.205 ao H-3<sup>a</sup> H3<sup>b</sup> respectivamente.

**TABELA 07.** DADOS ESPECTROSCÓPICOS DE RMN DE  $^1\text{H}$  E  $^{13}\text{C}$  RMN DOS GLICOLIPÍDEOS

Carbono	SQDG		MGD	
	$\delta$ $^1\text{H}$	$\delta$ $^{13}\text{C}$	$\delta$ $^1\text{H}$	$\delta$ $^{13}\text{C}$
C-1'	4.68 <sup>d</sup>	99.4	4.09 <sup>d</sup>	103.4
C-2'	3.33	73.1	3.41	72.9
C-3'	3.48	73.9	3.45	71.1
C-4'	3.06	75.3	3.83	68.8
C-5'	3.90	69.7	3.55	74.0
C-6'	3.05 <sup>a</sup>	55.6	3.76 <sup>a, b</sup>	62.1
	2.69 <sup>b</sup>			
C-1, Gli	3.53 <sup>ad</sup>	66.0	3.56 <sup>ad</sup>	67.7
	3.98 <sup>bd</sup>		3.73 <sup>bd</sup>	
C-2, Gli	5.21	70.8	5.12	69.9
C-3, Gli	4.24 <sup>a</sup>	63.7	4.025 <sup>a</sup>	62.1
	4.44 <sup>b</sup>		4.205 <sup>b</sup>	
CH <sub>2</sub> <sup>c</sup>	1.1-2.3	22.7-34.6	1.1-2.3	23.3-35.0
CH=CH <sup>c</sup>	-	-	5.40/5.44	126.5/127.0
CH <sub>3</sub> <sup>c</sup>	0.85	14.4	0.85	14.4

<sup>a, b</sup> Deslocamentos químicos de prótons ligados diretamente ao núcleo de carbono.

<sup>c</sup> Sinais de lipídeos. <sup>d</sup> Correlacionamentos obtidos por ROESY.

Os valores de  $\delta$  são dados em p.p.m.

#### 4.8 ANÁLISE DO POLISSACARÍDEO

O polissacarídeo purificado ALPESD mostrou-se composto exclusivamente por glucose e foi submetido à análise de GPC para avaliar sua homogeneidade. Um pico com  $M_w$  377.0 kD e  $dn/dc$  0.135 foi obtido correspondendo a uma molécula com alto grau de polidispersão (Figuras 15 A e B, pg 64).

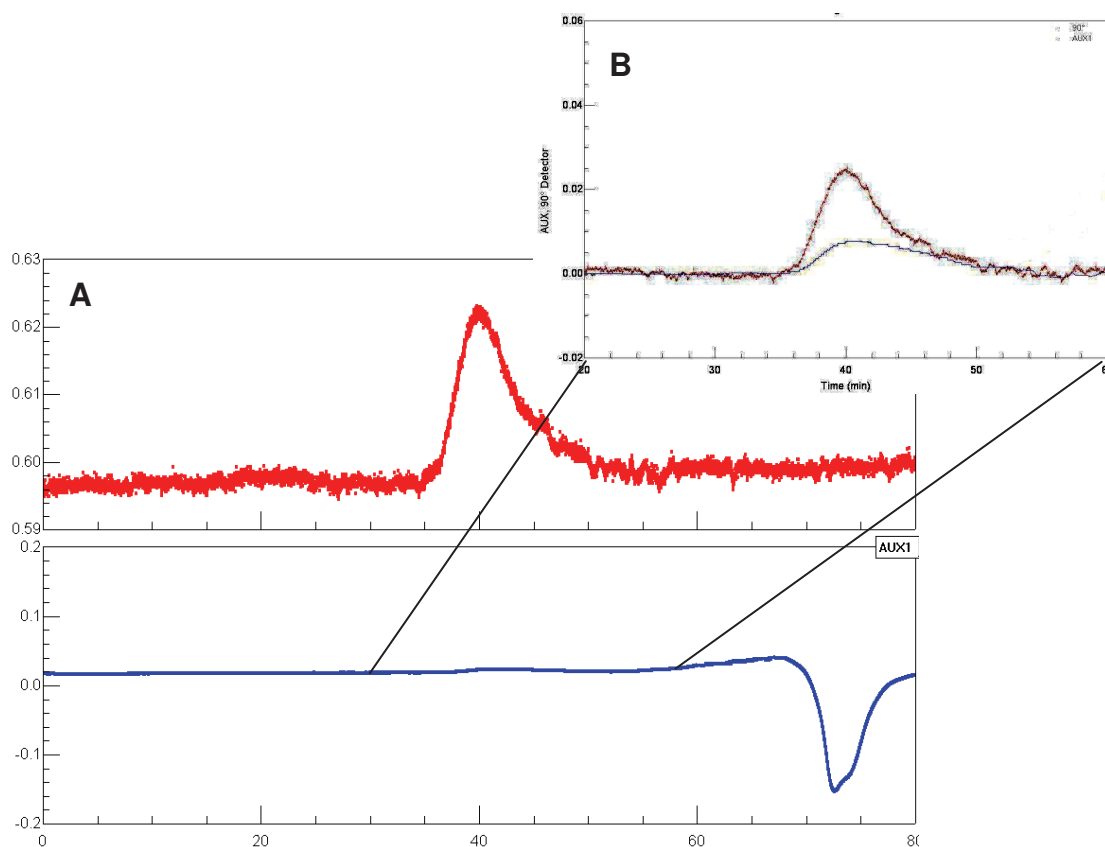
Análises por CG-EM dos derivados alditóis acetatos parcialmente *O*-metilados confirmaram a presença de uma glucana 8% ramificada em C-6, através da formação dos derivados 2,3,4,6-Me<sub>4</sub>Glc (8%), 2,3,6-Me<sub>3</sub>Glc (84%) e 2,3-Me<sub>2</sub>Glc (8%), resultado consistente com a estrutura esperada para o glicogênio.

O polissacarídeo foi examinado com uma solução de KI<sub>3</sub> dando uma coloração azul, que apresentou absorvância entre 400 e 800 nm ( $\lambda_{max}$  em 560 nm). Painter (1983) mostrou em sua revisão de polissacarídeos de algas, que o material de reserva nutricional de algas das Divisões Cyanophyta e Rhodophyta trata-se de glicogênio (também chamado de *Floridean starch* ou *Floridean glycogen*), o que pode ser uma possibilidade para Dinoflagelados. Embora o perfil da curva de absorvância da amostra, no teste com lugol, tenha sido muito similar à obtida para o amido de milho (Figura 16, pg 65), sendo maior que a encontrada para glicogênio de origem animal, o resultado de metilação apresentou uma glucana com um número de ramificações maior do que a esperada para a amilopectina. Este resultado pode ser atribuído ao glicogênio/amido envolvido no metabolismo da alga, uma vez que é similar àqueles encontrados para glicogênio sintetizado por Rhodophyta (PAINTER, 1983).

Sinais característicos de glicogênio/amido também foram obtidos por análise de RMN de <sup>13</sup>C, o qual mostra sinais em  $\delta$  99.4 (C-1), 78.8 (C-4, *O*-substituído) e um

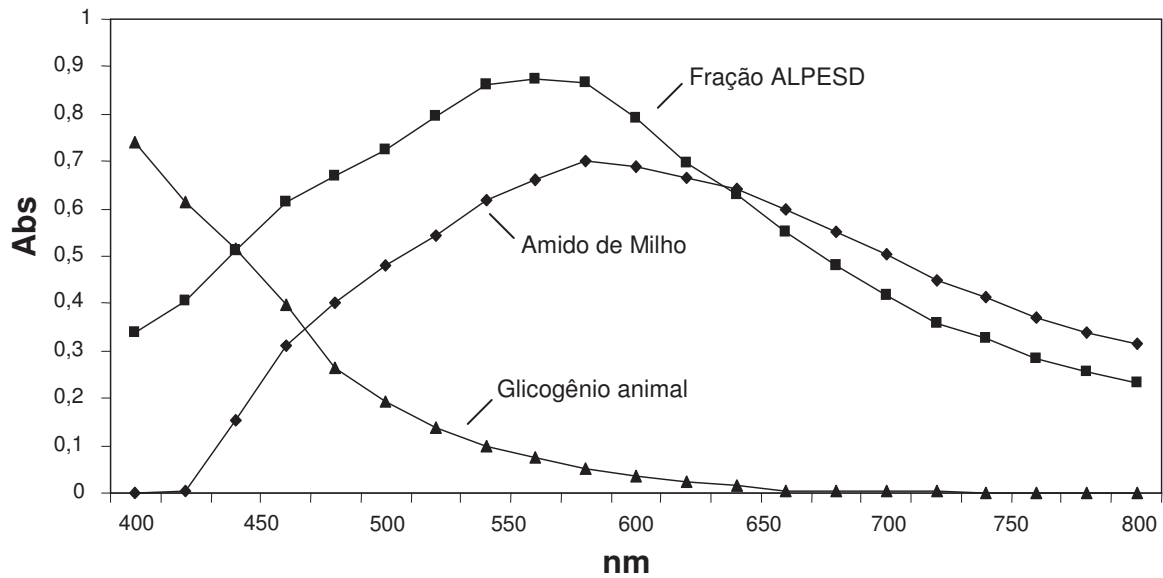
sinal em  $\delta$  60.5 correspondendo ao C-6 não *O*-substituído. A presença de sinais menores como em  $\delta$  70.2 foi atribuído ao C-6 *O*-substituído presente na cadeia principal, e em  $\delta$  61.0 atribuído C-6 não *O*-substituído da unidade de  $\alpha$ -glucopiranoose ( $\alpha$ -Glc $p$ ) presente na ramificação que está diretamente ligado no C-6 da cadeia principal. Os resultados da análise de RMN de  $^{13}\text{C}$  e de metilação são consistentes com a presença de glicogênio (Figura 17, pg 66).

**FIGURA 15 – ANÁLISE DE GPC DA FRAÇÃO ALPESD**



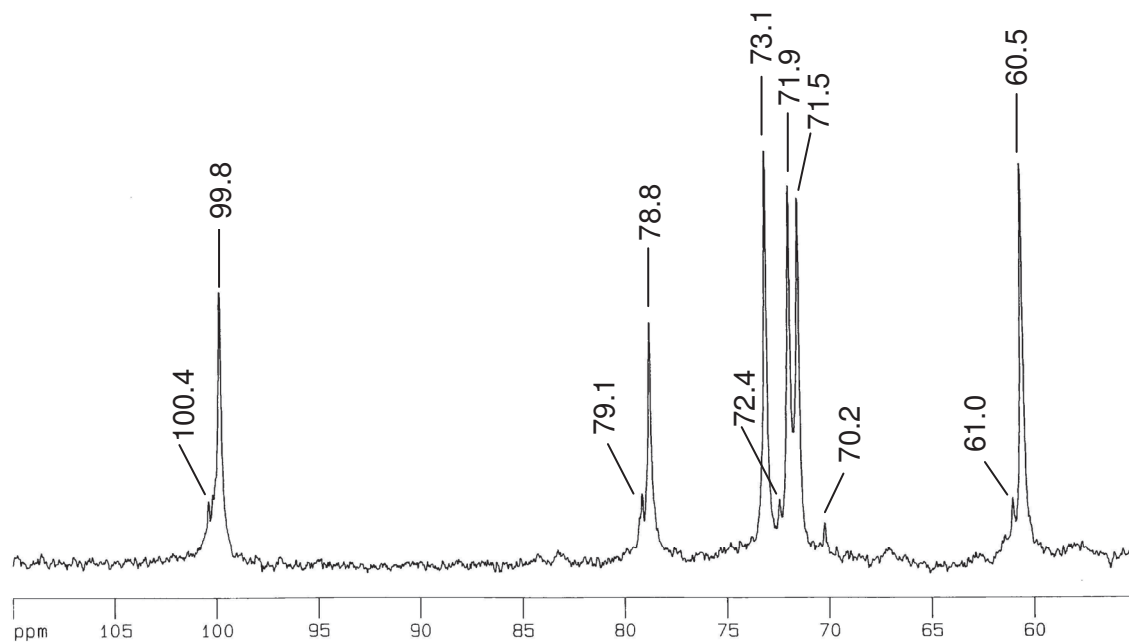
(A) Cromatograma obtido por gel-permeação mostrando apenas um pico no detector de espalhamento de luz (vermelho). Aparentemente nenhum pico foi detectado pelo índice de refração (azul), devido da pouca solubilidade da amostra. (B) Sobreposição dos cromatogramas obtidos pelos dois detectores onde pode ser observado o pico no detector de índice de refração. O alargamento do pico mostra uma molécula polidispersa.

**FIGURA 16** – CURVA DE ABSORBÂNCIA DA FRAÇÃO ALPESD-KI<sub>3</sub>



Perfil de absorvância da fração ALPESD ( —■— ), do amido de milho ( —◆— ) e do glicogênio de coelho ( —▲— ) examinados no espectro visível (400 – 800 nm). As amostras foram diluídas em H<sub>2</sub>O (2 mg/ml) e cinco gotas de uma solução de KI<sub>3</sub> foram adicionadas, formando um produto de coloração azul para a fração ALPESD e para o amido e uma coloração marrom-alaranjada clara para o glicogênio.

FIGURA 17 – ESPECTRO DE  $^{13}\text{C}$  RMN DA FRAÇÃO ALPESD



A fração ALPESD foi solubilizada em  $\text{Me}_2\text{SO}-d_6$  e a análise foi realizada à  $70^\circ\text{C}$ . Os principais sinais são de unidades de  $\alpha\text{-GlcP}$  com ligações (1 $\rightarrow$ 4) e os menores são de unidades de C-6 terminal não redutor ( $\delta$  61.0) e C6, O-substituído ( $\delta$  70.2).

## **5. CONCLUSÕES**

---

- A determinação da composição de ácidos graxos se mostrou como uma importante ferramenta no estudo da cifomedusa *Phyllorhiza punctata*, especialmente por se tratar de um organismo que vive em simbiose com microalgas.
- O ácido graxo 4, 7, 10, 13, 16, 19 docosahexaenóico (C<sub>22:6ω3</sub>) é considerado como biomarcador para dinoflagelados (GRAEVE et al., 1994; ZHUKOVA e AIZDAICHER, 1995) e sua presença na *P. punctata* pode ser atribuída ao metabolismo da alga.
- O solvente CHCl<sub>3</sub>-MeOH-EtOH (1:1:1 v/v) mostrou-se bastante eficiente na extração de glicolípídeos, e o particionamento realizado entre CHCl<sub>3</sub>-H<sub>2</sub>O foi eficaz na separação de glicolípídeos neutros dos carregados.
- Os glicolípídeos encontrados e estudados foram: O-β-D-Galp-(1'↔1)-2,3-diacil-D-glicerol, um monogalactosildiacylglicerídeo (MGD) e o α-quinovosil-6-sulfono-(1'↔1)-2,3-diacil-glicerol, um sulfoquinovosildiacylglicerídeo (SQDG). Estes glicolípídeos são encontrados em algas e plantas superiores (GARDNER, 1968; KATAOKA e MISAKI, 1983; CHAPMAN e BARBER, 1987) e o SQDG anteriormente descrito como sulfolípídeo de plantas (BENSON, 1963). A presença destes glicolípídeos também é atribuída à presença da micro-alga.
- O polissacarídeo estudado apresentou características semelhantes ao do glicogênio (8% ramificado) por análise metilação, porém quando testado com uma solução de lugol apresentou coloração e curva de absorbância no espectro visível semelhante ao do amido e diferente do glicogênio de origem animal. Glicogênio florideano de micro-algas da Divisão Rhodophyta apresenta esta característica (PAINTER, 1983).

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

ARAI, M. N. A **Functional Biology of Scyphozoa**, ed.1 Chapman & Hall, London, 1997.

BARNES, R. D., **Zoologia dos Invertebrados**. Quarta ed., Editora Rocca Ltda. 1990.

BENSON, A. A. The plant sulpholipid. **Adv. Lipid Res.**, v. 1 p. 387-394, 1963.

BLANQUET, R. S.; PHELAN, M. A. An unusual blue mesogleal protein from the mangrove jellyfish *Cassiopea xamachana*. **Mar. Biol.**, v. 94, p. 423-430, 1987.

BLANQUET, R. S.; Riordan, G. P. An ultrastructural study of the subumbrellar musculature and desmosomal complexes of *Cassiopea xamachana* (Cnidaria: Scyphozoa). **Trans. Am. Microsc. Soc.**, v. 100, p. 109–119, 1981.

CHAPMAN, D.; BARBER, J. Polar lipids of chloroplast membranes. **Methods Enzymol.**, v. 148, p. 294-319, 1987.

CHAPMAN, D. M. Reextension mechanism of a scyphistoma's tentacle. **Can. J. Zool.**, v. 48, p. 931-943, 1970.

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

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Anal. Chem.**, Washington, v. 28, n. 3, p. 350-356, 1956.

FREUDENTHAL, H. D. *Symbiodinium* gen. nov. and *Symbiodinium microadriaticum* sp. nov., a zooxantella: taxonomy, life cycle, and morphology. **J. Protozool.**, v. 9, p. 45-52, 1962.

GALIL, B. S.; SPANIER, E.; FERGUSON, W. W. The scyphomedusae of the Mediterranean coast of Israel, including two lessepsian migrants new to the Mediterranean. **Zoologische Medelingen**, v. 64, p. 95-105, 1990.

GARDNER, H. W. Preparative isolation of monogalactosyl and digalactosyl diglycerides by thin-layer chromatography. **J. Lipid. Res.**, v. 9, p. 139-141, 1968.

GRAHAM, J. H.; HODGE, N. C.; MORTON, J. B. Fatty acid methyl ester profiles for characterization of Glomalean fungi and their endomycorrhizae. **Appl. Environmental Microbiol.**, v. 61, 1, p. 58-64, 1995.

GRAHAM, W. M.; MARTIN, D. L.; PERRY, H. M.; FELDER, D. L. Ecological and economic implications of a new tropical jellyfish in the northern Gulf of Mexico, American Society of Limnology and Oceanography, **Aquatic Sciences Meeting**, Albuquerque, USA, 2001.

GRAEVE, M.; KATTNER, G.; HAGEN, W. Diet-induced changes in the fatty acid composition of Arctic herbivorous copepods: experimental evidence of trophic markers. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.**, v. 182, p. 97-110, 1994.

JANSSON, P. E.; KENNE, L.; LIEDGREN, H.; LINDBERG, B.; LÖNNGREN, J. A practical guide to the methylation analysis of carbohydrates. **J. Chem. Commun., Univ. of Stockholm**, v. 8, p. 1-70, 1976.

KARIOTOGLOU, D. M.; MASTRONICOLIS, S. K. Sphingophosphonolipids, phospholipids, and fatty acids from Aegean jellyfish *Aurelia aurita*. **Lipids**, v. 36, p. 1255-1264, 2001.

KARIOTOGLOU, D. M.; MASTRONICOLIS, S. K. Sphingophosphonolipid molecular species from edible mollusks and a jellyfish. **Comp. Biochem. Phys. B**, v. 136, p. 27-44, 2003.

KATAOKA, N.; MISAKI, A. Glycolipids isolated from *Spirulina maxima*: structure and fatty acid composition. **Agric. Biol. Chem.**, v. 47, p. 2349-2355, 1983.

KIMURA, S.; MIURA, S.; PARK, Y. H. Collagen as the edible component of jellyfish (*Stomolophus nomurai*). **J. Food Sci.**, v. 48, p. 1758-1760, 1983.

LARSON, R. J.; ARNESON, A. C. Two medusae new to the coast of California: *Carybdea marsupialis* (Linnaeus, 1758), a cubomedusa and *Phyllorhiza punctata* von Lendenfeld, 1884, a rhizostome scyphomedusa. **Bull. Southern California Acad. of Sci.**, v. 89, p. 130-136, 1990.

LOEBLICH, A. R.; SHERLEY, J. L. Observations on the theca of the motile phase of free-living and symbiotic isolates of *Zooxanthella microadriatica* Freudenthal comb. nov. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, v. 59, p. 195-205, 1979.

MIURA, S.; KIMURA, S. Jellyfish mesoglea collagen: characterization of molecules as  $\alpha 1 \alpha 2 \alpha 3$  heterotrimers. **J. Biol. Chem.**, v. 260, p. 15352-15356, 1985.

MORRISON, I. M. Carbohydrate Analysis: A Practical Approach. In: Chaplin, M. F.; Kennedy, J. F. (eds.), **IRL-PRESS**, Oxford, p. 205-221, 1986.

MU, H.; WÉSEN, C.; SUNDIN, P. Halogenated fatty acids – Formation and occurrence in lipids. **Trends Anal. Chem.**, v. 16, p. 266-273, 1997.

MUSCATINE, L. Glycerol excretion by symbiotic algae from corals and *Tridacna* and its control by the host. **Science**, v. 156, p. 516-519, 1967.

NAKHEL, I. C.; MASTRONICOLIS, S. K.; MEIMAROGLOU, S.M. Phospho- and phosphonolipids of the Aegean pelagic scyphomedusa *Pelagia noctiluca*. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 958, p. 300-307, 1998.

PAINTER, T. J. Algal Polysaccharides. In: Aspinall, G. (ed.). **The Polysaccharides**, v. 2, p. 195-285, Academic Press, New York. 1983.

PAPINA, M.; MEZIANE, T.; VAN WOESIK, R. Symbiotic zooxanthellae provide the host-coral *Montipora digitata* with polyunsaturated fatty acids. **Comp. Biochem. Physiol. B**, v. 135, p. 533-537, 2003.

RIGBY, B. J.; HAFEY, M. Thermal properties of the collagen of jellyfish (*Aurelia coerulea*) and their relation to its thermal behaviour. **Australi. J. Biol. Sci.**, v. 25, p. 1361-1363, 1972.

SASSAKI, G. L. **Lipídeos de fungos liquenizados e caracterização estrutural de glicolipídeos de *Dictyonema glabratum***. Tese de Doutorado, Depto. Bioquímica e Biologia Molecular, UFPR, 2001a.

SASSAKI, G. L.; CRUZ, L. M.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Fatty acid composition of lipids present in selected lichenized fungi: a chemotyping study. **Lipids**, v. 36 (2), p. 167-174, 2001b.

SASSAKI, G. L.; GORIN, P. A. J.; TISCHER, C. A.; IACOMINI, M. Sulfonoglycolipids from the lichenized basidiomycete *Dictyonema glabratum*: isolation, NMR, and ESI-MS approaches. **Glycobiology**, v. 11, p. 345-351, 2001c.

SASSAKI, G. L.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Characterization of a *lyso*-galactolipid, C-2 or C-3 *O*-acyl trigalactosylglycerol isomers, obtained from the lichenized fungus *Dictyonema glabratum*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 194, p. 155-158, 2001d.

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. **Carbohydr. Res.**, v. 340, p. 731-739, 2005.

SASSAKI, G. L.; MACHADO, M. J.; TISCHER, C. A.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI M. Glycosyldiacylglycerolipids from the lichen *Dictyonema glabratum*, **J. Nat. Prod.** v. 62, p. 844-847, 1999.

SEBENS, K. P. The ecology of indeterminate growth in animals. **Annu Rev Ecol Syst.**, v. 18, p. 371-407, 1987.

SELVENDRAN, R. R.; MARCH, J. F.; RING, S. G. Determination of aldoses and uronic acid content of vegetable fibre. **Anal. Biochem.**, v. 96, p. 282-292, 1979.

SILVA, T. L.; SOUZA, E.; PEREIRA, P. T.; FERRÃO, A. M.; ROSEIRO, J. C. Cellular fatty acid profiles for the differentiation of *Penicillium* species. **FEMS Microbiol. Letters**, v. 164, p. 303-310, 1998

SKIPSKI, V. P. Thin layer chromatography of neutral glycolipids, **Methods Enzymol.**, v. 35, p. 396-425, 1985.

STAHL, P. D.; KLUG, M. C. Characterization and differentiation of filamentous fungi based on fatty acid composition, **Appl. Environmental Microbiol.**, v. 62, 11, p. 4136-4146, 1996.

STILLWAY, L. W. Nematocyst lipids of the Portuguese man-of-war *Physalia physalis*. **Comp. Biochem. Physiol. B**, v. 48, p. 35-38, 1974.

TRENCH, R. K. The physiology and biochemistry of zooxanthellae symbiotic with marine coelenterates: II Liberation of fixed  $^{14}\text{C}$  by zooxanthellae *in vitro*. **Proceedings of the Royal Soc. of London B Biol. Sci.**, v. 177, p. 237-250, 1971.

WHITE, R. H.; HAGER, L. P. Occurrence of fatty acid chlorohydrins in jellyfish lipids. **Biochemistry**, v. 16, p. 4944-4948, 1977.

WILKERSON, F. P.; KREMER, P. DIN, DON e  $\text{PO}_4$  flux by a medusa with algal symbionts. **Marine Ecology Progress Series**, v. 90, p. 237-250, 1992.

YONGE, C. M. The significance of the relationships between corals and zooxanthellae. **Nature**, v. 128, p. 309-310, 1931.

ZHUKOVA, N. V.; AIZDAICHER, N. A. Fatty acid composition of 15 species of marine microalgae. **Phytochemistry**, v. 39, p. 351-356, 1995.

ZHUKOVA, N. V.; TITLYANOV, E. A. Fatty acid variations in symbiotic dinoflagellates from Okinawan corals. **Phytochemistry**, v. 62, p.191-195, 2003.