

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JULIANE RIZZI

POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DOS POLISSACARÍDEOS DE
MICROALGAS MARINHAS

CURITIBA
2010

JULIANE RIZZI

POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DOS POLISSACARÍDEOS DE
MICROALGAS MARINHAS

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

Orientador: Prof. Dr. Miguel Daniel
Noseda

Co-orientadora: Prof^a. Maria Eugênia
Duarte Noseda

CURITIBA
2010

Orientador: Prof. Dr. Miguel Daniel Nosedá

Co-orientadora: Prof. Dr. Maria Eugênia Durate Nosedá

Colaboradora: Prof. Dr. Guilhermina Noleto

Dedico este trabalho à minha família e
a todos aqueles que um dia possam ler
e se interessar!

AGRADECIMENTOS

Agradeço com todo o carinho a todos que fizeram parte, direta ou indiretamente, do desenvolvimento deste trabalho.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Miguel Nosedá, pelo acolhimento em seu grupo de pesquisa, pelo apoio em todas as etapas do trabalho e por todo o conhecimento transmitido, pacientemente, por muitas vezes até altas horas da noite.

À minha co-orientadora Maria Eugênia Nosedá por toda sua ajuda na interpretação dos resultados, conselhos e por toda força transmitida.

À Prof. Guilhermina Noletto, colaboradora deste trabalho, pelos ensinamentos referentes à avaliação da atividade biológica.

Às amigas Mônica e Juliana, pelos vários macrófagos cultivados e por toda a ajuda nos testes de atividade biológica e análises estatísticas.

Aos queridos amigos do laboratório:

Luciana, que esteve comigo desde o início e que muito me ensinou, pelas conversas, pela companhia, pelos cafezinhos e momentos de descontração, obrigada!!

Camila, minha estagiária querida, pelas várias etapas da pesquisa que realizamos juntas, e por ser sempre tão prestativa!!

Luciano pelo apoio que sempre demonstrou!

E à mulherada que chegou recentemente e tornou tudo mais divertido: Sili, Ju, Tati, Fran, Taline e Rose, valeu pela força que vocês deram nos meses finais do trabalho!

Ao Prof. Miguel, Prof. Guilherme e Luciana pelas análises de RMN.

À Elisângela pelas análises de HPSEC e por todo o carinho com as amostras.

À Rosane pelas análises em GC-MS e GLC.

Agradeço especialmente à minha querida família, meus pais e meus irmãos, pelo apoio integral e incentivo em todos os momentos, pelo carinho, pelo amor e por tudo que vocês me proporcionam.

Ao meu namorado Rodrigo, pelo amor, pela dedicação, compreensão e companheirismo.

Aos amigos da Turma de Mestrado 2008, pelo ótimo convívio, nos primeiros e árduos meses de disciplinas e em todos os outros.

Às “amigas de fora”, e de sempre, Naty, Fer, Paula, Cami pelas conversas, mesmo sem entender muito bem o que se passava, e pelas várias horas de diversão.

Aos amigos “de Pontal”, Lizi, Má, Tami, Ale, Lua, Marcelo, Gabi, Flávio, Paula, que, de alguma forma, estiveram presentes em mais esta etapa. Saudades!

À coordenação do curso de Pós-graduação em Bioquímica e à secretária Marilza Lamour pelos auxílios prestados.

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

Ao oceano, novamente, por me inspirar.

À Vida e ao Ser a quem demovemos esta dádiva!!

Muito Obrigada!!!

"Se encontrássemos a água do mar somente em um lago pequeno e distante, químicos e biólogos sem dúvida a estudariam intensamente como o mais precioso dos líquidos".

Robert Miller – Oceanógrafo

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo isolar os polissacarídeos de três espécies de microalgas marinhas, determinar sua estrutura química e avaliar sua atividade biológica. As espécies estudadas, *Tetraselmis gracilis*, *Isochrysis galbana* e *Thalassiosira fluviatilis* pertencem a três diferentes divisões taxonômicas, Chlorophyta, Prymnesiophyta e Ochrophyta, respectivamente, e são cultiváveis em grande escala. Inicialmente, a biomassa microalgal das três espécies foi isolada do meio de cultivo através de centrifugação e liofilizada. Para obtenção dos polissacarídeos, as biomassas secas de *T. gracilis* e *I. galbana* foram submetidas a extrações aquosas e alcalinas (NaOH 0,5 M) seqüenciais, a 80 °C por 2 h. Já a diatomácea *T. fluviatilis* foi submetida à extração ácida (H₂SO₄ 0,05 M), a 60 °C por 10 min. As análises químicas e espectroscópicas para determinação da estrutura química, permitem inferir que os polímeros extraídos de *T. gracilis*, tanto por extração aquosa (TEQ) (10,7% de rendimento) como alcalina (TEL) (54,6% de rendimento) são constituídos por uma α -glucana (1 \rightarrow 4) ligada, com pontos de ramificação em C-6 a cada 5 unidades em TEQ e a cada 8 em TEL, caracterizando uma amilopectina. O extrato aquoso da espécie *I. galbana* (IAQ) apresentou maior rendimento (29,8%) e maior teor de carboidrato (70,9%), quando comparado ao alcalino (IAL) (6,7% de rendimento), com alto teor de proteína. A fim de purificar a amostra, IAQ foi submetido à ultrafiltração em membrana de 0,1 μ m, dando origem à fração IAQ-e (eluída) e IAQ-r (retida). A fração IAQ-e (75% de rendimento) apresentou-se homogênea, com massa molecular de 18,8 kDa. Análises desta fração permitiram identificar que a microalga *I. galbana* sintetiza uma β -glucana ramificada com cadeia principal formada por unidades de β -D-glucose (1 \rightarrow 6)-ligadas. Metade destas unidades está ramificada em C-3, tanto por unidades simples de β -glucose como por dissacarídeos β -(1 \rightarrow 3) ligados. A extração ácida da biomassa de *T. fluviatilis* deu origem à fração TAC (22,7% de rendimento). Este polissacarídeo foi dialisado em água Mili-Q e submetido à ultrafiltração em membrana de 0,1 μ m para obtenção de uma molécula homogênea, eluída, denominada TAC-e (79% de rendimento), com 11,7 kDa de massa molecular. Análises desta fração indicaram que *T. fluviatilis* sintetiza uma β -glucana (1 \rightarrow 3) ligada, com baixo grau de ramificação em C-6 (4,5%), por unidades simples de glucose, e pequena quantidade de unidades (1 \rightarrow 4) ligadas (4,6%). Os polissacarídeos foram testados quanto à sua atividade imunomodulatória, através da ativação da capacidade fagocítica em macrófagos RAW 264,7, incubados com leveduras. As α -glucanas (TEQ e TEL) não apresentaram aumento significativo na atividade fagocítica dos macrófagos, quando comparadas ao controle negativo. Porém, as β -glucanas (IAQ e TAC) aumentaram significativamente a capacidade fagocítica dos macrófagos, mesmo nas concentrações mais baixas (0,1 e 0,5 μ g.mL⁻¹, respectivamente). O polissacarídeo sintetizado pela diatomácea *T. fluviatilis* (TAC) apresentou maior ativação. Isto demonstra o potencial uso das β -glucanas extraídas de microalgas marinhas como modificadores de resposta biológica.

Palavras-chave: Microalgas marinhas, polissacarídeos, atividade imunomodulatória.

ABSTRACT

This study aimed to isolate the polysaccharides of three species of marine microalgae, to determine their chemical structure and evaluate its biological activity. The species studied, *Tetraselmis gracilis*, *Isochrysis galbana* and *Thalassiosira fluviatilis* belong to three different taxa, Chlorophyta, Prymnesiophyta and Ochrophyta, respectively, and are cultivated on a large scale. Initially, the microalgal biomass was isolated from the culture medium by centrifugation and lyophilized. To obtain the polysaccharides, the dry biomass of *T. gracilis* and *I. galbana* were submitted first to aqueous extractions and after to alkaline (NaOH 0.5 M), at 80 °C for 2 h. The diatom *T. fluviatilis* was subjected to acid extraction (0.05 M H₂SO₄), at 60 °C for 10 min. The chemical and spectroscopic analysis indicated that both the aqueous (TEQ) (10.7 % yield) and the alkaline (TEL) (54.6% yield) of *T. gracilis* are formed by α -glucan (1 \rightarrow 4) linked, characterized by amylopectin. The aqueous extract of the species *I. galbana* (IAQ) had the highest yield (29.8%) and the highest content of carbohydrates (70.9 %) when compared to alkaline (IAL) (6.7 % yield), with high protein content. In order to purify the sample, IAQ fraction was submitted to ultrafiltration through a 0.1 μ m cut-off membrane giving rise to the fractions IAQ-e (eluted) and IAQ-r (retained). Fraction IAQ-e (75% yield) appeared homogeneous with molecular weight of 18.8 kDa. Analysis of this fraction allowed to identify that the microalgae *I. galbana* synthesizes a β -glucan branched, with backbone formed by units of β -(1 \rightarrow 6)-linked. Half of these units are branched in C-3, by single units of glucose and by disaccharides β -(1 \rightarrow 3) linked. The acid extraction of the biomass of *T. fluviatilis* led to TAC fraction (22.7 % yield). This polymer was dialyzed in Milli-Q water and subjected to ultrafiltration through a 0.1 μ m cut-off membrane, to obtain a homogeneous molecule, eluted, called TAC-e (79 % yield) with 11.7 kDa of molecular weight. Analysis of this fraction indicated that *T. fluviatilis* synthesizes a β -glucan (1 \rightarrow 3) with low degree of branching at C-6 (4.5%) for single units of glucose and small amount of units (1 \rightarrow 4) linked in the main chain (4.6%). The polysaccharides were evaluated for their immunomodulatory activity through the activation of phagocytic capacity in macrophages RAW 264.7, incubated with yeast. The α -glucans (TEQ and TEL) showed no significant increase in phagocytic activity of macrophages, when compared to negative control. However, the β -glucan (IAQ and TAC) showed significantly increased the phagocytic capacity of macrophages. The polysaccharide synthesized by the diatom *T. fluviatilis* (TAC) showed greater activation. This demonstrates the potential use of β -glucans extracted from marine microalgae as biological response modifiers.

Key words: Marine microalga, polysaccharides, immunomodulatory activity.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Foto de <i>Tetraselmis sp.</i>	12
FIGURA 2. Foto de <i>Isochrysis galbana</i>	13
FIGURA 3. Foto de <i>Thalassiosira fluviatilis</i>	13
FIGURA 4. Curva de crescimento de <i>Tetraselmis gracilis</i>	26
FIGURA 5. Fluxograma das extrações de <i>Tetraselmis gracilis</i>	27
FIGURA 6. Perfil de eluição por HPSEC-MALLS da fração TEQ.	29
FIGURA 7. Perfil de eluição por HPSEC-MALLS da fração TEL.....	30
FIGURA 8. Perfil de eluição por HPSEC-MALLS da fração TEQ-gs	30
FIGURA 9. Perfil de eluição por HPSEC-MALLS da fração TEQ-r (a) e TEQ-e (b).....	31
FIGURA 10. Perfil de eluição por HPSEC-MALLS da fração TEL-gs.....	32
FIGURA 11. Perfil de eluição por HPSEC-MALLS das frações TEL-r (a) e TEL-e (b).....	33
FIGURA 12. Espectros de RMN de ¹³ C das frações TEQ (a) e TEL (b). Solvente D ₂ O, temperatura: 60°C.	34
FIGURA 13. Espectro de RMN de ¹³ C- DEPT da fração TEL. Solvente D ₂ O, temperatura: 60°C.....	35
FIGURA 14. RMN de ¹³ C (a) e estrutura (b) da amilopectina de acordo com DAIS e PERLIN (1982)	35
FIGURA 15. Espectro de correlação HSQC da α-D-glucana presente na fração TEL	36
FIGURA 16. Espectro de RMN de ¹³ C DEPT da fração TEL. Solvente Me ₂ SO-d ₆ , temperatura: 60°C.....	37
FIGURA 17. Estrutura proposta para os polissacarídeos sintetizados por <i>T. gracilis</i> (x = 5-8 unidades).	39
FIGURA 18. Fluxograma das extrações de <i>Isochrysis galbana</i>	41
FIGURA 19. Análise de homogeneidade do extrato aquoso (IAQ) (a) e alcalino (IAL) (b).	43
FIGURA 20. Perfil de eluição por HPSEC-MALLS da fração IAQ-e (a) e IAQ-r (b).....	45
FIGURA 21. Espectros de RMN de ¹³ C das frações IAQ (a), IAQ-e (b) e RMN DEPT da fração IAQ (c).	47
FIGURA 22. Espectro de RMN 2D HSQC da β-D-glucana presente na fração IAQ.....	48
FIGURA 23. Espectro de RMN de ¹³ C das frações IAQ-e (a), IAQ-s (b) e IAQ-s DEPT (c). Solvente D ₂ O, temperatura: 70 °C.....	51
FIGURA 24. Estrutura proposta para o polissacarídeo sintetizado por <i>I. galbana</i>	53
FIGURA 25. Fluxograma de extração dos polissacarídeos de <i>T. fluviatilis</i>	54
FIGURA 26. Perfil de eluição por HPSEC-MALLS da fração TAC	56
FIGURA 27. Perfil de eluição por HPSEC-MALLS da fração TAC-d.....	57
FIGURA 28. Perfil de eluição por HPSEC-MALLS da fração TAC-e	57
FIGURA 29. Espectro de RMN de ¹³ C (a) e RMN DEPT (b) da fração TAC. Solvente D ₂ O, temperatura: 40°C	59
FIGURA 30. Espectro de correlação HSQC da β-D-glucana da fração TAC... ..	60
FIGURA 31. Espectro de RNM de ¹³ C (a) e RMN-DEPT (b) da fração TAC-s. ..	63

FIGURA 32. Estrutura proposta para o polissacarídeo solúvel em água extraído de <i>T. fluviatilis</i>	63
FIGURA 33. Estrutura proposta para o polissacarídeo após degradação de Smith (TAC-s)	64
FIGURA 34. Macrófagos RAW 267.4 aderentes foram incubados por 24 horas na presença dos polissacarídeos TEQ (a), TEL (b), IAQ (c) e TAC (d) nas concentrações 2,5; 5; 10 e 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	67
FIGURA 35. Macrófagos RAW 267.4 aderentes foram incubados por 24 horas na presença dos polissacarídeos TEQ (a) e IAQ (b) nas concentrações 0,5 e 1,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	68
FIGURA 36. Fotos dos macrófagos aderentes em lamínulas de vidro incubados na presença de leveduras, processadas para microscopia óptica.	69
FIGURA 37. Atividade fagocítica caracterizada pela razão entre leveduras e macrófagos (eixo y).....	70

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Extratos alcalinos obtidos em diferentes condições.....	28
TABELA 2. Caracterização química das frações de <i>T. gracilis</i>	28
TABELA 3. Caracterização monossacarídica das frações de <i>T. gracilis</i>	29
TABELA 4. Deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C (δ) obtidos para a α -D-glucana presente na fração TEL em comparação com outros estudos .	37
TABELA 5. Análise de metilação dos polissacarídeos obtidos de <i>T. gracilis</i>	38
TABELA 6. Caracterização química das frações aquosas de <i>I. galbana</i>	46
TABELA 7. Caracterização monossacarídica das frações aquosas de <i>I. galbana</i>	46
TABELA 8. Assinalamentos de RMN de ^{13}C da fração IAQ solubilizada em $\text{Me}_2\text{SO}-d_6$ em comparação com outros estudos	49
TABELA 9. Análise de metilação da fração polissacarídica IAQ-e isolada de <i>Isochrysis galbana</i>	50
TABELA 10. Análise de metilação de fração polissacarídica submetida a degradação controlada de Smith IAQ-s	52
TABELA 11. Caracterização química das frações de <i>T. fluviatilis</i>	58
TABELA 12. Caracterização monossacarídica das frações de <i>T. fluviatilis</i>	58
TABELA 13. Deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C (δ) da β -D-glucana de TAC	61
TABELA 14. Assinalamentos de RMN de ^{13}C da fração TAC solubilizada em $\text{Me}_2\text{SO}-d_6$ em comparação com outros estudos.	61
TABELA 15. Análise de metilação da fração polissacarídica purificada TAC-e	62

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- δ – deslocamento químico (em ppm)
 α – denota anomeridade alfa
 β – denota anomeridade beta
BaCl₂ – Cloreto de Bário
BSA – soro albumina bovina
CHCl₃ – clorofórmio
CH₃OH – metanol
CLG – Cromatografia Líquida Gasosa
CG-EM – Cromatografia Líquida Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa
D₂O – água deuterada
DEPT: distortionless enhancement by polarization;
dn/dc – Variação do índice de refração em relação a concentração
ESI-MS – *electrospray-ionization mass spectrometry*
EtOH - etanol
FID – detector de ionização de chama
Glc - glucose
H₂SO₄ – Ácido sulfúrico
HCl – Ácido Clorídrico
HSQC – *Heteronuclear Multiple Quantum Correlation Spectroscopy*
HPSEC-MALLS – Cromatografia de Exclusão Estérica de Alta Resolução acoplada a detectores de Índice de Refração e Espalhamento de Luz
MEM – meio essencial mínimo de Eagle
Me₂SO-*d*₆ - Dimetilsulfóxido deuterado
NaBH₄ – boroidreto de sódio
NaIO₄ – metaperiodato de sódio
NaOH – Hidróxido de Sódio
ppm – partes por milhão
RMN ¹³C – Ressonância Magnética Nuclear - Carbono 13
RMN ¹H – Ressonância Magnética Nuclear - Hidrogênio
TFA – ácido trifluoracético
TNR – Terminal não redutor da cadeia polissacarídica
TRr – Terminal redutor da cadeia polissacarídica reduzido

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	2
2.1 MICROALGAS MARINHAS: ASPECTOS GERAIS	2
2.2 BIOTECNOLOGIA DE MICROALGAS	2
2.3 CLASSIFICAÇÃO DAS MICROALGAS.....	5
2.3.1 CHLOROPHYTA.....	6
2.3.2 PRYMNESIOPHYTA (HAPTOPHYTA)	7
2.3.3 OCHROPHYTA (=HETEROKONTOPHYTA)	8
2.4 POLISSACARÍDEOS DE MICROALGAS MARINHAS.....	9
2.5 GLUCANAS COMO MODIFICADORAS DE RESPOSTA BIOLÓGICA	10
2.6 ESPÉCIES DE MICROALGAS MARINHAS ESTUDADAS	12
2.6.1 <i>Microalga Tetraselmis gracilis</i>	12
2.6.2 <i>Microalga Isochrysis galbana</i>	12
2.6.3 <i>Microalga Thalassiosira fluviatilis</i>	13
3 JUSTIFICATIVA	14
4 OBJETIVOS	15
5 MATERIAIS E MÉTODOS	16
5.1 CULTIVO DAS MICROALGAS MARINHAS	16
5.2 ISOLAMENTO DAS CÉLULAS.....	16
5.3 EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS DE <i>TETRASELMIS GRACILIS</i> E <i>ISOCRYISIS GALBANA</i>	17
5.4 EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS DE <i>THALASSIOSIRA FLUVIATILIS</i>	17
5.5 PURIFICAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS	18
5.5.1 <i>Purificação dos Polissacarídeos por Congelamento e Degelo</i>	18
5.5.2 <i>Purificação dos Polissacarídeos por Diálise</i>	18
5.5.3 <i>Purificação dos Polissacarídeos por Ultrafiltração em membrana</i>	18
5.6 MÉTODOS ANALÍTICOS GERAIS.....	19
5.6.1 <i>Dosagem de Carboidratos Totais</i>	19
5.6.2 <i>Dosagens de Proteínas Totais</i>	19
5.6.3 <i>Dosagem de Lipídeos Totais</i>	19
5.6.4 <i>Dosagens de Grupamentos Sulfatos</i>	20
5.6.5 <i>Dosagem de Ácidos Urônicos</i>	20
5.7 HIDRÓLISE ÁCIDA TOTAL	20
5.8 METILAÇÃO	20
5.9 DEGRADAÇÃO CONTROLADA DE SMITH	21
5.10 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS	21
5.10.1 <i>Cromatografia Líquido-Gasosa (CLG)</i>	21
5.10.2 <i>Cromatografia Líquido-Gasosa acoplada à Espectroscopia de Massa (CG-EM)</i> ...	22
5.10.3 <i>Cromatografia de Gel Permeação (GPC - HPSEC-MALLS)</i>	22
5.11 MÉTODO ESPECTROSCÓPICO - RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR.....	23
5.12 TESTES DE ATIVIDADE BIOLÓGICA	23
5.12.1 <i>Obtenção dos macrófagos</i>	23
5.12.2 <i>Determinação da Viabilidade Celular</i>	24
5.12.3 <i>Efeito na capacidade fagocítica</i>	24
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
6.1 <i>TETRASELMIS GRACILIS</i>	26
6.1.1 <i>Análise da Biomassa</i>	26
6.1.2 <i>Extração dos Polissacarídeos</i>	27
6.1.3 <i>Caracterização dos Polissacarídeos</i>	28
6.2.4 <i>Análise de Ressonância Magnética Nuclear - RMN ¹³C</i>	33
6.2.5 <i>Análise de Ressonância Magnética Nuclear - HSQC</i>	35
6.2.6 <i>Análise de metilação das frações TEQ e TEL</i>	38

6.2 <i>ISOCHRYSIS GALBANA</i>	40
6.2.1 <i>Análise da Biomassa</i>	40
6.2.2 <i>Extração dos Polissacarídeos</i>	40
6.2.3 <i>Caracterização dos Polissacarídeos isolados de <i>Isochrysis galbana</i></i>	41
6.2.4 <i>Purificação da fração polissacarídica bruta IAQ isolada de <i>I. galbana</i></i>	44
6.2.5 <i>Caracterização química das frações polissacarídicas isoladas de <i>I. galbana</i></i>	45
6.2.6 <i>Análise de Ressonância Magnética Nuclear – RMN de ¹³C</i>	46
6.2.7 <i>Análise de RMN bidimensional - HSQC</i>	48
6.2.8 <i>Análise de metilação da fração IAQ-e isolada de <i>I. galbana</i></i>	49
6.2.9 <i>Degradação Controlada de Smith</i>	50
6.3 <i>THALASSIOSIRA FLUVIATILIS</i>	54
6.3.1 <i>Análise da biomassa</i>	54
6.3.2 <i>Extração dos polissacarídeos</i>	54
6.3.3 <i>Caracterização dos polissacarídeos isolados de <i>T. fluviatilis</i></i>	55
6.3.4 <i>Purificação da fração polissacarídica bruta TAC</i>	56
6.3.5 <i>Caracterização química das frações</i>	58
6.3.6 <i>Análise de Ressonância Magnética Nuclear – RMN de ¹³C</i>	59
6.3.7 <i>Análise de RMN bidimensional – HSQC</i>	60
6.3.8 <i>Análise de metilação da fração polissacarídica purificada TAC-e</i>	61
6.3.9 <i>Degradação controlada de Smith da fração polissacarídica TAC</i>	62
6.4 <i>ATIVIDADE BIOLÓGICA DOS POLISSACARÍDEOS</i>	65
7 CONCLUSÕES	74
8 REFERÊNCIAS	75

1 INTRODUÇÃO

As microalgas constituem um grupo de organismos microscópios fotossintetizantes com ampla distribuição no globo terrestre e elevada relevância ecológica (DERNER, *et al.*, 2006). Possuem diversos usos e aplicações sob diferentes áreas da ciência (PULZ e GROSS, 2004).

Dentro das diversas aplicações biotecnológicas que possuem e que têm sido intensamente exploradas pelo homem, suprir as necessidades da aquicultura, como fonte alimentar para larvicultura, de uma gama de organismos aquáticos, pertencentes aos mais variados grupos zoológicos, é a que fornece o maior impulso para o desenvolvimento e aperfeiçoamento do cultivo destes microorganismos (SPOLAORE *et al.*, 2006). À medida que a variedade de aplicações cresce, impulsiona ainda mais as pesquisas nesta área.

A riqueza e a diversidade de espécies de microalgas presentes no ambiente aquático fazem com que seja grande a variedade de compostos químicos que podem ser extraídos desses organismos (PULZ e GROSS, 2004; LOURENÇO, 2006). Dentre estes produtos naturais, poucos são os estudos que identificam os polissacarídeos de microalgas, principalmente no que diz respeito à sua estrutura química fina, como tipo de ligações e grau de ramificações. Fatores que variam entre os diferentes grupos de microalgas e que podem influenciar as atividades biológicas de interesse destes compostos.

Assim, considerando a escassez de estudos sobre a estrutura fina dos polissacarídeos biossintetizados por microalgas marinhas, a grande biodiversidade e importância ecológica destes microorganismos e a bioatividade que estes compostos podem possuir, a análise da estrutura e da atividade biológica destes polissacarídeos pode representar uma nova alternativa para a utilização desta biomassa.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 MICROALGAS MARINHAS: Aspectos Gerais

Embora o termo “microalgas”, assim como “algas”, seja desprovido de valor taxonômico (DERNER, *et al.*, 2006), é bastante difundido e engloba microorganismos algais que possuem clorofila ou outros pigmentos fotossintéticos. Microalgas são microorganismos heterogêneos, microscópicos, unicelulares, coloniais ou filamentosos, coloridos e fotoautotróficos, podendo ser procarióticos ou eucarióticos (OLAIZOLA, 2003). Podem viver associadas ao fundo marinho, conhecidas como microalgas bentônicas, ou suspensas na coluna d’água, constituindo o fitoplâncton (LOURENÇO, 2006).

O fitoplâncton, componente fotoautotrófico do plâncton, é o principal produtor primário dos oceanos, fixando, pela atividade fotossintética na zona eufótica, a matéria orgânica que permitirá o funcionamento da quase totalidade das teias alimentares marinhas (YONEDA, 1999; BORGES *et al.*, 2007). Calcula-se que seja responsável por pelo menos 90% da produção primária marinha global (LOURENÇO, 2006).

Este grupo diversificado de organismos merece destaque por apresentar elevada importância bio-histórica, sendo os responsáveis pela estruturação da atmosfera terrestre, por sua importância ecológica e por sua importância econômica, com uso diversificado em vários países do mundo e numerosas aplicações comerciais (VIDOTTI e ROLLEMBERG, 2004; BORGES *et al.*, 2007).

2.2 BIOTECNOLOGIA DE MICROALGAS

A partir da década de 1950 as microalgas começaram a ser utilizadas como fonte de alimento e de substâncias biologicamente ativas. Em 1960 seu uso foi levado à escala comercial com o gênero *Chlorella* e a partir de 1970 as microalgas foram destinadas à aquicultura, além de outros fins biotecnológicos (SPOLAORE *et al.*, 2006). As microalgas possuem aplicações biotecnológicas em distintas áreas, podendo ser utilizada tanto a biomassa algal, seca ou

úmida, para nutrição humana e animal, aquicultura e indústrias de biofertilizantes, como os produtos extraídos dela (PULZ e GROSS, 2004).

Para suprir as necessidades comerciais, o cultivo de microalgas está crescendo gradativamente no mundo inteiro, e tem sido realizado em larga escala, em sistemas fechados de produção fotossintética de biomassa, denominados fotobiorreatores; sistemas fechados de produção por nutrição heterotrófica, denominados fermentadores; ou em tanques, sistemas chamados “abertos” (LOURENÇO, 2006). Estes microorganismos podem ser considerados relativamente de fácil cultivo, apresentando rápido crescimento e tolerância a fatores extremos (BORGES *et al.*, 2007).

Na alimentação humana e animal, as microalgas representam uma fonte suplementar de proteínas, carboidratos, ácidos graxos de elevada importância, como os da família ômega 3 e ômega 6, pigmentos naturais, como os carotenóides, vitaminas, entre outras substâncias capazes de enriquecer o valor nutricional dos alimentos e produzir efeitos promotores de saúde como melhora nas respostas imunes, fertilidade e melhor controle de peso (SPOLAORE *et al.*, 2006; DERNER *et al.*, 2006). As microalgas apresentam ainda atividades probióticas e imunomodulatórias, além de respostas de melhora na saúde e aparência externa dos animais (PULZ e GROSS, 2004; SPOLAORE *et al.*, 2006). Para as plantas, as microalgas podem ser utilizadas como biofertilizantes, auxiliando na fixação do N₂ e na regulação do crescimento, promovendo a germinação e floração (PULZ e GROSS, 2004).

Algumas espécies podem ser utilizadas na obtenção de compostos de interesse para indústrias de alimentos, química e farmacêutica (DERNER *et al.*, 2006). Entre os extratos da biomassa algal utilizados para estes fins, encontram-se os ácidos graxos poliinsaturados, os polissacarídeos, pigmentos carotenóides e toxinas liberadas durante as florações, com valores terapêuticos ainda não totalmente identificados (PULZ e GROSS, 2004). Extratos microalgais também podem ser encontrados em produtos para a pele, como cremes anti-idade, refrescantes ou regenerativos (SPOLAORE *et al.*, 2006). Devido a altas quantidades de O₂ a que ficam expostas, e, portanto, ao estresse oxidativo em que estão sujeitas, as microalgas também podem produzir compostos antioxidantes para própria defesa (PULZ e GROSS, 2004).

A biotecnologia de microalgas também demonstra versatilidade em outros setores, podendo ser aplicadas no tratamento de águas residuais devido à sua capacidade de biorremediação, ou seja, de retirar do meio aquoso alguns elementos químicos, especialmente íons metálicos e compostos orgânicos (VIDOTTI e ROLLEMBERG, 2004; BERTOLDI *et al.*, 2008). Além disso, podem ser aplicadas na avaliação da qualidade dos sistemas aquáticos como indicadores ecológicos e em testes ecotoxicológicos, que permitem classificar substâncias químicas quanto à sua toxicidade ambiental (VIDOTTI e ROLLEMBERG, 2004). Recentemente tem se difundido a aplicação destes microorganismos na produção de energia, na forma de biodiesel (TEIXEIRA e MORALES, 2006; XU *et al.*, 2006; CHISTI, 2007). No entanto, foi o aumento na demanda por microalga para o desenvolvimento da aquicultura que impulsionou o cultivo e maiores estudos sobre a bioquímica e fisiologia desses organismos (BOROWITZA, 1997). No Brasil, a produção de microalgas para aquicultura é a forma predominante de utilização destes microorganismos (LOURENÇO, 2006).

Considerando os aspectos relacionados à cadeia alimentar, as microalgas são de fundamental importância na aquicultura e especialmente na maricultura (VIDOTTI e ROLLEMBERG, 2004; BERTOLDI *et al.*, 2008). Representam importante fonte primária alimentar e aditivo na produção comercial de muitos organismos aquáticos, entre eles, larvas, juvenis e adultos de várias espécies de crustáceos, moluscos e peixes (BOROWITZA, 1997; BROWN *et al.*, 1997). São importantes como fonte de alimentação direta e indireta na larvicultura (BECKER, 2008).

Outra função das microalgas na aquicultura é estabilizar e proporcionar melhoria na qualidade da água de cultivo, através da absorção de produtos nitrogenados tóxicos (amônia e nitrito) (LOURENÇO, 2006; BORGES *et al.*, 2007).

Em 1999 a produção global de microalgas para aquicultura atingiu 1000 t, (62% para moluscos, 21% para camarões e 16% para peixes), aplicação associada ao alto valor nutricional, único ou aditivo, ao fornecimento de pigmentos ou à indução de atividades biológicas (LOURENÇO, 2006).

Vários fatores podem influenciar no valor nutricional destes organismos incluindo a sua forma e tamanho, sua digestibilidade, composição bioquímica e

os requerimentos dos organismos alvo da alimentação. Segundo BOROWITZA (1997), estudos têm sido feitos para determinar os requerimentos nutricionais das espécies-alvo e a composição bioquímica das algas que podem ser utilizadas como alimento. Entretanto, deve-se levar em consideração também a digestibilidade da alga.

As diferentes funções desempenhadas pelas microalgas nos sistemas aquáticos dependem da temperatura, intensidade de radiação solar e da concentração de nutrientes na água (VIDOTTI e ROLLEMBERG, 2004). No que diz respeito à composição bioquímica da biomassa das microalgas, a concentração total de proteínas, lipídeos e carboidratos em microalgas podem variar substancialmente com as espécies e com as condições de cultivo, como intensidade de luz, temperatura, pH, nutrientes, agitação e da fase de crescimento da cultura (PARSONS *et al.*, 1961; BROWN *et al.*, 1997; MIAO e WU, 2004; LOURENÇO, 2006).

A ação de alguns componentes bioquímicos excretados pelas microalgas nos meios de cultura, como efeitos probióticos, estimulação da imunidade e combate a bactérias patogênicas têm sido sugeridos, embora não eficientemente entendidos (SPOLAORE *et al.*, 2006). Existem evidências de que a ingestão de pequenas quantidades de biomassa microalgal pode afetar positivamente a fisiologia de animais aquáticos cultiváveis, auxiliando o sistema imunológico (BELAY, 1993).

2.3 CLASSIFICAÇÃO DAS MICROALGAS

Segundo REVIERS (2006), atualmente as microalgas estão classificadas em 11 divisões distintas: Cyanophyta, Glaucophyta, Rodophyta, Cryptophyta, Euglenozoa, Cercozoa, Haptophyta, Dinophyta, Ochroophyta, Streptophyta e Chlorophyta.

A classificação bioquímica das microalgas está fundamentada em características como natureza e localização dos pigmentos (clorofilas, ficobilinas, carotenos e carotenóides), dos carboidratos de reserva (amido ou laminarana) e da disposição dos tilacóides, sistema de membranas situado no interior dos plastídeos, que contém pigmentos (FRANCESCHINI *et al.*, 2010).

Quatro classes predominam quantitativamente no fitoplâncton marinho: Bacillariophyceae (diatomáceas), Dinophyceae (dinoflagelados), Prymnesiophyceae (cocolitoforídeos) e Cryptophyceae (criptomônadas) (YONEDA, 1999). Ao longo da plataforma continental brasileira também são freqüentes, além destas, algas verdes das classes Prasinophyceae e Chlorophyceae (BRANDINI *et al.*, 1997). As diatomáceas e os dinoflagelados são encontrados tanto em regiões costeiras quanto oceânicas, enquanto os cocolitoforídeos são mais comuns em águas oceânicas e as criptomônadas em regiões costeiras (PARSONS *et al.*, 1984).

As espécies frequentemente mais usadas para aquicultura são pertencentes às classes Bacillariophyceae (*Skeletonema* spp., *Chaetoceros* spp, *Phaeodactylum tricornutum*, *Thalassiosira* spp.), Prymnesiophyceae (*Isochrysis* spp, *Pavlova* spp.), Prasinophyceae (*Tetraselmis* spp.), Chlorophyceae (*Chlorella* spp., *Dunaliella* spp., *Scenedesmus*), Eustigmatophyceae (*Nannochloropsis* sp.), Cryptophyceae (*Rhodomonas* spp.) e Chrysophyceae (*Monocrysis* spp) (DERNER, *et al.*, 2006), além da divisão das Cianobacterias (*Spirulina* spp.) (PULZ e GROSS, 2004; SPOLAORE *et al.*, 2006). Tais espécies apresentam maior vantagem para este tipo de atividade pois são facilmente cultivadas e não são tóxicas. Possuem além do tamanho e forma ideais para ingestão, alta qualidade nutricional e paredes celulares digestíveis para tornar os nutrientes disponíveis (SPOLAORE *et al.*, 2006).

2.3.1 CHLOROPHYTA

A divisão Chlorophyta, juntamente com a Streptophyta, pertence ao sub-Reino Viridiplantae ou Chlorobionta, que compreende as plantas verdes (FRANCESCHINI *et al.*, 2010).

A heterogênea linhagem das Chlorophyta, também conhecidas como algas verdes, é extremamente abundante nos ambientes aquáticos (VIDOTTI e ROLLEMBERG, 2004). Constitui o grupo mais próximo das plantas superiores, sendo esta teoria baseada principalmente na presença de clorofila *a* e *b*, também encontradas nas plantas superiores (PAINTER, 1983; VIDOTTI e ROLLEMBERG, 2004). São caracterizadas também por possuírem pigmentos carotenóides e xantofilas (LOURENÇO, 2006). A reserva é constituída por

amido intraplástico e as paredes celulares são compostas de celulose, embora algumas algas verdes contêm diferentes polímeros (FRANCESCHINI *et al.*, 2010).

Determinadas espécies de clorófitas marinhas ou de água salobra são utilizadas para a alimentação humana. Várias clorófitas como as pertencentes aos gêneros *Chlorella*, *Scenedesmus* e *Tetraselmis* apresentam crescimento rápido e alta tolerância a cultivo, sendo produzidas também como fonte alimentar de organismos aquáticos (LOURENÇO, 2006).

Segundo FRANCESCHINI *et al.* (2010), a divisão Chlorophyta é composta por quatro classes, Prasinophyceae, Ulvophyceae, Chlorophyceae e Trebouxiophyceae. As Prasinophyceae contém um pouco mais de 20 gêneros de organismos unicelulares, tanto marinhos como de água doce. É um grupo heterogêneo, constituído por organismos flagelados que divergiram primitivamente da linhagem principal (LOURENÇO, 2006; FRANCESCHINI *et al.*, 2010). São unicelulares, monadais ou cocóides, às vezes coloniais, sendo seu corpo celular e flagelos cobertos de escamas (REVIERS, 2006). O carotenóide prasinoxantina, característico desta classe, foi seu primeiro marcador quimiosistemático (FOSS *et al.*, 1984).

2.3.2 PRYMNESIOPHYTA (HAPTOPHYTA)

A divisão Prymnesiophyta (Haptophyta) agrupa cerca de 80 gêneros e 300 espécies, compreendendo, em grande maioria, organismos unicelulares, biflagelados, planctônicos e marinhos, caracterizados pela presença de estrutura em forma de fio, conhecida como haptonema (REVIERS, 2006). São formados por dois grupos de organismos bem distintos estruturalmente: a classe Pavlophyceae, que possui dois flagelos desiguais e a classe Prymnesiophyceae, com dois ou quatro flagelos iguais (FRANCESCHINI *et al.*, 2010). As espécies pertencentes à classe Prymnesiophyceae são quase sempre cobertas por escamas orgânicas (polissacarídicas) constituídas de duas camadas de microfibrilas (REVIERS, 2006). REVIERS (2006) propõe quatro ordens para esta classe: Phaeocystales, Prymnesiales, Isochrysidales e Coccolithales.

O plastídio tem coloração dourada, ou castanho-amarelada, devido aos carotenóides que mascaram as clorofilas *a* e *c* (FRANCESCHINI *et al.*, 2010). As microalgas deste grupo são conhecidas por possuírem clorofila *a*, betacaroteno e xantofilas (LOURENÇO, 2006). Sua substância de reserva é semelhante ao paramilo, ou seja, grão de glicano, das euglenófitas, mas é solúvel e está contida em vacúolos (FRANCESCHINI *et al.*, 2010). O paramilo é formado por unidades de glucose unidas por ligações β -(1 \rightarrow 3), semelhante à crisolaminarana, porém, com mais ramificações laterais (LOURENÇO, 2006).

2.3.3 OCHROPHYTA (=HETEROKONTOPHYTA)

As Ochrophyta pertencem ao sub-reino Stramenopiles (=Heterokonta), que agrupa organismos morfológicamente muito diversos (REVIERS, 2006). Inclui diferentes grupos de algas, como as diatomáceas, as eustigmatofíceas, as rafidofíceas, pelagofíceas, feofíceas, dentre outros grupos, reunindo linhagens “castanho-douradas” (LOURENÇO, 2006).

Também conhecidas como diatomáceas, as microalgas pertencentes à classe Bacillariophyceae, são constituídas por uma frústula silicosa, sendo esta a principal característica morfológica distintiva (LOURENÇO, 2006). As diatomáceas são, de modo geral, desprovidas de flagelos, presentes somente no gameta masculino (REVIERS, 2006). Apresentam clorofila *a* e *c* e carotenos, xantófilas, inclusive o pigmento fucoxantina, responsável pela coloração marrom (VIDOTTI e ROLLEMBERG, 2004; LOURENÇO, 2006). A substância de reserva é composta de gotas lipídicas presentes no citoplasma e de crisolaminarana, ou laminarana, formadas em vacúolos especiais, extraplastidiais (FRANCESCHINI *et al.*, 2010). Segundo PAINTER (1983), a crisolaminarana é o polissacarídeo de reserva das diatomáceas, que se difere da laminarana, material de reserva de macroalgas marrons, por não apresentarem terminais redutores de manitol.

Por possuírem uma frústula constituída por sílica, as diatomáceas, ao morrerem, contribuem para a formação do sedimento denominado “terra de diatomáceas”, utilizado em indústrias, na fabricação de filtros, produtos abrasivos, cremes dentais, lixas para polimentos finos ou na indústria de cosméticos (VIDOTTI e ROLLEMBERG, 2004).

LOPES (2003), em estudo com *Thalassiosira* sp., identificou que modificações nas condições do meio de cultura, através de mudanças no suprimento de nutrientes, afetam diretamente a composição química desta diatomácea.

A espécie de diatomácea *Thalassiosira weissflogii* foi caracterizada, em estudo desenvolvido por BORGES *et al.* (2007), por possuir a maior taxa de fixação de carbono, chegando a ser até duas vezes maiores que outras espécies testadas. Sendo recomendadas para estudos biotecnológicos em mecanismos de desenvolvimento limpo (MDL), como produção de biocombustíveis. Também foi observada nessas espécies de diatomáceas uma maior eficiência fotossintética, ou seja, relação entre absorção de luz e conversão de energia, que depende de aspectos fisiológicos e bioquímicos da célula, como a presença de pigmentos acessórios, estado fisiológico e crescimento (BORGES *et al.*, 2007).

2.4 POLISSACARÍDEOS DE MICROALGAS MARINHAS

Polissacarídeos são macromoléculas naturais de ocorrência quase universal nos organismos vivos. Atuam em funções reconhecidas como esquelética na parede celular, de reserva alimentar, de proteção, entre outras, podendo ser definidos como polímeros formados por unidades simples monossacarídicas, ligadas por ligações glicosídicas (ASPINALL, 1970).

O termo polissacarídeos é usualmente usado quando a molécula contém mais de 10 resíduos de açúcares. Constituem na maior forma de manifestação dos carboidratos presentes em todas as espécies de microalgas. Em 12, das 16 espécies de microalgas marinhas estudadas por BROWN (1991), os polissacarídeos representam 91-96% do total de carboidratos.

Devido a grande heterogeneidade desses microorganismos, a composição dos polissacarídeos das microalgas tem acentuadas diferenças entre espécies e classes (PAINTER, 1983). As variações na composição de carboidratos podem atribuir significativas diferenças no valor nutricional, uma vez que a eficiência dos animais marinhos digerirem o polissacarídeo é dependente do seu tipo (BROWN *et al.*, 1997).

Glucose é a principal unidade monossacarídica encontrada, enquanto ramnose, fucose, ribose, arabinose, xilose, manose e galactose são detectadas em variadas proporções (PAINTER, 1983; BROWN, 1991; BROWN *et al.*, 1997). Porém, a composição do carboidrato, especialmente seu conteúdo de glucose, pode variar de acordo com fatores ambientais (RIJSSEL *et al.*, 2000).

Dentre as glucanas encontradas em microalgas, existem variações quanto à estrutura e à conformação de sua cadeia. Em alguns grupos é mais comum identificar a presença de unidades de glucose α -(1 \rightarrow 4) ligadas, denominadas amilopectina ou amilose, dependendo da presença ou não de ramificações, enquanto outros grupos apresentam unidades de glucose β -(1 \rightarrow 3) ligadas, conhecidas como crisolaminaranas, com diversas variações na estrutura da cadeia principal e das ramificações (PAINTER, 1983; GRANUM e MYKLESTAD, 2002; FRANCESCHINI *et al.*, 2010).

2.5 GLUCANAS COMO MODIFICADORAS DE RESPOSTA BIOLÓGICA

Uma variedade de polissacarídeos, de diversas fontes, pode ter habilidade de enriquecer o sistema imunológico, porém, os mais ativos são as β -D-(1 \rightarrow 3)-glucanas, algumas vezes referenciadas como β -D-(1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 6)-glucanas, ou laminaranas (BOHN e BeMILLER, 1995). Estes polissacarídeos estão bem estabelecidos como imunoestimulantes, possuem características estruturais conhecidas para esta atividade e podem ser isolados por simples técnicas de extração (STØRSETH *et al.*, 2005).

Sua habilidade de enriquecer e estimular o sistema imunológico faz com que estas glucanas sejam chamadas de modificadores de resposta biológica (BRM “biological response modifiers”) (BOHN e BeMILLER, 1995; KIM *et al.*, 2000). São capazes de agir como BRM ativando resposta imune envolvendo macrófagos, diferenciação de células-T, resposta proliferativa de células polimorfonucleares, interleucinas, produção de interferon e aumentando a atividade fagocítica (BOHN e BeMILLER, 1995). Além de imunoestimulantes, estudos indicam que ainda podem apresentar atividade antibacteriana, antiviral, antitumoral e efeitos anticoagulantes (BOHN e BeMILLER, 1995).

Entre os polissacarídeos biologicamente ativos, as D-glucanas do tipo β -(1 \rightarrow 3; 1 \rightarrow 6), extraídas de algumas espécies de fungos, revelaram-se

compostos potentes, efetivos contra tumores autólogos e na terapia contra o câncer (SILVA *et al.*, 2006). Estudos revelam que as glucanas na conformação β -(1 \rightarrow 3) modulam o sistema imunológico pela ativação dos macrófagos através da ligação do polímero a receptores específicos destas células (YOUNG *et al.*, 2001).

Na aquicultura também é importante o desenvolvimento de experimentos sobre imunoestimulação específica e não específica, a fim de melhorar a resistência de larvas a infecções bacterianas e com isso reduzir perdas na produção (VADSTEIN, 1997). Segundo SKJERMO *et al.* (2006), estimular o sistema de defesa não específico melhora o crescimento e a resistência a doenças, além de ser potencial medida para aumentar o controle microbiano em produções juvenis de peixes marinhos, crustáceos e moluscos.

O efeito imunoestimulatório de β -(1 \rightarrow 3) glucanas em peixes e animais marinhos tem sido amplamente investigado (SAKAI, 1999). Peixes tratados com laminarana, como o salmão *Salmo salar*, apresentaram aumento na produção de ânion superóxido em seus leucócitos, além de elevação na atividade da fosfatase nas células do rim (DALMO *et al.*, 1996). A laminarana também apresentou resultados positivos como aumento na sobrevivência em infecções bacterianas experimentais (DALMO *et al.*, 1998).

SKJERMO *et al.*, (2006) isolou este polissacarídeo de reserva da diatomácea marinha *Chaetoceros mülleri* e testou-o na alimentação de larvas do peixe *Gadus morhua* observando maiores taxas de sobrevivência, crescimento e peso nos organismos que receberam o tratamento.

Com relação às macroalgas, a administração de extratos de várias espécies também tem sido reportados como forma de aumentar a resistência de diversas espécies de peixes e camarões sob infecções bacterianas. Uma solução de laminaranas extraídas da macroalga marrom *Laminaria digitata* aumentou a liberação de ânion superóxido de camarões da espécie *Litopenaeus vannamei* (CAMPA-CÓRDORA *et al.*, 2002). YEH *et al.*, (2006) analisaram que a administração de extrato aquoso obtido a quente da espécie *Sargassum duplicatum*, tanto por imersão quanto injeção, aumentou a habilidade imune do camarão *L. vannamei*. Extratos da macroalga marrom *Sargassum polycystum* também tem sido reportados por reduzir o impacto da

infecção por WSSV (White Spot Syndrome Vírus) numa espécie de camarão (CHOTIGEAT *et al.*, 2004).

2.6 ESPÉCIES DE MICROALGAS MARINHAS ESTUDADAS

2.6.1 Microalga *Tetraselmis gracilis*

A espécie *Tetraselmis gracilis* Butcher (1959) pertence ao sub-reino Viridiplantae, linhagem das Chlorophyta, classe Prasinophyceae e ordem Chlorodendrales (REVIERS, 2006) (Figura 1). Segundo LOURENÇO (2006), espécies deste gênero apresentam crescimento rápido e alta tolerância às condições de cultivo, podendo ser produzidas em larga escala.

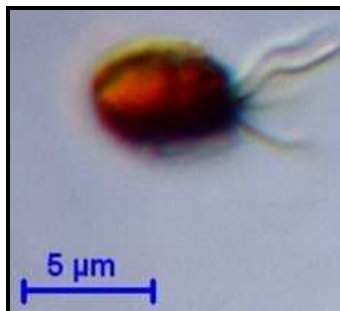


(FONTE: <http://www.eol.org/pages/89647> , acesso em 25 de novembro de 2009)

FIGURA 1. Foto de *Tetraselmis* sp.

2.6.2 Microalga *Isochrysis galbana*

A espécie *Isochrysis galbana* Parker (1949) está classificada na divisão Prymnesiophyta (=Haptophyta), classe Prymnesiophyceae e ordem Isochrysidales (REVIERS, 2006) (Figura 2). Algumas espécies do gênero *Isochrysis* possuem propriedades nutritivas adequadas, crescimento rápido, tamanho pequeno e digestão fácil por animais, podendo ser largamente utilizadas em maricultura (LOURENÇO, 2006).



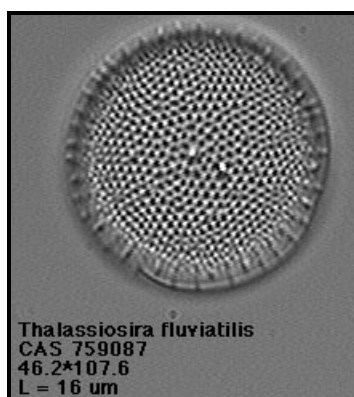
(FONTE: http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Isochrysis_galbana.jpg, acesso em 25 de novembro de 2009)

Figura 2. Foto de *Isochrysis galbana*

2.6.3 Microalga *Thalassiosira fluviatilis*

A espécie *Thalassiosira fluviatilis* Hustedt (Figura 3) pertence ao Sub-reino Stramenopiles (=Heterokonta), divisão Ochrophyta, classe Bacillariophyceae. O gênero *Thalassiosira* possui mais de 100 espécies descritas para as regiões estuarinas e oceânicas (TORGAN e SANTOS, 2006).

Thalassiosira fluviatilis apresenta alto valor nutricional e facilidade de cultivo (LOURENÇO, 2006). Segundo BECKER (2008), dentre diferentes espécies de microalgas analisadas, esta espécie mostrou ser a mais adequada para a larvicultura do caranguejo *Ucides cordatus*.



(FONTE: <http://www.glerl.noaa.gov/seagrant/GLWL/Algae/Diatoms/Cards/Thalassiosira.html>, acesso em 25 de novembro de 2009)

FIGURA 3. Foto de *Thalassiosira fluviatilis*

3 JUSTIFICATIVA

As microalgas marinhas são capazes de crescer em variados tipos de cultura, sendo que suas glucanas podem ser produzidas em grandes quantidades, e isoladas utilizando técnicas simples de extração. As similaridades estruturais entre laminaranas e as glucanas isoladas de algumas microalgas fazem destes organismos interessantes fontes na procura por novos imunostimulantes (STØRSETH *et al.*, 2005).

O uso de imunostimulantes que não provoquem, ou minimizem os efeitos negativos de doenças e que possam ser adicionados como suplemento alimentar, assim como as β -glucanas, ou laminaranas possui cada vez mais interesses de aplicação e direcionamento em pesquisas (VADSTEIN, 1997; DALMO *et al.*, 1998; SKJERMO e VADSTEIN, 1999; YOUNG *et al.*, 2001; PULZ e GROSS, 2004; SKJERMO *et al.*, 2006).

Na aquicultura, o aumento da frequência de problemas patológicos relacionados a infecções virais e bacterianas exige estratégias que levem ao enriquecimento da capacidade dos sistemas imunes, além das convencionais, laboriosas e de alto custo. Porém, para definir os imunostimulantes verdadeiramente apropriados ao uso deve-se considerar sua fonte e seus efeitos adversos, além da necessidade destes estarem descritos pela literatura (VADSTEIN, 1997).

Verifica-se que a massa molecular e a solubilidade em água de β -glucanas, que dependem do seu grau de ramificação e de modificação química, afetam as ações antitumoral e imunomodulatória dos polissacarídeos, além de serem propriedades críticas na determinação de sua utilização clínica como BRMs (KIM *et al.*, 2000). Segundo OKAZAKI *et al.* (1995) a razão entre o tipo de ligação e o peso molecular de (1 \rightarrow 3)- β -D-glucanas é um fator importante para a produção de citocinas em macrófagos. Desta forma, produzir conhecimento sobre a estrutura química dos polissacarídeos isolados de microalgas marinhas, e investigar suas atividades imunomodulatórias possui elevada relevância científica.

4 OBJETIVOS

Este trabalho tem como objetivo geral identificar os polissacarídeos isolados de diferentes espécies de microalgas marinhas, bem como realizar o estudo sobre suas atividades biológicas.

Nesse contexto, estabelecem os seguintes objetivos específicos:

- Extrair e purificar os polissacarídeos de 3 espécies de microalgas marinhas de diferentes divisões: *Tetraselmis gracilis*, *Isochrysis galbana* e *Thalassiosira fluviatilis*;
- Determinar, através de métodos químicos e espectroscópicos, a composição e estrutura dos polissacarídeos obtidos;
- Avaliar a atividade imunoestimulante destes polissacarídeos através de testes sobre macrófagos quanto à sua atividade fagocítica;
- Estabelecer as diferenças observadas entre os grupos de microalgas, seus polissacarídeos de reserva e suas atividades biológicas.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 CULTIVO DAS MICROALGAS MARINHAS

As espécies de microalgas marinhas utilizadas para o estudo foram provenientes da Coleção de Microalgas Elizabeth Aidar, da Universidade Federal Fluminense (UFF) e foram cultivadas no Laboratório de Pesquisas com Organismos Aquáticos (LAPOA), do Grupo Integrado de Aqüicultura e Meio Ambiente, da Universidade Federal do Paraná (GIA-UFPR).

As cepas foram mantidas no Setor de Microalgas do Laboratório de Pesquisa em Organismos Aquáticos (LAPOA-GIA), em sala climatizada a 18-20 °C, com iluminação constante sob intensidade luminosa de 5500 lx. Seguindo procedimento habitual de esterilização do laboratório, as células foram repicadas em meio estéril para erlenmeyers de 250 mL, sendo, após dois dias levadas a 2 L, onde receberam luz e aeração constante, permanecendo em crescimento até a data de recolhimento para as análises bioquímicas.

Usualmente, a água utilizada para o meio de cultura no GIA é de origem marinha (salinidade 26 ppm), filtrada (através de filtros de cartucho de celulose com porosidade de 0,5 µm) e previamente desinfetada com 5 ppm de hipoclorito de sódio por 24 horas, seguida de neutralização com tiosulfato de sódio (BECKER, 2008). Foram utilizados meios de cultura Guillard f/2 modificado (LOURENÇO, 2006), seguindo o sistema de cultivo microalgal tipo “*batch*” (BECKER, 2008).

5.2 ISOLAMENTO DAS CÉLULAS

As microalgas foram isoladas do meio de cultivo através da centrifugação a 12.000 g, por 20 min a 15 °C. O sobrenadante foi separado e a biomassa congelada e liofilizada.

5.3 EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS de *Tetraselmis gracilis* e *Isochrysis galbana*

As biomassas liofilizadas de *Tetraselmis gracilis* e *Isochrysis galbana* foram solubilizadas em água destilada (2,0 g%) e submetidas à extração aquosa por 2 h a 80 °C, sob agitação mecânica. Após extração a solução foi centrifugada a 12.000 g por 20 min, sendo o sobrenadante (extrato) separado e o resíduo congelado e liofilizado. Ao sobrenadante foram adicionados 3 volumes de etanol a frio, formando um precipitado, isolado por centrifugação a 10.000 g por 15 min a 4 °C. O precipitado foi ressolubilizado em água, dialisado em membrana com limite de exclusão de 12-14 KDa e liofilizado para obtenção dos extratos aquosos TEQ e IAQ de *T. gracilis* e *I. galbana*, respectivamente.

As biomassas residuais da extração aquosa foram submetidas à extração alcalina (2,0% p/v) com NaOH 0,5 M, após adição de NaBH₄, sob agitação mecânica por 2 horas a 80 °C. Os extratos foram centrifugados (12.000 g por 20 min) e aos sobrenadantes foram adicionados 3 volumes de etanol, novamente centrifugados e o precipitado obtido foi então ressolubilizado em água, dialisado e liofilizado para obtenção dos extratos em meio alcalino TEL e IAL de *T. gracilis* e *I. galbana*, respectivamente.

5.4 EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS de *Thalassiosira fluviatilis*

A extração dos polissacarídeos da diatomácea *T. fluviatilis* foi realizada em meio ácido conforme método descrito por GRANUM e MYKLESTAD (2002) para obtenção dos polissacarídeos de reserva de diatomáceas. A biomassa seca foi submetida à extração com H₂SO₄, 0,05 M a 60 °C por 10 min. Posteriormente o extrato foi centrifugado para separar o sobrenadante, que foi dialisado contra H₂O destilada em membrana com limite de exclusão de 1 KDa, concentrado e liofilizado. A fração polissacarídica assim obtida foi denominada TAC.

O resíduo da primeira extração foi submetido posteriormente à uma segunda extração ácida, sob as mesmas condições, dando origem à fração TAC-2.

5.5 PURIFICAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS

5.5.1 Purificação dos Polissacarídeos por Congelamento e Degelo

O extrato aquoso (TEQ) e alcalino (TEL) de *T. gracilis* foram solubilizados em água destilada, e em seguida, submetidos ao processo de congelamento e posterior degelo, em temperatura ambiente. O precipitado foram separados do sobrenadante por centrifugação (12000 x g, 15 min, 20 °C). Esse processo foi repetido várias vezes até que o sobrenadante não apresentasse mais precipitado por congelamento e degelo.

5.5.2 Purificação dos Polissacarídeos por Diálise

Os extratos de *T. gracilis* também foram submetidos à diálise em sistema fechado, contra água destilada, através de membrana com limite de exclusão de 25 kDa. Para isso, os polissacarídeos foram solubilizados em água destilada e, em seguida, submetidos ao processo de diálise, sob agitação magnética, havendo troca constante da água de diálise. O material retido na membrana, assim como a água da diálise, foi concentrado e liofilizado, separadamente.

5.5.3 Purificação dos Polissacarídeos por Ultrafiltração em membrana

Para purificação dos polissacarídeos presentes nas frações brutas, realizou-se ultrafiltração em membrana de celulose, com limite de exclusão de 0,1 µm. As ultrafiltrações foram realizadas por um sistema de filtração SARTORIUS (modelo 16249), acoplado com cilindro de ar comprimido. Neste método, os polissacarídeos foram solubilizados em água (2 g%) e submetidos à filtração em cilindro. O material ultrafiltrado foi liofilizado e armazenado em disecador.

5.6 MÉTODOS ANALÍTICOS GERAIS

5.6.1 Dosagem de Carboidratos Totais

Para a dosagem de açúcares totais da biomassa seca, foi realizada extração ácida com H_2SO_4 80% por 20 h a temperatura ambiente, seguida de diluição e dosagem segundo método de DUBOIS *et al.* (1956), conforme descrito em LOURENÇO (2006). A dosagem de açúcares totais dos polissacarídeos foi realizada pelo método do fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS *et al.*, 1956), sendo utilizado como padrão glucose na concentração de 1 mg/mL.

5.6.2 Dosagens de Proteínas Totais

Para determinar o teor de proteínas da biomassa foi realizada extração alcalina, com NaOH 1 M, a 100°C por 10 min para a espécie *Isochrysis galbana* e a 80°C por 10 min para as espécies *T. gracilis* e *T. fluviatilis* seguida por diluição e determinação através do método espectrofotométrico de LOWRY *et al.*, (1951) descrito em (RODRÍGUEZ *et al.*, 2007). A dosagem das proteínas foi realizada segundo método de LOWRY *et al.* (1951), sendo a solução de soroalbumina bovina cristalina utilizada como padrão na concentração de 40 mg%.

5.6.3 Dosagem de Lipídeos Totais

A extração e quantificação dos lipídeos totais da biomassa seca foram realizadas segundo método de BLIGH e DYER (1959) adaptado para microalgas (RODRÍGUEZ *et al.*, 2007).

O método gravimétrico do extrato lipídico em CHCl_3 quantifica a porcentagem de lipídeos por diferença de peso de tubos previamente pesados e posteriormente adicionados com amostra. Consiste na formação de uma mistura monofásica de clorofórmio, metanol e água ($\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$) (2:1:1) com a qual se assegura a extração da maioria dos lipídeos, incluindo aqueles que se encontram ligados a outras moléculas. Agrega-se água e clorofórmio ao extrato resultante de tal maneira que se forma uma solução bifásica formada por metanol e água na parte superior e clorofórmio na parte inferior. Através de

seguidas centrifugações separa-se o extrato lipídico, presente na fase clorofórmica e quantifica-se por diferença gravimétrica.

5.6.4 Dosagens de Grupamentos Sulfatos

O teor de sulfato dos extratos foi determinado através do método turbidimétrico da gelatina-BaCl₂ após hidrólise das amostras com HCl 1 M por 5 h a 105 °C, segundo método de DODGSON e PRICE (1962). Foi utilizado como padrão sulfato de sódio na concentração de 10 µg/ mL.

5.6.5 Dosagem de Ácidos Urônicos

Para a determinação de ácidos urônicos dos polissacarídeos foi utilizado o método do *m*-hidroxibifenil descrito por FILIZETTI-COZZI e CARPITA (1991). Foi utilizado ácido glucurônico como padrão e a leitura feita em espectrofotômetro em 520 nm.

5.7 HIDRÓLISE ÁCIDA TOTAL

Para determinação da composição monossacarídica, os polissacarídeos (~1 mg) obtidos das três espécies estudadas, foram submetidos à hidrólise ácida total com 1 mL de TFA 2 M, por 2 h à 120 °C. Posteriormente, os monossacarídeos foram reduzidos com NaBH₄, por 12 h. O excesso de NaBH₄ foi transformado em ácido bórico adicionando ácido acético diluído até pH 5. O ácido bórico foi eliminado por co-destilação com metanol (4x). Os alditóis foram acetilados com anidrido acético (1 mL) por 1 h à 120 °C e analisados, na forma de acetatos de alditóis, por CLG.

5.8 METILAÇÃO

O processo de metilação do polissacarídeo foi conduzido de acordo com o método de CIUCANU e KEREK (1984). Após solubilização em DMSO (5 mg.mL⁻¹) foi adicionado NaOH pulverizado (30 mg), sendo a mistura submetida à agitação por 30 min. Em seguida, foi adicionado iodometano

(0,2 mL), submetido por mais 30 min sob agitação vigorosa. Este processo de adição de NaOH e iodometano foi repetido por três vezes. Após interrupção da reação com água, a amostra foi neutralizada, dialisada e liofilizada.

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

5.9 DEGRADAÇÃO CONTROLADA DE SMITH

Para realização da degradação controlada de Smith, a fração polissacarídica de interesse (~80 mg) foi solubilizada em solução contendo NaIO_4 0,05 M (40 mL), por 72 h à temperatura ambiente, sob agitação constante. Após este período a solução foi tratada com etilenoglicol, reduzida com NaBH_4 por 20 h, neutralizada, dialisada com membrana de 1 KDa e liofilizada (FURNEAUX e STEVENSON, 1990).

A hidrólise parcial do polissacarídeo modificado foi realizada com TFA pH 2, a 100 °C por 1 h. A fração oxidada com periodato foi identificada com adição da letra S (Smith) ao nome da fração original.

5.10 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

5.10.1 Cromatografia Líquido-Gasosa (CLG)

As análises por cromatografia para avaliar a composição monossacarídica foram realizadas em Cromatógrafo a gás VARIAN, utilizando nitrogênio como gás de arraste e coluna capilar de sílica fundida (30 m X 0,25 mm d.i.), revestida com DB-225 (0,25 μm). As análises cromatográficas para acetatos de alditóis foram realizadas à 220 °C, com o injetor a 250 °C e detector de ionização de chama a 300 °C.

5.10.2 Cromatografia Líquido-Gasosa acoplada à Espectroscopia de Massa (CG-EM)

As análises cromatográficas em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa foram realizadas em um cromatógrafo a gás “VARIAN”, modelo 3.800, acoplado a um espectrômetro de massa de marca SATURN 200R. As injeções nas colunas foram feitas utilizando-se gás hélio como gás de arraste, com fluxo de 1 mL/min. As áreas dos picos de interesse foram determinadas por integração em software. Os espectros de massa foram obtidos por impacto de elétrons a 70 meV, repetidamente a cada 1/8 de segundo, na faixa de m/z (relação carga/massa) de 90 a 220.

Este método foi utilizado para quantificação de acetatos de alditóis parcialmente metilados (SLONEKER, 1972), sendo identificados por meio de seus tempos de retenção e perfis característicos de fragmentação por impacto de elétrons comparado com padrões (JANSON *et al.*, 1976; SASSAKI, *et al.*, 2005).

5.10.3 Cromatografia de Gel Permeação (GPC - HPSEC-MALLS)

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

5.11 MÉTODO ESPECTROSCÓPICO - RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

As análises de ressonância magnética nuclear (RMN- ^{13}C , RMN- ^{13}C -DEPT, RMN- ^1H , $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ HSQC) foram realizadas em espectrômetro da marca BRUKER, modelo DRX 400, série Avance, à temperatura de 50, 60 ou 80 °C. As amostras solubilizadas em D_2O tiveram seus deslocamentos químicos, expressos em ppm, determinados utilizando acetona como padrão interno tanto para as análises de ^{13}C (30,2 ppm) como para ^1H (2,224 ppm). As amostras dissolvidas em $\text{Me}_2\text{SO}-d_6$ tiveram os espectros calibrados com o pico do solvente em 39,7 e 2,40 ppm para ^{13}C e ^1H , respectivamente.

Os espectros de RMN de ^{13}C e RMN ^{13}C DEPT foram obtidos utilizando a frequência base de 100,61 MHz, com intervalo de aquisição de sinal de 0,6 segundos, sendo feitas de 4.000 – 70.000 aquisições, utilizando-se um intervalo de 0,1 segundo entre os pulsos. Os espectros de RMN de ^1H foram obtidos na frequência base de 400,13 MHz, sendo necessário promover a troca dos hidrogênios das hidroxilas por deutério e a remoção completa das moléculas de água presentes, através da dissolução das frações em D_2O , congelamento e liofilização (sendo este processo repetido por 3 vezes), com a finalidade de diminuir a intensidade do sinal relativo ao hidrogênio ligado à oxigênio da água, o qual prejudica a qualidade do espectro obtido.

Os espectros de HSQC (*Heteronuclear Single Quantum Correlation Spectroscopy*) foram obtidos através desta técnica heteronuclear, que permite determinar quais átomos de hidrogênio (^1H) estão ligados aos respectivos átomos de carbono (^{13}C) a partir de sinais de ^{13}C conhecidos ou de ^1H já determinados.

5.12 TESTES DE ATIVIDADE BIOLÓGICA

5.12.1 Obtenção dos macrófagos

Para realização dos testes biológicos foram utilizadas células da linhagem RAW 264.7, constituídas de macrófagos murinos transformados pelo vírus de Leucemia de Abelson. Segundo RAMAMOORTHY *et al.* (1996), estas

células são capazes de responder de forma similar aos macrófagos obtidos diretamente de camundongos podendo ser alvo da ativação por polissacarídeos.

As células, cedidas pela Dra. Mariana P. Moretão e pelo Dr. Marco Krieger do Instituto de Biologia Molecular do Paraná (IBMP), foram adquiridas do Banco de Células da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) e mantidas em nitrogênio líquido no Laboratório de Oxidações Biológicas do Depto. de Bioquímica e Biologia Molecular da UFPR.

5.12.2 Determinação da Viabilidade Celular

Para avaliar a citotoxicidade dos polissacarídeos, a viabilidade celular foi determinada pelo método do MTT (brometo de (3-metil-[4-5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio), que avalia o estado funcional da cadeia respiratória (REILLY *et al.*, 1998). Segundo o método, as células viáveis e metabolicamente ativas reduzem o sal tetrazólio, formando cristais de formazan solúveis em DMSO, produzindo cor roxa característica.

Para isso, as células foram tratadas com diferentes concentrações de polissacarídeos e dispostas em placas com 96 poços, sendo quatro poços para cada tratamento a uma densidade de 5×10^4 /células por poço. A incubação foi realizada em 24 horas a 37°C em estufa com atmosfera de 5% CO₂.

Para análise da viabilidade as células foram incubadas por 3 h a 37 °C em atmosfera de 5% CO₂ em 180 mL de HBSS juntamente com 20 mL de solução de MTT a 5 mg.mL^{-1} (REILLY *et al.*, 1998). A seguir, o excesso de MTT foi removido e os cristais de formazan formados dissolvidos em DMSO. A leitura da absorbância em 550 nm foi realizada em leitor de microplacas BIO-RAD modelo Benchmark, utilizando-se como branco o solvente DMSO.

5.12.3 Efeito na capacidade fagocítica

A capacidade fagocítica foi avaliada de acordo com a metodologia descrita por RAMESH *et al.* (2002) e BUCHI e SOUZA (1993), utilizando leveduras como partículas fagocíticas. Para o ensaio de fagocitose, as células foram plaqueadas na densidade de 5×10^5 células por poço em placas de

cultura de 24 poços, contendo lamínulas de vidro estéreis. Os macrófagos foram tratados em meios de cultura acrescidos de diferentes concentrações de polissacarídeo. Após 24 h, o sobrenadante foi descartado e as lamínulas, contendo as monocamadas de macrófagos, lavadas em meio MEM. Em seguida, as lamínulas foram incubadas com leveduras na proporção de 10 leveduras para cada macrófago. Após tempo 2 h as lamínulas foram lavadas três vezes para retirada das leveduras não fagocitadas, coradas e processadas para montagem de lâminas para microscopia de luz. Utilizando objetiva de 100 vezes de aumento, foram quantificados o número total de macrófagos, o número de macrófagos que fagocitaram e o número de leveduras fagocitadas.

As análises estatísticas foram realizadas no programa GraphPad PRISM 5.0, através da análise de variância (ANOVA) e do teste de médias (Teste de Tukey), para avaliar as diferenças significativas entre os tratamentos.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Cada uma das espécies estudadas recebeu diferentes processos de extração e purificação de seus polissacarídeos. Desta maneira, com a finalidade de maior compreensão, os resultados serão apresentados e discutidos separadamente.

6.1 *Tetraselmis gracilis*

6.1.1 Análise da Biomassa

Inicialmente foi determinada a curva de crescimento e a quantidade de carboidratos presentes na biomassa da microalga *Tetraselmis gracilis*, conforme descrito no item 5.7.1, em diferentes dias de cultivo. Desta forma pode-se estabelecer a relação entre os dias de cultivo, levado até os dias 4, 10 e 14, e a quantidade de carboidratos totais presentes na célula.

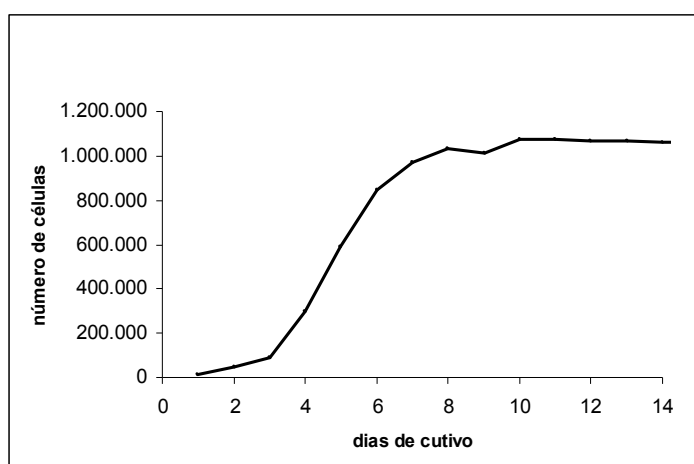


FIGURA 4. Curva de crescimento de *Tetraselmis gracilis*

A maior porcentagem de carboidratos na biomassa celular foi encontrada no décimo dia de crescimento (56,3%) quando comparada ao 4º dia (50,6%) e o 14º dia (41,1%). Observa-se que o décimo dia se refere ao início da fase estacionária da microalga (Figura 4).

As demais análises da composição da biomassa microalgal, com 10 dias de cultivo, indicaram que a espécie *Tetraselmis gracilis* é composta adicionalmente por de 8,2% proteínas e 24,1% de lipídeos.

6.1.2 Extração dos Polissacarídeos

Após centrifugação a 12000 g, as microalgas cultivadas foram separadas do meio de cultura e a biomassa liofilizada e separada para a extração aquosa, que rendeu a fração TEQ (10,7%) e posteriormente alcalina, que originou a fração TEL (54,6% de rendimento) (Figura 5).

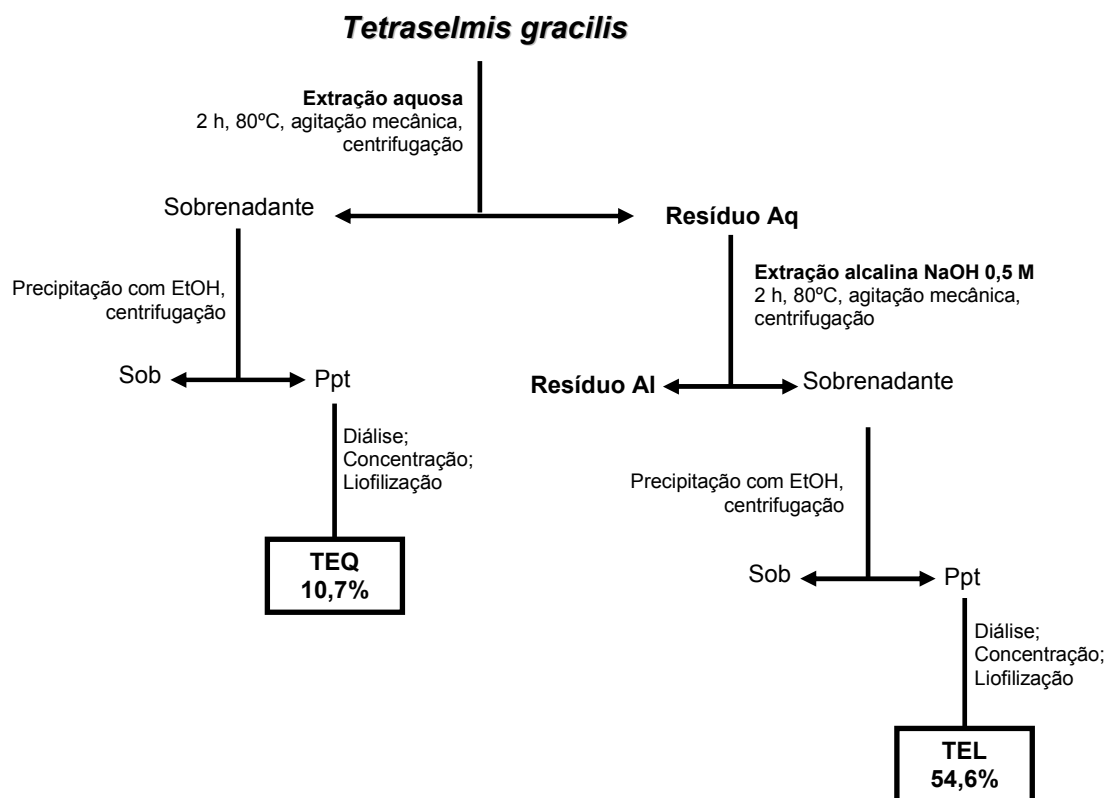


FIGURA 5. Fluxograma das extrações de *Tetraselmis gracilis*.

Foram realizadas, posteriormente, extrações alcalinas seqüenciais utilizando condições menos agressivas para avaliar a condição necessária para obtenção do polímero. Para isso foi utilizado NaOH em diferentes concentrações e condições: 0,1 M à 80 °C; 0,25 M à 80 °C; 0,5 M à 25 °C e 0,5 M à 80°C, sendo denominadas frações TEL-0,1; TEL-0,25; TEL-0,5F e TEL-0,5Q, respectivamente. Todas as condições de extração tiveram baixo rendimento, com exceção da realizada com NaOH 0,5 M à 80 °C, sendo esta a fração que apresentou maior concentração de carboidratos (Tabela 1).

TABELA 1. Extratos alcalinos obtidos em diferentes condições.

Fração	Rendimento (%)	Carboidratos (%)	Proteínas (%)
TEL-0,1	3,6	68	12
TEL-0,25	3,2	57,2	10,9
TEL-0,5F	1,9	45,6	15,3
TEL-0,5Q	55,4	64,2	8,2

6.1.3 Caracterização dos Polissacarídeos

Os extratos aquoso (TEQ) e alcalino (TEL) apresentaram-se majoritariamente compostos por carboidratos, seguidos de proteínas e quantidades traço de sulfato e ácido urônico (Tabela 2).

TABELA 2. Caracterização química das frações de *T. gracilis*.

Frações	Carboidrato (%) ^a	Proteína (%) ^b	Sulfato (%) ^c	Ácido urônico (%) ^d
TEQ	61,8	9,9	3,0	tr ^e
TEL	65,9	7,2	1,3	tr

^{a, b, c, d}= Determinado pelos métodos: DUBOIS *et al.* (1956); LOWRY *et al.* (1951); DOGSON e PRICE (1962); FILIZETTI-COZZI e CARPITA (1991), respectivamente. ^e traço.

Para determinação da composição monossacarídica, os polissacarídeos de *Tetraselmis gracilis* foram submetidos à hidrólise total com TFA 2 M por 2 h, em seguida, reduzidos e acetilados para posterior análise em GLC. Os resultados demonstraram que os polissacarídeos extraídos de *T. gracilis* em ambas as condições podem ser classificados como glucanas, uma vez que são compostos por mais de 90% de glucose e traços de outros monossacarídeos (Tabela 3). Este fato já havia sido observado por BROWN (1991) para outras espécies pertencentes à classe Prasinophyceae, que apresentam polissacarídeos com conteúdo rico em glucose e pequenas quantidades de outros monossacarídeos.

TABELA 3. Caracterização monossacarídica das frações de *T. gracilis*.

Monossacarídeos mol(%) ^a	Frações	
	TEQ	TEL
Ramnose	2,0	1,7
Fucose	0,3	-
Ribose	0,9	0,8
Arabinose	1,2	0,4
Manose	1,8	0,7
Galactose	2,3	0,7
Glucose	91,5	95,8

^a Monossacarídeos quantificados em moles%, na forma de acetato de alditóis, por GLC.

Ambas as frações foram submetidas à análise de homogeneidade por HPSEC-MALLS, obtendo-se perfis heterogêneos tanto para TEQ (Figura 6), como para TEL (Figura 7).

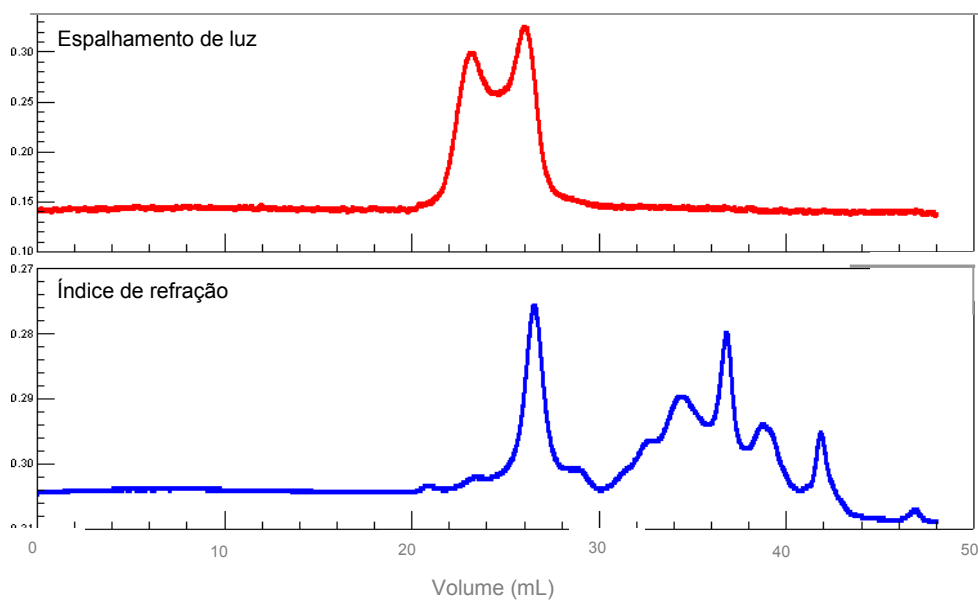


FIGURA 6. Perfil de eluição por HPSEC-MALLS da fração TEQ.

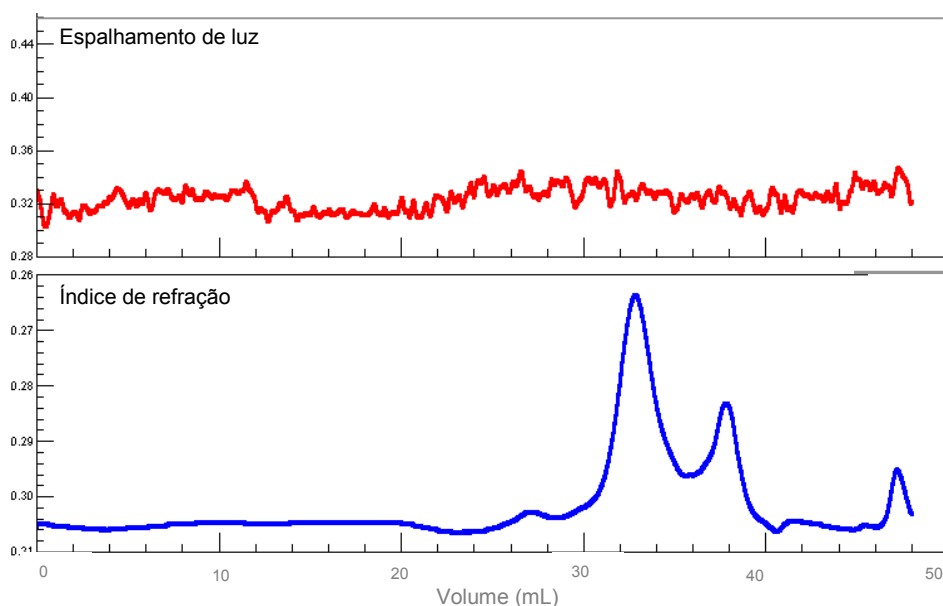


FIGURA 7. Perfil de eluição por HPSEC-MALLS da fração TEL.

Diante disso, foram realizadas algumas tentativas objetivando a purificação das amostras e a obtenção de uma fração homogênea quanto à massa molecular. A fração TEQ foi primeiramente submetida ao tratamento de congelamento e degelo. O sobrenadante deste tratamento (TEQ-gs) constituiu a fração de maior rendimento, composta por 91% do monossacarídeo glicose, sendo, portanto uma glucana. Seu perfil de eluição por HPSEC-MALLS apresentou-se semelhante à fração inicial (Figura 8).

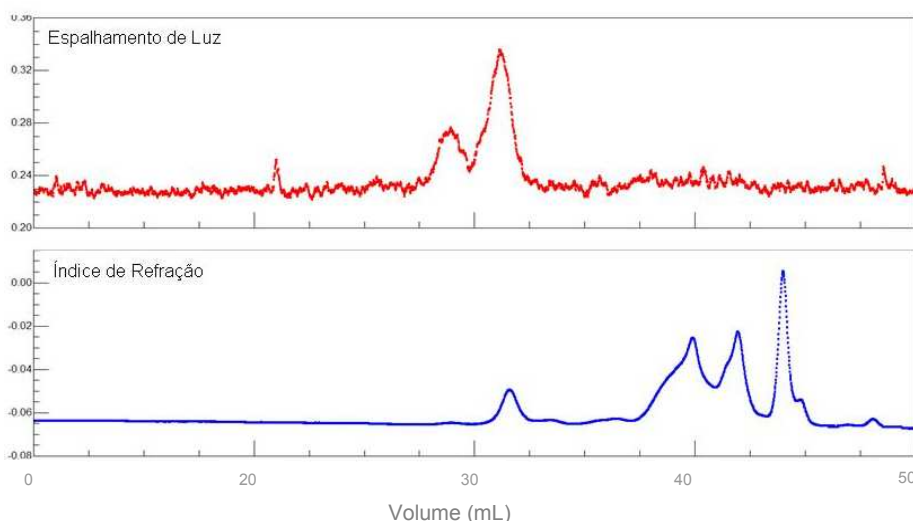


FIGURA 8. Perfil de eluição por HPSEC-MALLS da fração TEQ-gs

A fração TEQ-gs foi então submetida à diálise em sistema fechado com água destilada, a fim de isolar as moléculas identificadas pelo Índice de Refração (IR) no final da corrida. Para isso, foi utilizado membrana com limite de exclusão de 25 kDa. Este procedimento forneceu uma fração retida (TEQ-r), com maior rendimento (53%), e outra eluída (TEQ-e). As composições monossacarídicas destas frações mostraram que ambas apresentaram como componente monossacarídico majoritário a glucose. Observa-se uma separação das moléculas menores com relação às maiores e um conseqüente melhoramento do perfil cromatográfico, embora não suficiente para que a molécula pudesse ser classificada como homogênea quanto à sua massa molecular (Figura 9a e 9b).

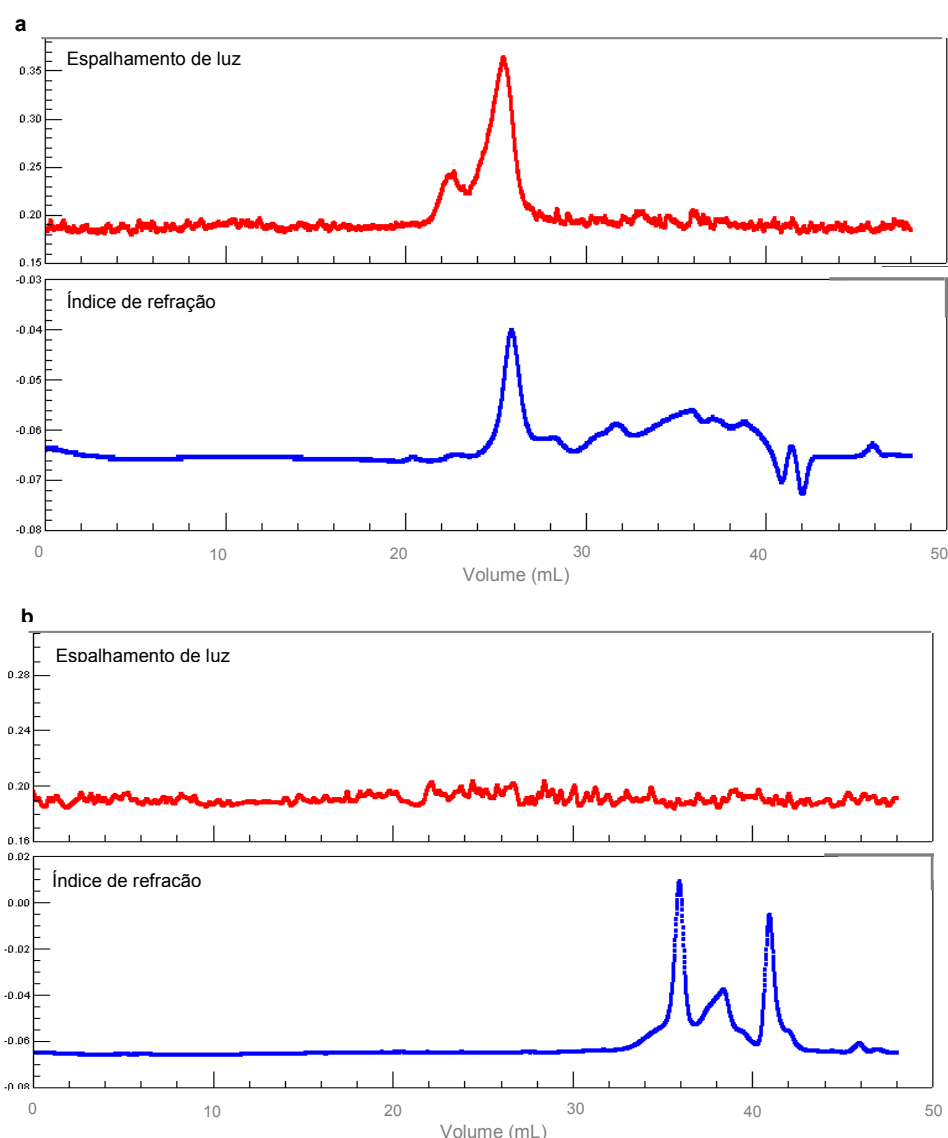


FIGURA 9. Perfil de eluição por HPSEC-MALLS da fração TEQ-r (a) e TEQ-e (b)

O extrato alcalino, TEL, foi igualmente submetido ao procedimento de congelamento e degelo, sendo que o sobrenadante (TEL-gs) (Figura 10) apresentou similaridade tanto no perfil de eluição quanto na composição monossacarídica em comparação com a fração bruta TEL.

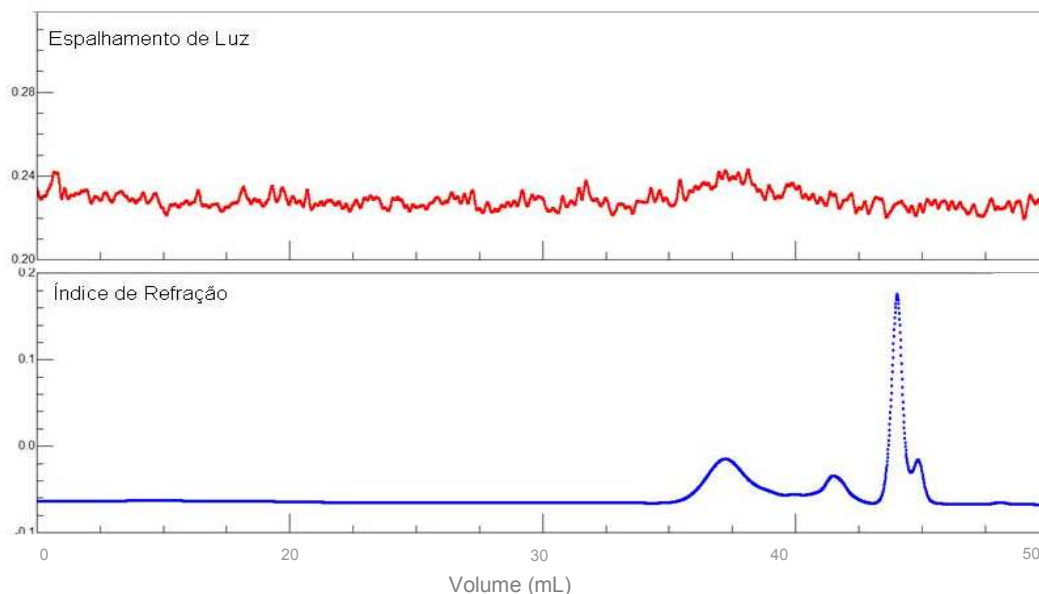


FIGURA 10. Perfil de eluição por HPSEC-MALLS da fração TEL-gs

A diálise em sistema fechado com membrana de 25 kDa resultou na fração retida (TEL-r) (Figura 9a) e eluída (TEL-e) (Figura 9b), ambas heterogêneas quando ao tamanho e com composição monossacarídica semelhantes. Observa-se que TEL é uma molécula de tamanho menor, quando comparada a TEQ, visto que não foi detectada pelo espalhamento de luz, somente pelo índice de refração.

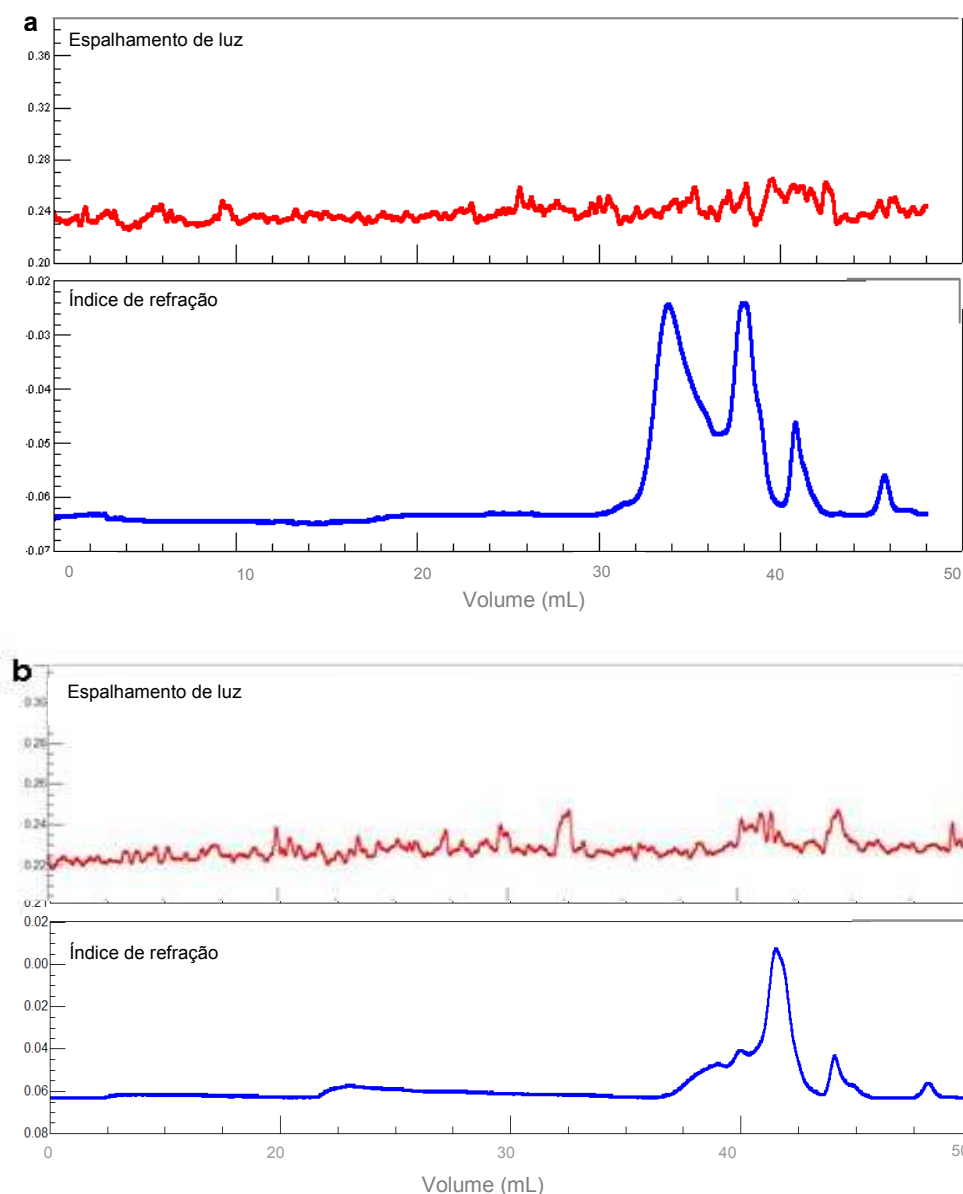


FIGURA 11. Perfil de eluição por HPSEC-MALLS das frações TEL-r (a) e TEL-e (b)

6.2.4 Análise de Ressonância Magnética Nuclear - RMN ^{13}C

Embora os extratos apresentassem aspecto heterogêneo quanto ao perfil de eluição em HPSEC-MALLS, a análise dos sinais principais do espectro de RMN ^{13}C , semelhantes para ambas as frações, indicaram a predominância de apenas uma molécula.

A Figura 12 apresenta a similaridade entre os espectros de RMN de ^{13}C das frações TEQ (a) e TEL (b). Os assinalamentos em δ 99,8 para TEQ e δ 99,7 de TEL são característicos de anomericidade α das unidades de glucose.

Os deslocamentos em 77,2 e 77,4 ppm em TEQ e TEL, respectivamente, correspondem ao C-4 de unidades de α -D-glucose ligadas (1 \rightarrow 4), enquanto os sinais correspondentes ao C-3, C-2 e C-5 estão compreendidos na faixa de δ 73,5 a 71,4 (DAIS e PERLIN, 1982; KNUTSEN e GRASDALEN 1987; CHEETHAM e TAO, 1998; STUELP *et al.*, 1999). O sinal em δ 60,7, que inverte no experimento de DEPT, é correspondente ao C-6 livre das unidades monossacarídicas (Figura 13).

O espectro, composto por sinais principais (de maior intensidade) e por sinais menores, corresponde à estrutura de uma amilopectina (DAIS e PERLIN, 1982) (Figura 14a). Os sinais de maior intensidade representam as unidades de α -D-glucose (1 \rightarrow 4) ligadas (número 2 na Figura 14b), enquanto os sinais de pequena intensidade correspondem às extremidades (1). O sinal em 69,6 ppm refere-se ao C-4 não substituído das extremidades não redutoras de acordo com estrutura apresentada na Figura 12b (número 1). (DAIS e PERLIN, 1982).

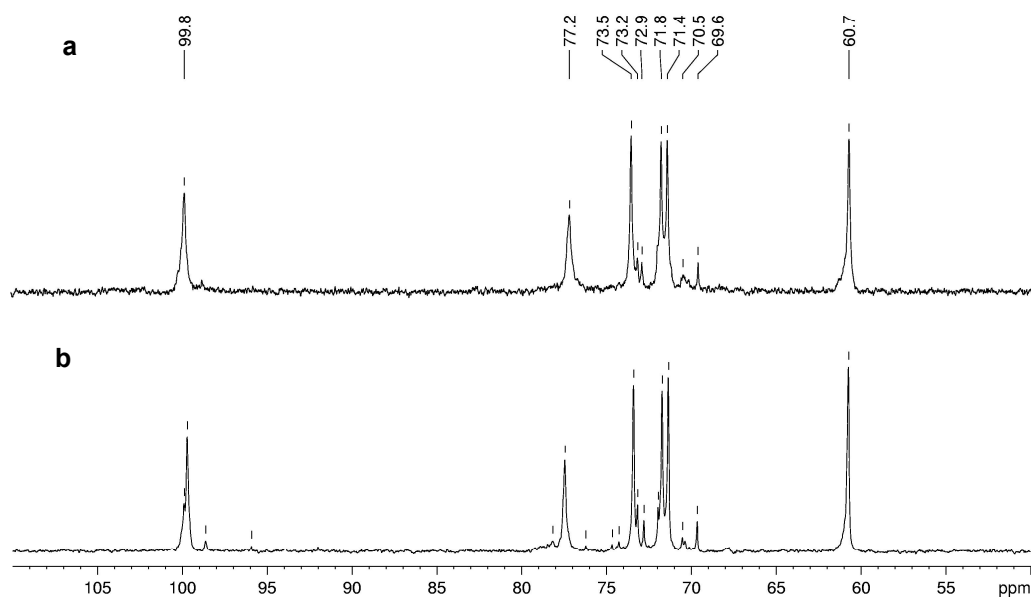


FIGURA 12. Espectros de RMN de ^{13}C das frações TEQ (a) e TEL (b). Solvente D_2O , temperatura: 60°C .

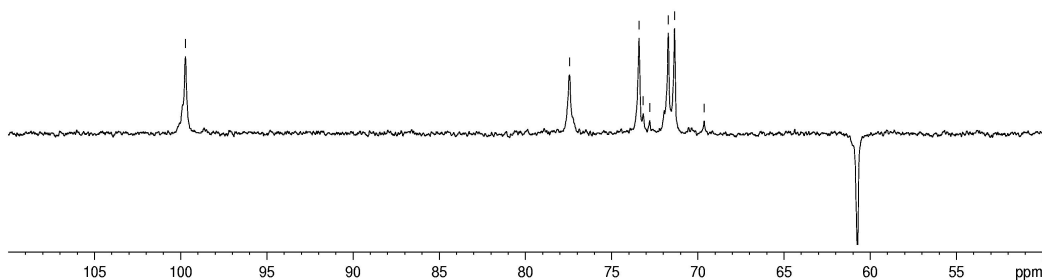


FIGURA 13. Espectro de RMN de ^{13}C -DEPT da fração TEL. Solvente D_2O , temperatura: 60°C .

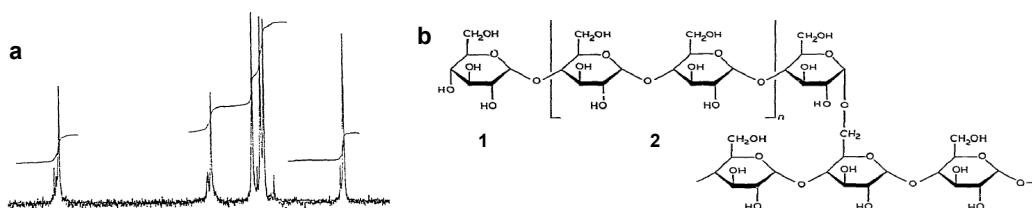


FIGURA 14. RMN de ^{13}C (a) e estrutura (b) da amilopectina de acordo com DAIS e PERLIN (1982)

6.2.5 Análise de Ressonância Magnética Nuclear - HSQC

Com o objetivo de elucidar a estrutura da molécula, foi realizado o espectro de RMN bidimensional de HSQC ^{13}C - ^1H da fração TEL, que permitiu observar o acoplamento de C/H das unidades presentes na molécula (Figura 15). Podem-se observar dois acoplamentos na região anomérica, o maior referente à unidade α -D-Glc (1 \rightarrow 4) em 99,7/5,38 ppm (C1-H1) e um outro de tamanho menor em 98,6/4,98 ppm representativo de outra unidade de α -D-Glcp (C1'-H1'). Além disso, é possível determinar o acoplamento de C4-H4 da unidade α -D-Glc (1 \rightarrow 4) em 77,4/3,67 ppm, representando a unidade α -D-Glc (1 \rightarrow 4) ligada. O pequeno sinal em δ 69,6/3,45 (C4'-H4') pode ser então representativo de C-4 não substituído das extremidades da cadeia. Em δ 60,7/3,87/3,84 (C6-H6-H6') observa-se o acoplamento de C-6 livre.

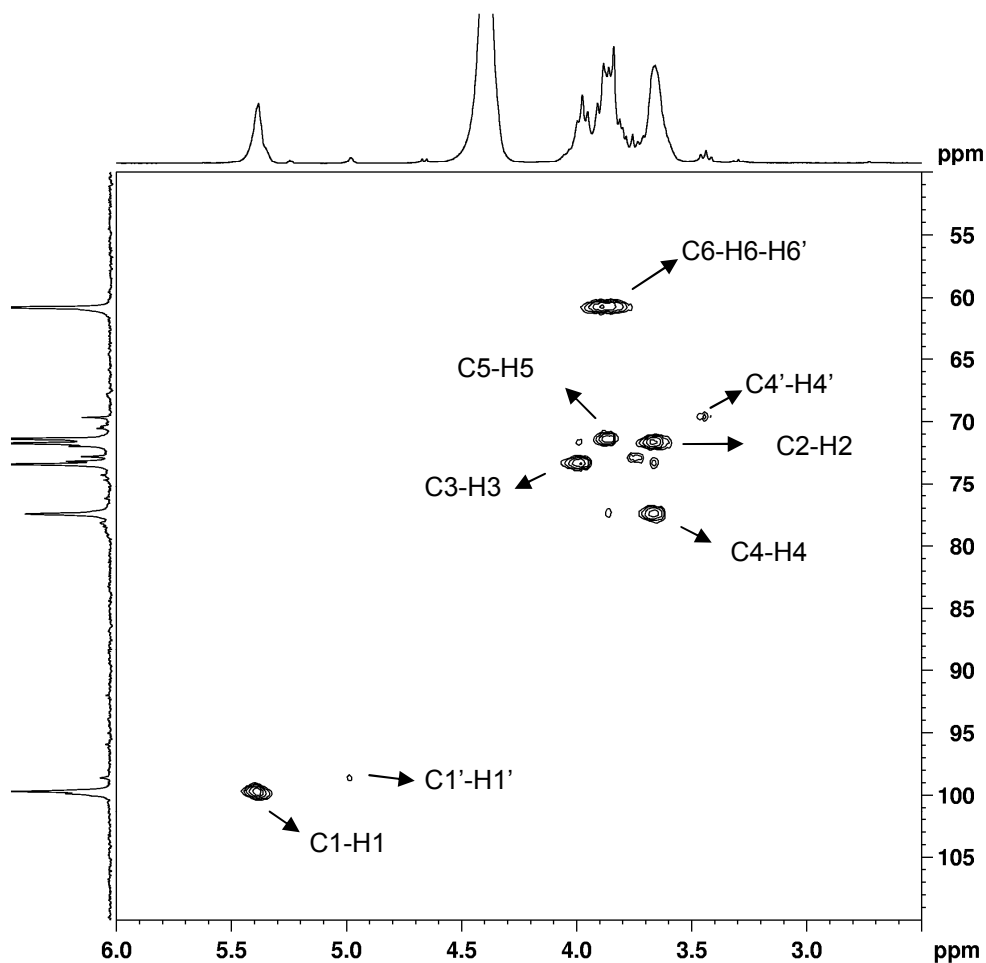


FIGURA 15. Espectro de correlação HSQC da α -D-glucana presente na fração TEL

Os deslocamentos relacionados à α -D-glucana (1 \rightarrow 4) encontrados por este trabalho (Tabela 4), são correspondentes aos apresentados para outros polímeros com estrutura semelhante, caracterizados como amilopectinas, podendo haver variações nos deslocamentos devido ao solvente em que a amostra foi solubilizada e à temperatura do experimento (DAIS e PERLIN, 1982; CHEETAM e TAO, 1998; KNUTSEN e GRASDALEN, 1987)

TABELA 4. Deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C (δ) obtidos para a α -D-glucana presente na fração TEL em comparação com outros estudos

	α -glucana-(1 \rightarrow 4) ^1H ^{13}C ^a		α -glucana-(1 \rightarrow 4) ^1H ^{13}C ^b		α -glucana-(1 \rightarrow 4) ^{13}C ^c	α -glucana-(1 \rightarrow 4) ^{13}C ^d	α -glucana-(1 \rightarrow 4) ^{13}C ^e
H-1/C-1	5,38	99,7	5,23	100,1	99,7	100,3	99,7
H-2/C-2	3,68	71,7	3,55	70,6	71,8	72,4	71,9
H-3/C-3	4,00	73,4	3,73	72,6	73,4	74,2	73,1
H-4/C-4	3,67	77,4	3,57	78,9	77,8	77,9	78,9
H-5/C-5	3,87	71,3	3,88	73,1	71,6	72	71,5
H-6/C-6	3,90	60,7	3,63	60,5	60,9	61,4	60,5
H-6'/C-6	3,84						

^a Presente estudo; ^b Carbonero et al (2002); ^c Knutsen; Grasdalen (1987); ^d Cheetam; Tao (1998) ^e Dais; Perlin (1982).

Foi realizado espectro de RMN de ^{13}C DEPT com amostra solubilizada em $\text{Me}_2\text{SO}-d_6$, que apresentou deslocamentos similares e melhor definição da existência de 2 picos de menor intensidade na região anomérica (Figura 16). Este espectro se apresenta muito semelhante ao obtido por DAIS e PERLIN (1982) na caracterização de uma amilopectina.

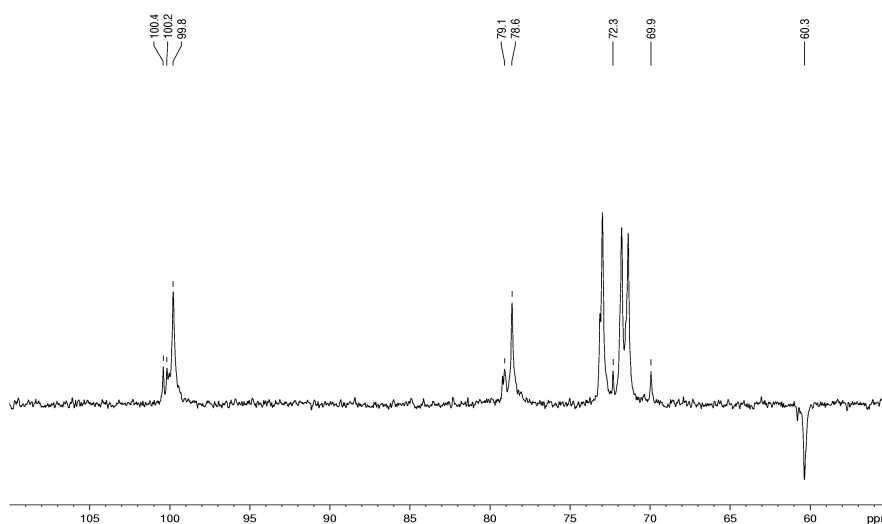


FIGURA 16. Espectro de RMN de ^{13}C DEPT da fração TEL. Solvente $\text{Me}_2\text{SO}-d_6$, temperatura: 60°C .

6.2.6 Análise de metilação das frações TEQ e TEL

As análises de metilação das frações TEQ e TEL apresentaram resultados complementares aos de RMN, fundamentais para a elucidação da estrutura destas moléculas. Os dados demonstraram que as frações TEQ e TEL apresentam semelhanças quantitativas e qualitativas em termos dos derivados obtidos após metilação (Tabela 5). A maior parte das unidades monossacarídicas é ligada através de ligações (1→4), representando 69,6% e 73,1% (derivado 2,3,6-Me₃-Glc) nas frações TEQ e TEL, respectivamente.

Os resultados da metilação indicam a existência de ramificações em C-6, através do derivado 2,3-Me₂-glucose, características de uma molécula de amilopectina, sendo que o sinal deste C-6 substituído pode não ter sido observado no experimento de RMN DEPT (Figura 13) devido à sobreposição com outro sinal de maior intensidade. Uma pequena diferença (3%) foi encontrada entre as frações no que diz respeito a essa substituição em C-6. Enquanto TEL possui 13% de unidades ramificadas, TEQ aproximadamente 10%. Esta quantidade de C-6 estaria substituída por unidades de glucose e na extremidade destas ramificações, o terminal não redutor (TNR, 2,3,4,6-Me₄-Glc). O restante das unidades de TNR (4-7%) identificadas pela metilação seria correspondente às extremidades da cadeia, uma vez que se trata de moléculas de baixo peso molecular, levando em consideração os 13 % das unidades 4,6 ligadas.

TABELA 5. Análise de metilação dos polissacarídeos obtidos de *T. gracilis*

Acetatos de alditóis parcialmente O-metilados ^a	Frações (Mol%)		Rt ^b	Tipo de Ligação
	TEQ	TEL		
2,3,4,6-Me ₄ -Glc	17,4	17	1	Glc _p -(1→
2,3,6-Me ₃ -Glc	69,6	73,1	1,39	4)-Glc _p -(1→
2,3-Me ₂ -Glc	13	9,9	1,98	4,6)-Glc _p -(1→

^a mol % dos monossacarídeos quantificados na forma de acetato de alditóis parcialmente metilados, analisados em GC-MS; ^b Tempo de retenção em relação ao tetra-metil Glc_p.

Segundo VIDOTTI e ROLLEMBERG (2004), o amido é a principal substância acumulada no interior das células das algas verdes. A presença de amilopectina como substância de reserva em algas da classe Prasinophyceae

já havia sido citada por PAINTER (1983), enquanto em outras classes a substância de reserva seria principalmente constituída por amilose. Porém, por ser um grupo heterogêneo, uma grande variação nos polissacarídeos pode ser encontrada.

Através da análise conjunta de todos os resultados obtidos pelos diferentes métodos, pode-se inferir que o polissacarídeo de reserva de *Tetraselmis gracilis*, é uma amilopectina. A única, e pequena, diferença encontrada entre os extratos aquoso e alcalino (TEQ e TEL) está relacionada à quantidade de ramificações da molécula, sendo aproximadamente 3% menor em TEQ. Assim, aproximadamente, para cada 5 unidades de glucose α -(1 \rightarrow 4) ligadas existe um ponto de ramificação em TEQ, enquanto para TEL esta proporção aumenta para 8 unidades para cada ramificação. Este elevado grau de ramificação está mais próximo ao apresentado pelo glicogênio (um ponto de ramificação a cada 8-12 unidades) do que a amilopectina de vegetais superiores (FERREIRA *et al.*, 2009).

Na microalga verde *Chlorella pyrenoidosa*, SUARÉZ *et al.* (2008) identificaram pela primeira vez uma mistura de β -(1 \rightarrow 2)-glucana cíclica e linear no extrato aquoso além de uma amilopectina ramificada na proporção de 5 unidades α -(1 \rightarrow 4) para cada ramificação em C-6, muito próxima à encontrada para *T. gracilis* por este trabalho.

De acordo com o exposto até então, a estrutura sugerida para o polissacarídeo encontra-se representada na Figura 17.

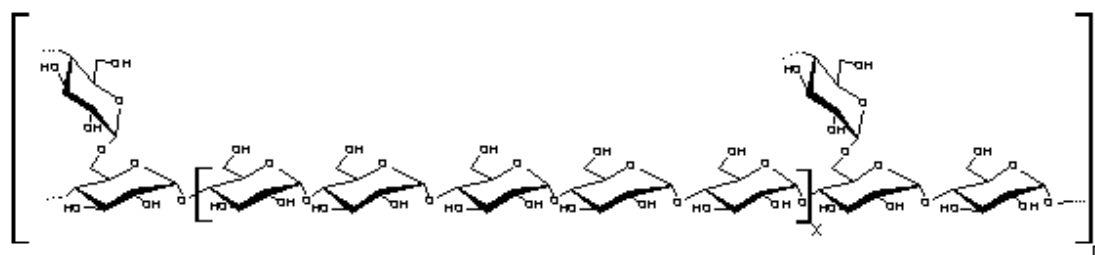


FIGURA 17. Estrutura proposta para os polissacarídeos sintetizados por *T. gracilis* ($x = 5-8$ unidades).

6.2 *Isochrysis galbana*

6.2.1 Análise da Biomassa

Segundo os resultados obtidos para caracterização química da biomassa algal seca, a espécie de microalga marinha *Isochrysis galbana* é constituída por 18,3% de proteínas, 24,2% de carboidratos e 37,0% de lipídeos.

6.2.2 Extração dos Polissacarídeos

A biomassa microalgal de *Isochrysis galbana*, separada de seu meio de cultivo e liofilizada, foi submetida a extrações seqüenciais, sob as mesmas condições da espécie *Tetraselmis gracilis*.

Primeiramente, os polissacarídeos foram extraídos com solução aquosa, sendo o precipitado etanólico foi isolado através de centrifugação, ressolubilizado em água, dialisado e liofilizado, rendendo a fração IAQ, que representou 29,8% da biomassa inicial (Figura 18). Sequencialmente, a biomassa residual da extração aquosa foi submetida à extração alcalina para obtenção da fração IAL, com rendimento de apenas 6,5% (Figura 18).

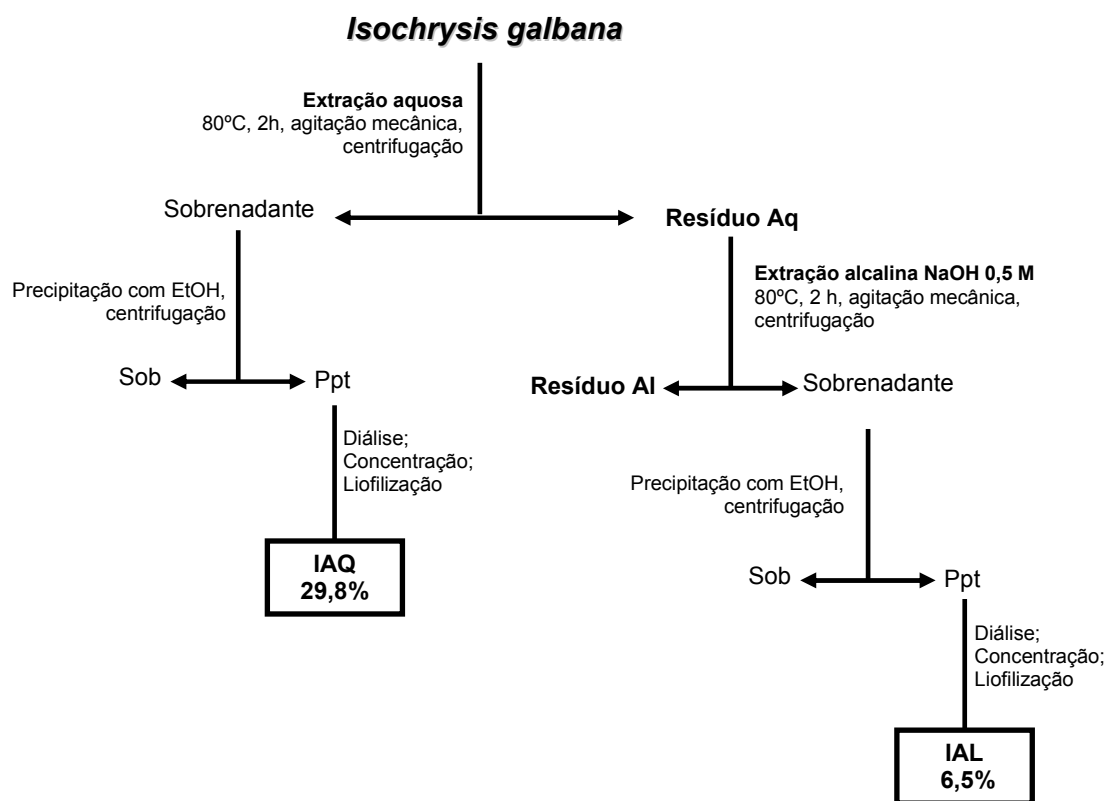


FIGURA 18. Fluxograma das extrações de *Isochrysis galbana*

Foi realizado um teste para avaliar o rendimento de uma segunda extração aquosa, sequencialmente aplicada à biomassa residual após a primeira extração aquosa, porém obteve-se baixo rendimento nesta fração (3,4%).

A biomassa residual das extrações foi quantificada em relação à presença de carboidratos e apresentou pequena percentagem, tanto para o resíduo da extração aquosa (5,2%) quanto para o resíduo da extração alcalina (4,5%). Este resultado indica que a maior quantidade de carboidratos é extraída na primeira extração aquosa, o que justifica o baixo rendimento obtido para as demais extrações sequenciais.

6.2.3 Caracterização dos Polissacarídeos isolados de *Isochrysis galbana*

Os resultados das dosagens químicas das frações IAQ e IAL demonstraram que, além de maior rendimento, a extração aquosa foi a que apresentou maior eficiência na obtenção da fração polissacarídica, devido ao

alto conteúdo de carboidratos totais de IAQ (70,9%), enquanto IAL apresentou 16,8% de carboidratos totais e 39,0% de proteínas.

A composição monossacarídica das frações, obtida após hidrólise total, redução e acetilação, demonstrou que o polissacarídeo extraído em meio aquoso pode ser classificado como glucana, visto que é composto por mais de 92% de glucose (Tabela 7). Na fração IAL foi observada uma heterogeneidade maior de monossacarídeos, sendo composta por 54% de glucose além de galactose (14,1%), manose (12,7%) e arabinose (11,3%) como constituintes principais. Esta heterogeneidade aliada ao elevado teor de proteínas pode indicar a presença de glicoproteínas e/ou heteropolissacarídeos na fração alcalina, podendo esta condição ter extraído além do polissacarídeo de reserva um heteropolímero da parede celular.

Esta espécie, assim como outras desta mesma divisão, apresentaram variação em seu conteúdo de glucose, composto majoritário do polissacarídeo de reserva, dependente da sua fase de crescimento, (BROWN, 1991; BROWN *et al.*, 1997).

Sequencialmente, as frações IAQ e IAL foram analisadas quanto ao perfil de eluição em HPSEC-MALLS para avaliação do grau de homogeneidade. Ambas apresentaram perfil heterogêneo, sendo observadas absorções correspondentes ao detector UV em 280 nm, atribuídos à presença de proteína nestas frações (Figura 19).

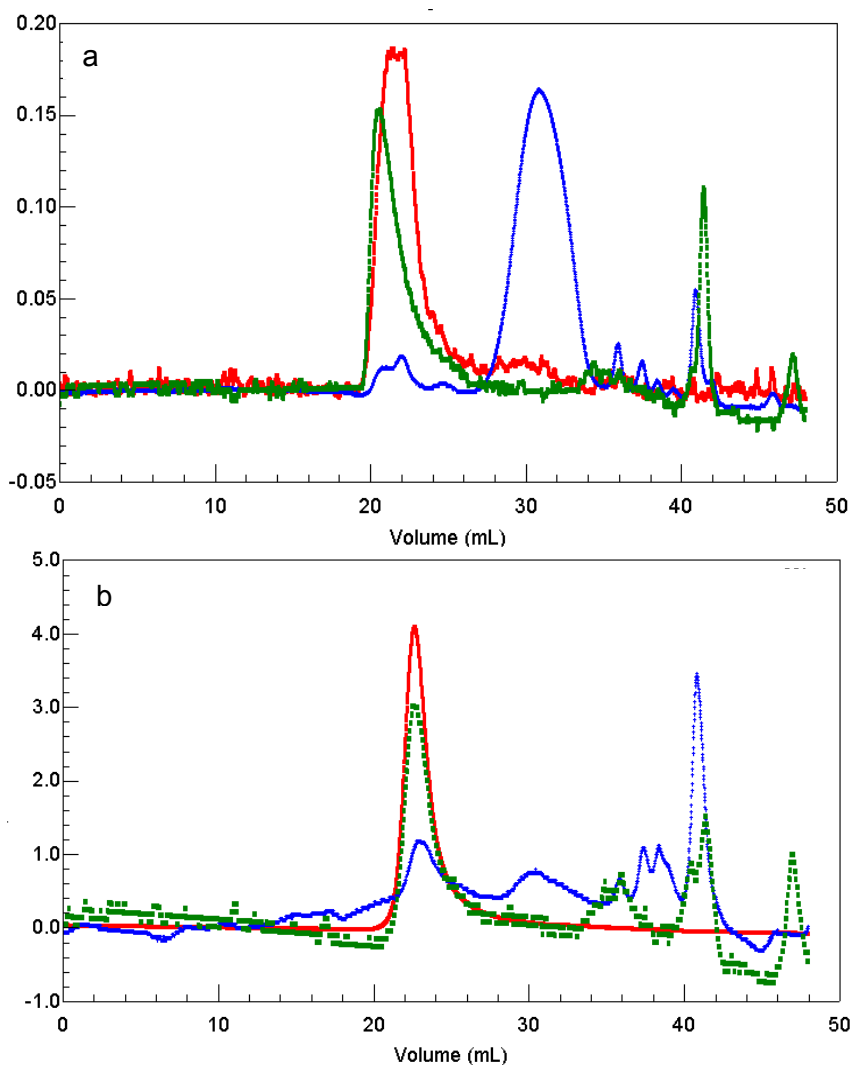


FIGURA 19. Análise de homogeneidade do extrato aquoso (IAQ) (a) e alcalino (IAL) (b). Detectores de Espalhamento de Luz - MALLS (em vermelho), índice de refração - RID (em azul) e UV 280 nm (em verde).

Observa-se na fração IAQ a presença de duas moléculas com tamanhos distintos (Figura 19a). Uma de tamanho maior (volume de eluição aproximado de 25 mL), porém em baixa quantidade, identificada pelo espalhamento de luz e com pico coincidente no detector UV 280 nm e outra menor e em maior concentração (volume de eluição 30-35 mL), identificada apenas pelo índice de refração. Na fração IAL o pico do espalhamento de luz e do índice de refração coincidem com o pico do detector UV (280 nm) (volume de eluição 25-30 mL), o que poderia indicar a presença de uma glicoproteína, ou proteoglicano em maior quantidade na amostra (Figura 19b). Observa-se também um pequeno

pico no RID, em aproximadamente 30 mL, que pode ser atribuído à glucana da fração (54% de glucose nesta fração).

Considerando que IAQ é a fração de maior rendimento e com grande quantidade de carboidratos, esta foi selecionada para obtenção de uma fração polissacarídica homogênea e posterior análise de sua estrutura química fina.

6.2.4 Purificação da fração polissacarídica bruta IAQ isolada de *I. galbana*

Com o objetivo de obter uma fração polissacarídica homogênea, IAQ foi submetida à ultrafiltração. Dessa forma a amostra foi solubilizada em água MiliQ e submetida a ultrafiltração em membrana de 0,1 μm , resultando numa fração eluída (75% de rendimento) e outra retida (15% de rendimento), as quais foram denominadas IAQ-e e IAQ-r, respectivamente. Estas frações foram analisadas por HPSEC-MALLS e apresentaram os cromatogramas da Figura 20.

Analisando a Figura 20a verifica-se que a fração IAQ-e foi eluída como um pico simétrico no índice de refração, o que a classifica como homogênea quanto à massa molecular. O valor de dn/dc foi utilizado para determinação da massa molecular ponderal média da fração IAQ-e, que apresentou valor de 18,8 kDa. Na fração IAQ-r, de baixo rendimento, pode-se identificar no cromatograma obtido com o detector de espalhamento de luz um pico referente ao encontrado anteriormente na fração bruta, coincidente com o UV (Figura 20b).

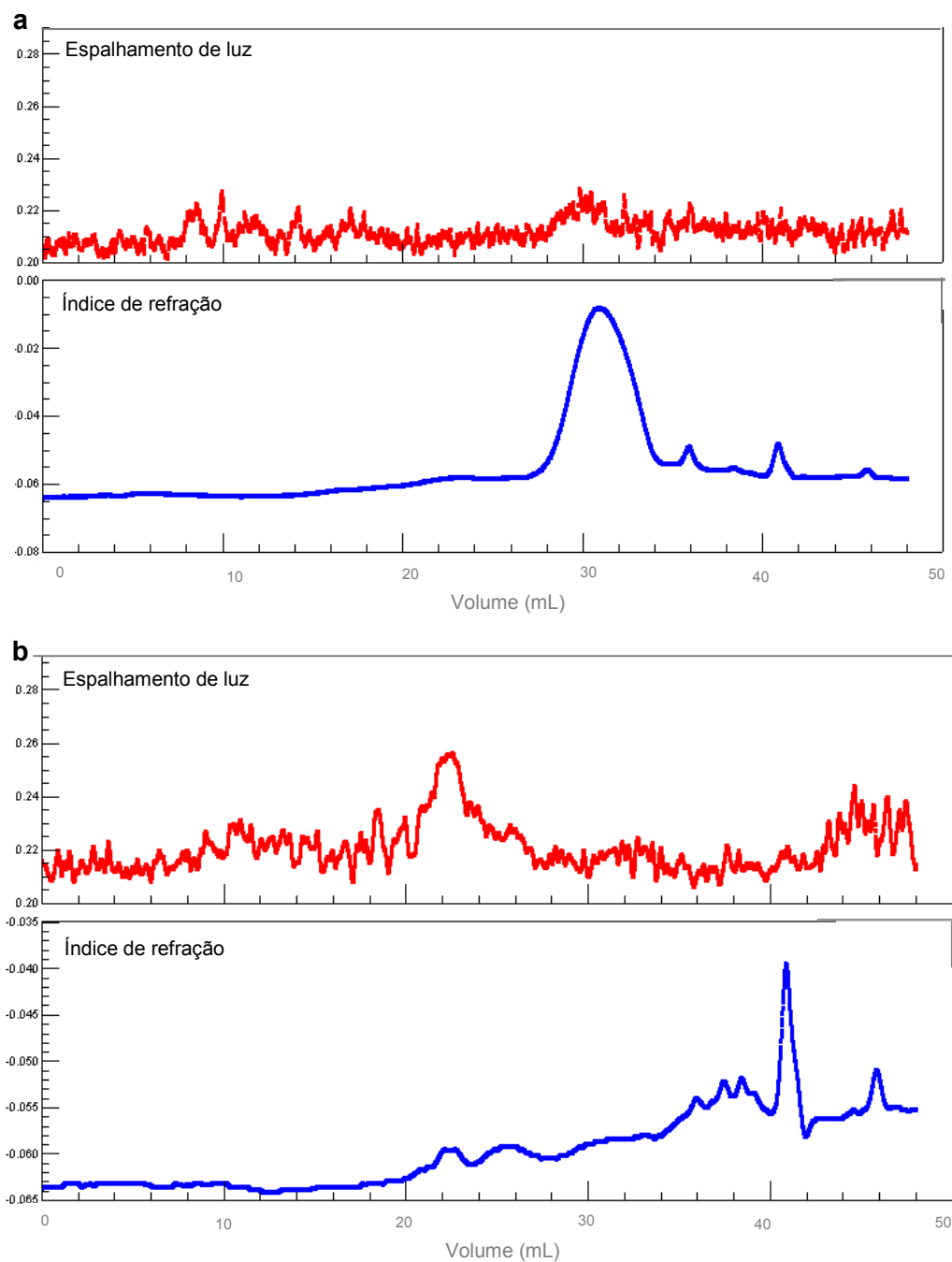


FIGURA 20. Perfil de eluição por HPSEC-MALLS da fração IAQ-e (a) e IAQ-r (b)

6.2.5 Caracterização química das frações polissacarídicas isoladas de *I. galbana*

As frações obtidas após ultrafiltração foram submetidas às análises para determinação da sua composição química. A fração IAQ-e mostrou-se similar à fração original IAQ (Tabela 6), enquanto IAQ-r apresentou menor quantidade

de carboidratos (33,4%) e maior de proteínas (19,7%) quanto comparada à IAQ.

TABELA 6. Caracterização química das frações aquosas de *I. galbana*

Frações	Carboidrato (%) ^a	Proteína (%) ^b	Sulfato (%) ^c	Ácido urônico (%) ^d
IAQ	70,9	8,4	2,3	tr ^e
IAQ-e	79,3	6,5	nd ^f	nd

a, b, c, d = Determinado pelos métodos: DUBOIS *et al.* (1956); LOWRY *et al.* (1951); DOGSON e PRICE (1961); FILIZETTI-COZZI e CARPITA (1991), respectivamente. ^e traço; ^f não determinado.

A composição monossacarídica das frações obtidas após ultrafiltração indica que a glucana encontra-se na fração eluída (IAQ-e) (Tabela 7), enquanto a fração retida (IAQ-r) apresentou heterogeneidade monossacarídica.

TABELA 7. Caracterização monossacarídica das frações aquosas de *I. galbana*

Monossacarídeos mol(%) ^a	Frações	
	IAQ	IAQ-e
Ramnose	1,1	1,0
Fucose	-	0,2
Ribose	0,7	0,7
Arabinose	2,1	1,1
Xilose	0,6	0,5
Manose	1,1	0,4
Galactose	2,0	0,7
Glucose	92,4	95,4

^a Monossacarídeos quantificados em moles%, na forma de acetato de alditóis, por GLC.

6.2.6 Análise de Ressonância Magnética Nuclear – RMN de ¹³C

Foram realizadas análises de RMN de ¹³C e ¹³C-DEPT do extrato aquoso bruto (IAQ), assim como da fração homogênea obtida a partir de ultrafiltração (IAQ-e). A grande similaridade entre os espectros obtidos para ambas as frações demonstra que são constituídas pelo mesmo polímero, sendo que a fração IAQ-r estaria presente em pequena quantidade em IAQ, não influenciando seu perfil espectroscópico (Figura 21).

Os espectros de RMN de ¹³C demonstram a presença de 3 sinais anoméricos em 103,4, 103,0 e 102,5 ppm, indicando a presença de 3 C-1 em

ambientes químicos diferentes. Os assinalamentos nesta região são característicos de anomeridade β de unidades de glucose. Os sinais em δ 86,7 e 85,0 indicam a presença de unidades ligadas (1 \rightarrow 3), enquanto na faixa de δ 76,1 a 69,9 encontram-se os sinais referentes aos C-2, C-4 e C-5.

A inversão de dois sinais de $-\text{CH}_2$ no experimento de DEPT, em δ 61,1 e 68,4 demonstra a presença de C-6 livre e C-6 substituído, respectivamente. Este último sinal estaria indicando as unidades β -D-glucose ligadas (1 \rightarrow 6) ou as ramificações das unidades (1 \rightarrow 3) ligadas, ou seja, unidades de β -D-glucose (1 \rightarrow 3)(1 \rightarrow 6) ligadas.

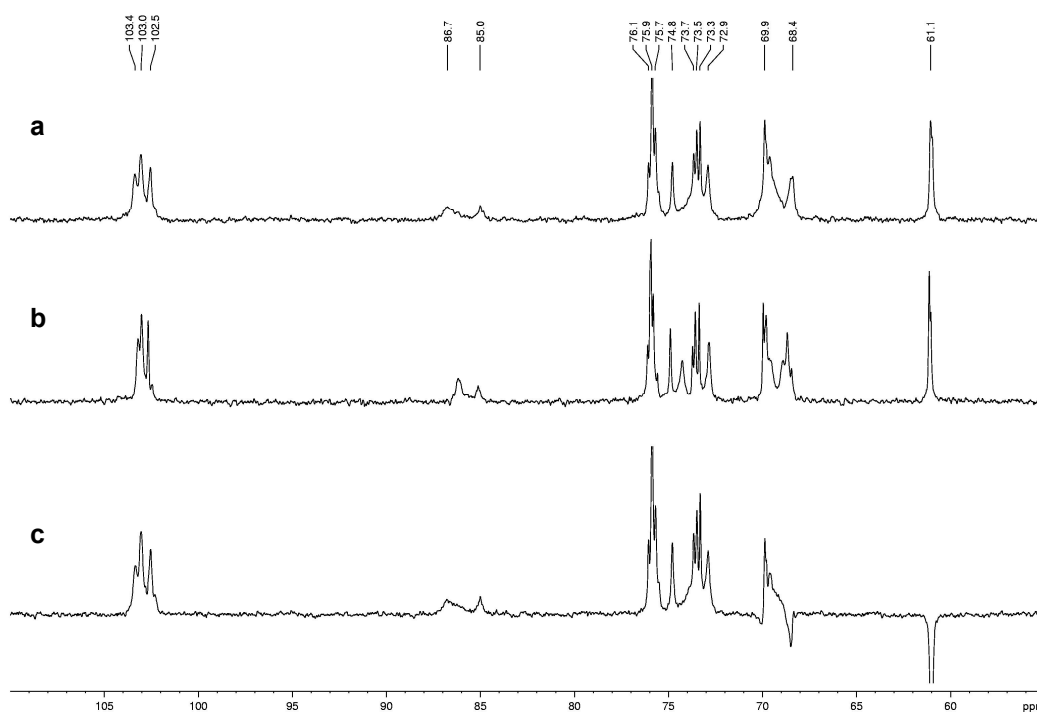


FIGURA 21. Espectros de RMN de ^{13}C das frações IAQ (a), IAQ-e (b) e RMN DEPT da fração IAQ (c). Solvente D_2O , temperatura: 70°C .

Estes assinalamentos são muito similares aos propostos por VARUM *et al.* (1986), na identificação de uma β -D-glucana extraída da microalga *Emiliana huxleyi*, que, assim como a *I. galbana*, pertence à divisão Prymnesiophyta. Também se assemelham aos sinais estabelecidos na identificação de β -D-glucanas fúngicas (CARBONERO *et al.*, 2006; AMARAL *et al.*, 2008; CHENGHUA *et al.*, 2000).

6.2.7 Análise de RMN bidimensional - HSQC

Foi realizado o espectro de RMN bidimensional de HSQC ^{13}C - ^1H da fração IAQ para melhor identificar a molécula (Figura 22). Este espectro demonstra 3 acoplamentos correspondentes a ^{13}C - ^1H em δ 103,4/4,90 (A); δ 103,0/4,79 (B) e δ 102,5/4,71 (C), alta frequência para C-1 e baixa frequência para H-1, representativo da configuração β .

Para o sinal do C-6 livre em 61,1 ppm observa-se a presença de acoplamentos em δ 61,1/4,14 (D) e δ 61,1/3,96 (E). Em 68,4 ppm (sinal que sofreu inversão pelo experimento de DEPT), encontra-se o acoplamento em 4,10 (F); 3,75 (G) ppm, sugerindo a presença de unidades (1 \rightarrow 6) ligadas. Os assinalamentos em δ 86,5/3,65 e δ 85,0/3,68 ppm são referentes às unidades da molécula (1 \rightarrow 3) ligadas.

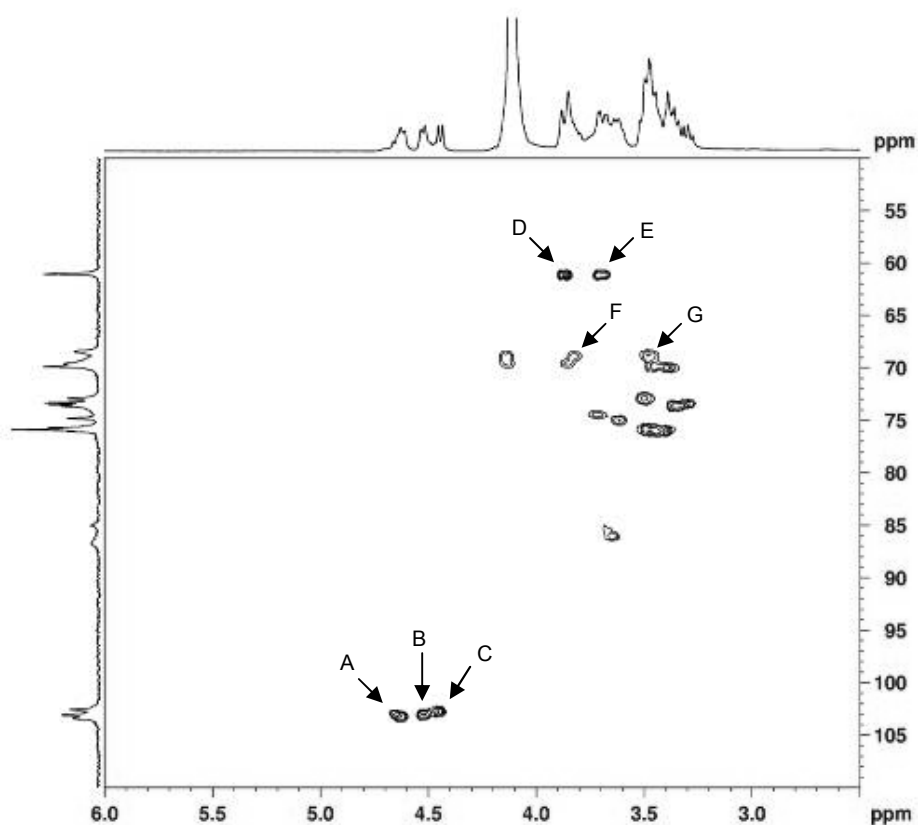


FIGURA 22. Espectro de RMN 2D HSQC da β -D-glucana presente na fração IAQ

Com o objetivo de realizar uma comparação entre os deslocamentos da β -D-glucana extraída da microalga *I. galbana* e outras β -D-glucanas previamente identificadas, foram gerados espectro de RMN ^{13}C utilizando como solvente o $\text{Me}_2\text{SO}-d_6$, usualmente empregado para estes polímeros, que muitas vezes são insolúveis em água. Os resultados encontram-se relacionados na Tabela 8. Observa-se similaridade entre os sinais assinalados por este e por outros trabalhos, correspondentes às unidades de glucose β -(1 \rightarrow 3) e β -(1 \rightarrow 6) ligadas.

TABELA 8. Assinalamentos de RMN de ^{13}C da fração IAQ solubilizada em $\text{ME}_2\text{SO}-d_6$ em comparação com outros estudos

	<i>I. galbana</i> (microalga)		<i>U. mammulata</i> (líquen)		<i>C. debilis</i> (diatomácea)	
	β -Glc (1 \rightarrow 3) ^a	β -Glc (1 \rightarrow 6) ^a	β -Glc (1 \rightarrow 3) ^b	β -Glc (1 \rightarrow 6) ^b	β -Glc (1 \rightarrow 3) ^c	β -Glc (1 \rightarrow 6) ^c
C1	103,0	104,3	102.8	103.1	103.3	103.6
C2	72,5	73,8	72.7	73.3	73.4	73.8
C3	88,5	76,8	86.0	76.4	86.3	76.7
C3'	87,5					
C4	68,1	70,3	68.3	69.9	68.9	70.5
C5	76,3	75,2	76.2	75.4	76.7	76.0
C6	61,2	68,9	60.7	68.4	61.4	69.0

^a Presente estudo; ^b Carbonero *et al.*, 2006; ^c Storseth *et al.*, 2006

6.2.8 Análise de metilação da fração IAQ-e isolada de *I. galbana*

Para melhor elucidação da estrutura química fina desta β -D-glucana, a fração IAQ-e foi submetida ao processo de metilação, com seus resultados apresentados na Tabela 9.

A metilação confirma a estrutura sugerida até então para o polímero através da análise de RMN, evidenciando que a molécula é composta por unidades de glucose como terminais não redutores (TNR) e unidades de glucose (1 \rightarrow 6)-ligadas, (1 \rightarrow 3)(1 \rightarrow 6)-ligadas e (1 \rightarrow 3)-ligadas na proporção 5:4:4:1, respectivamente (Tabela 9). Com isso pode-se inferir que a fração IAQ-e é composta por uma β -D-glucana com cadeia principal ramificada e alto

teor de terminais não redutores, que podem estar relacionados com o pequeno tamanho da molécula, observado também através do perfil do HPSEC-MALLS.

TABELA 9. Análise de metilação da fração polissacarídica IAQ-e isolada de *Isochrysis galbana*

Acetatos de alditóis parcialmente O-metilados ^a	IAQ-e (mol %)	Rt ^b	Ligação
2,3,4,6-Me ₄ -Glc	36,1	1	Glc _p -(1→
2,4,6- Me ₃ -Glc	7,1	1,265	→3)-Glc _p -(1→
2,3,4-Me ₃ -Glc	28,6	1,394	→6)-Glc _p -(1→
2,4-Me ₂ -Glc	28,2	1,946	→3,6)-Glc _p -(1→

^a mol % dos monossacarídeos quantificados na forma de acetato de alditóis parcialmente metilados, analisados em GC-MS; ^b Tempo de retenção em relação ao tetra-metil Glc_p.

6.2.9 Degradação Controlada de Smith

Dispondo somente dos resultados anteriormente descritos seria impossível concluir com precisão qual o tipo de ligação presente na cadeia principal desta glucana e quais as ligações relacionadas às ramificações. Desta forma outro experimento foi conduzido para que fosse possível confirmar a estrutura química da molécula extraída. Este experimento, denominado Degradação Controlada de Smith, consiste na oxidação com periodato de sódio do polímero. Nestas condições apenas os monossacarídeos com hidroxilas vicinais livres são oxidados. Assim, unidades ligadas através de ligações glicosídicas (1→3) não são oxidadas e permanecem intactas enquanto as ligadas através dos outros tipos de ligações oxidam e são removidas pelo processo de hidrólise parcial.

O resultado da Degradação de Smith, que deu origem à fração IAQ-s pode ser primeiramente avaliado através do espectro de RMN de ¹³C e ¹³C-DEPT em comparação à fração IAQ-e (Figura 23). Pode-se perceber uma simplificação dos sinais quando comparado ao espectro inicial, com a permanência de 6 picos principais. Após a oxidação com periodato, o sinal referente ao C-6 substituído (68,9 ppm) permanece intacto enquanto o característico do C-6 livre desaparece quase totalmente. Ocorre também a

diminuição dos sinais referentes à ligação (1→3). Na região de C-1, observa-se a permanência de 1 sinal anomérico em 102,9 ppm, correspondente à unidade com ligações (1→6).

Estes resultados indicam a permanência de uma molécula (1→6)-ligada na fração IAQ-s, após degradação de Smith, que não pôde ser oxidada devido à disposição de suas ramificações em C-3. Conclusivamente, percebe-se que a cadeia principal do polímero é constituída por uma β -D-glucana (1→6), com ramificação em C-3.

A estrutura destas unidades (1→6) ligadas, com ramificação no C-3 é resistente à Degradação de Smith, pois não apresenta hidroxilas vicinais livres. Após o experimento, houve degradação dos TNR presentes nas ramificações em C-3, expondo assim a cadeia principal (1→6).

Os sinais na região de C-6 livre, que permaneceram em pequena intensidade no espectro e foram invertidos pelo RMN DEPT, podem ser representativos dos terminais não redutores (TNR) presentes nas extremidades da cadeia e nas ramificações que não foram totalmente oxidadas devido à presença de mais de uma unidade, assim como das extremidades reductoras da cadeia, reduzidas com NaBH_4 , conforme o procedimento do experimento.

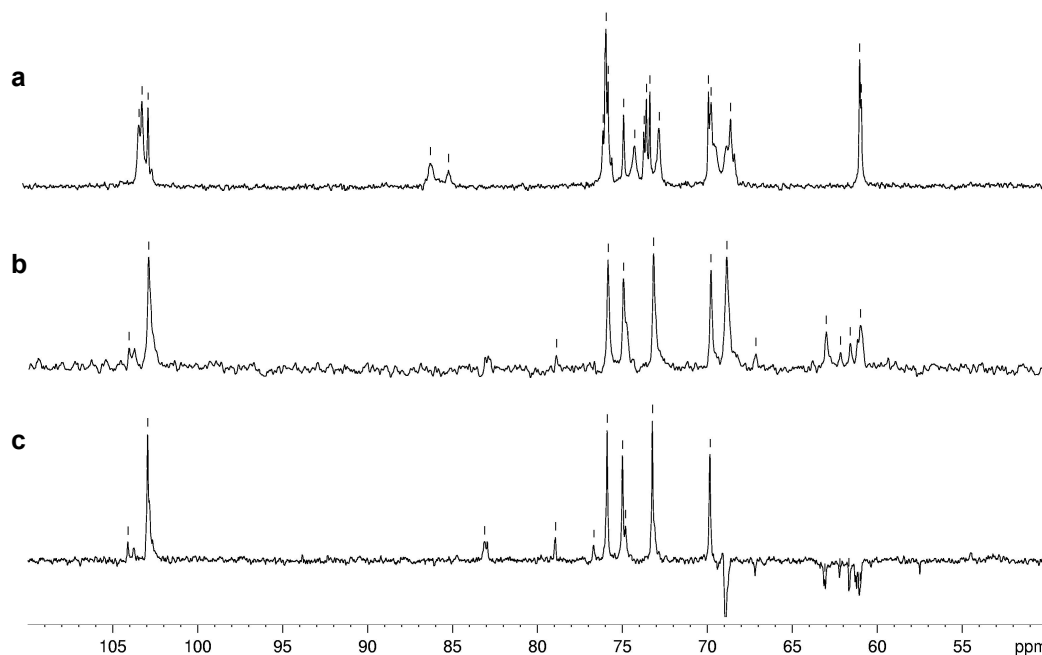


FIGURA 23. Espectro de RMN de ^{13}C das frações IAQ-e (a), IAQ-s (b) e IAQ-s DEPT (c). Solvente D_2O , temperatura: 70 °C.

Para uma melhor avaliação e conclusão dos resultados, foi realizada a metilação da fração IAQ-s. Os resultados demonstram uma diminuição significativa na quantidade de terminais não redutores (de 36,1 para 9,1%) e diminuição das ligações (1→3) e (1→6)(1→3), conforme esperado. Observa-se também um aumento de ligações (1→6) de 28,6 no polissacarídeo nativo para 78,4% após oxidação (Tabela 10), de acordo com os resultados observados nas análises de RMN.

Estes dados confirmam a degradação das unidades de β -D-Glcp, ou TNR, presentes nas ramificações. Sendo assim, algumas das ramificações estariam constituídas por somente uma unidade β -D-Glcp enquanto outras (~7%) estariam constituídas por duas unidades de β -D-glucose (1→3) ligadas. Após degradação, a glucose que estava ramificada por apenas um TNR tornou-se apenas (1→6)-ligada, enquanto a que possuía ramificação dissacarídica permaneceu (1→6)(1→3), indicando a degradação de somente um TNR e a permanência do outro. A queda na porcentagem do derivado (1→3) para 1,6% supõe a presença destas ligações nas ramificações e não na cadeia principal, o que permitiu sua degradação.

TABELA 10. Análise de metilação de fração polissacarídica submetida a degradação controlada de Smith IAQ-s

Acetatos de alditóis parcialmente O-metilados ^a	IAQ-e ^c	IAQ-s	Rt ^b	Ligação
2,3,4,6-Me ₄ -Glc	36,1	9,1	1	Glcp-(1→
2,4,6-Me ₃ -Glc	7,1	1,6	1,265	→3)-Glcp-(1→
2,3,4-Me ₃ -Glc	28,6	78,4	1,394	→6)-Glcp-(1→
2,4-Me ₂ -Glc	28,2	10,9	1,946	→3,6)-Glcp-(1→

^a mol % dos monossacarídeos quantificados na forma de acetato de alditóis parcialmente metilados, analisados em GC-MS; ^b Tempo de retenção em relação ao tetra-metil Glcp. ^c fração a ser comparada

De acordo com os resultados obtidos através de todas as análises químicas e espectroscópicas aqui apresentadas, sugere-se que o polissacarídeo de reserva sintetizado pela microalga marinha *Isochrysis galbana* seja constituído por uma cadeia principal de β -D-glucose (1→6)-ligada,

unidades ramificadas em C-3, ou seja, β -D-glucana (1 \rightarrow 6)(1 \rightarrow 3), em proporções semelhantes. A ramificação em C-3 é composta por dois tipos: unidades simples de glucose e dissacarídeos de β -D-glucose (1 \rightarrow 3) ligados, em menor proporção.

Além disso, propõe-se que as unidades não substituídas, β -D-glucose (1 \rightarrow 6)-ligadas, e substituídas, β -D-glucose (1 \rightarrow 6)(1 \rightarrow 3)-ligadas, estejam dispostas em blocos, o que permitiu a obtenção de fragmentos resistentes a oxidação com periodato que puderam ser recuperados após a hidrólise parcial e diálise. Sendo assim, a estrutura sugerida para o polissacarídeo obtido de *I. galbana* encontra-se representada na Figura 24.

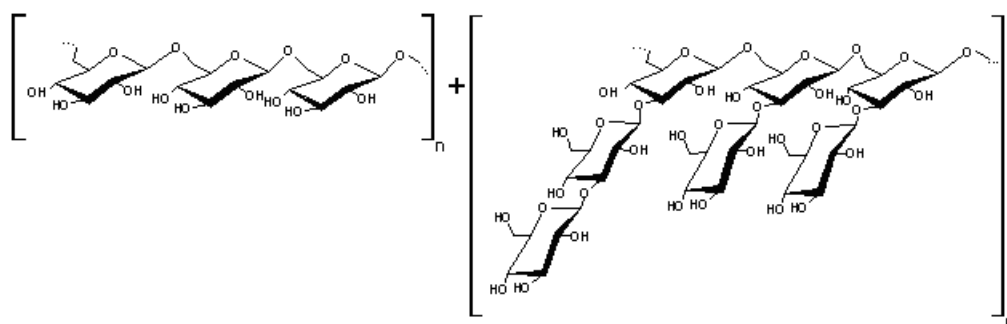


FIGURA 24. Estrutura proposta para o polissacarídeo sintetizado por *I. galbana*

Na literatura, descreve-se como produto de reserva das Prymnesiophyta, um polissacarídeo constituído por unidades de glucose, formado por ligações glicosídicas β -(1 \rightarrow 3), que ocorre no interior de vacúolos citoplasmáticos (RIJSSEL *et al.*, 2000; GRANUM e MYKLESTAD, 2002; LOURENÇO, 2006). Porém, segundo JANSE *et al.* (1996), a substância de reserva identificada para este grupo pode ser tanto uma β -glucana (1 \rightarrow 3)-ligada, ramificada em β -(1 \rightarrow 6) quanto uma β -glucana (1 \rightarrow 6), substituída por cadeias laterais na posição β -(1 \rightarrow 3).

A estrutura proposta no presente trabalho é semelhante à sugerida por VARUM *et al.* (1986), para a microalga *E. huxleyi*. Porém, estes autores concluíram que o polissacarídeo sintetizado por esta espécie de microalga teria cadeia principal formada por unidades de β -D-glucose (1 \rightarrow 6)-ligadas, e ramificações em C-3 constituídas por dissacarídeos (1 \rightarrow 6) ligados, devido à não degradação da molécula quando tratada com a enzima *exo*-(1 \rightarrow 3)- β -D-

glucanase. Apesar da similaridade dos resultados, e de não realizar o tratamento com esta enzima, o polímero proposto para *I. galbana* deve possuir a estrutura proposta na Figura 24, com a presença de unidades (1→6)(1→3) após o tratamento, indicando a permanência de unidades ligadas ao C-3, o que não ocorreria se a ramificação fosse constituída por dissacarídeos (1→6) ligados e, assim, totalmente oxidada.

6.3 *Thalassiosira fluviatilis*

6.3.1 Análise da biomassa

Os resultados da composição química da biomassa de *T. fluviatilis* indicaram que esta espécie de diatomácea é composta por 26,8% de carboidratos totais, 19,2% de proteínas e 27,5% de lipídeos.

6.3.2 Extração dos polissacarídeos

Os polissacarídeos da diatomácea *Thalassiosira fluviatilis* foram extraídos em meio ácido, constituído por uma solução de H_2SO_4 0,05 M. A biomassa liofilizada foi extraída a 60 °C, durante 10 min, conforme o estabelecido por GRANUM e MYKLESTAD (2002) para obtenção dos polissacarídeos de reserva de diatomáceas (Figura 25).

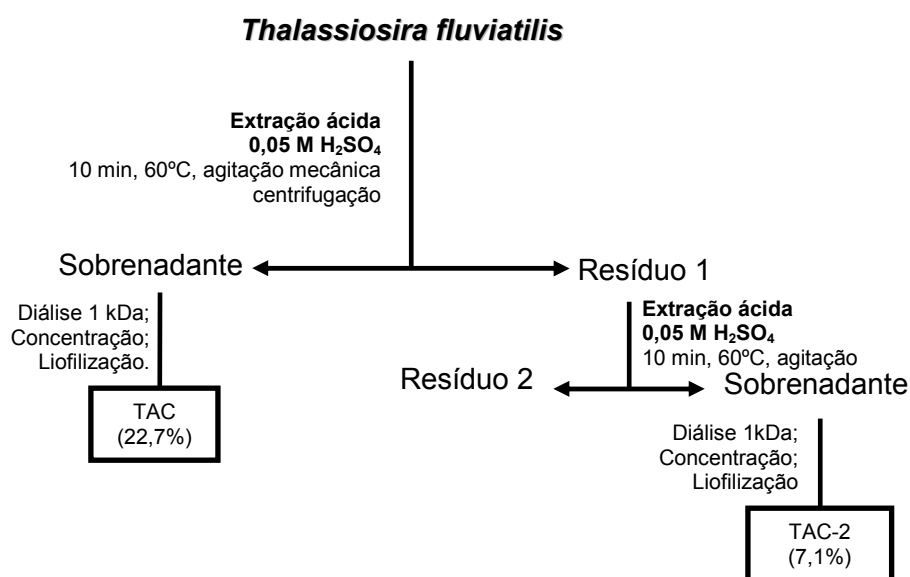


FIGURA 25. Fluxograma de extração dos polissacarídeos de *T. fluviatilis*

O sobrenadante da extração foi isolado por centrifugação, neutralizado com NaOH, em seguida dialisado com membrana de 1 kDa de *cut off* e liofilizado. A fração obtida após centrifugação foi denominada TAC, que representou 22,7% da biomassa inicial.

A biomassa residual da primeira extração foi submetida à segunda extração seqüencial sob as mesmas condições para avaliar o rendimento e percebeu-se que a maior parte do polissacarídeo é extraída durante o primeiro procedimento. A fração foi denominada TAC-2 (7,1% de rendimento). A biomassa residual desta extração ácida seqüencial foi analisada quanto à quantidade de carboidratos, apresentando 3,8%. Desta forma, pode-se concluir que a maior quantidade de polissacarídeos é extraída durante o primeiro procedimento.

6.3.3 Caracterização dos polissacarídeos isolados de *T. fluviatilis*

O perfil cromatográfico da fração TAC, obtido por análise em HPSEC-MALLS, indicou que os polissacarídeos presentes apresentariam baixa massa molar, visto que não foram detectados sinais no espalhamento de luz, e o índice de refração apenas apresentou picos no final da cromatografia. Analisando o cromatograma, observa-se ainda a possibilidade de que alguns dos picos presentes fossem produtos da presença de sais, principalmente aqueles eluídos em 60 min ou após este tempo.

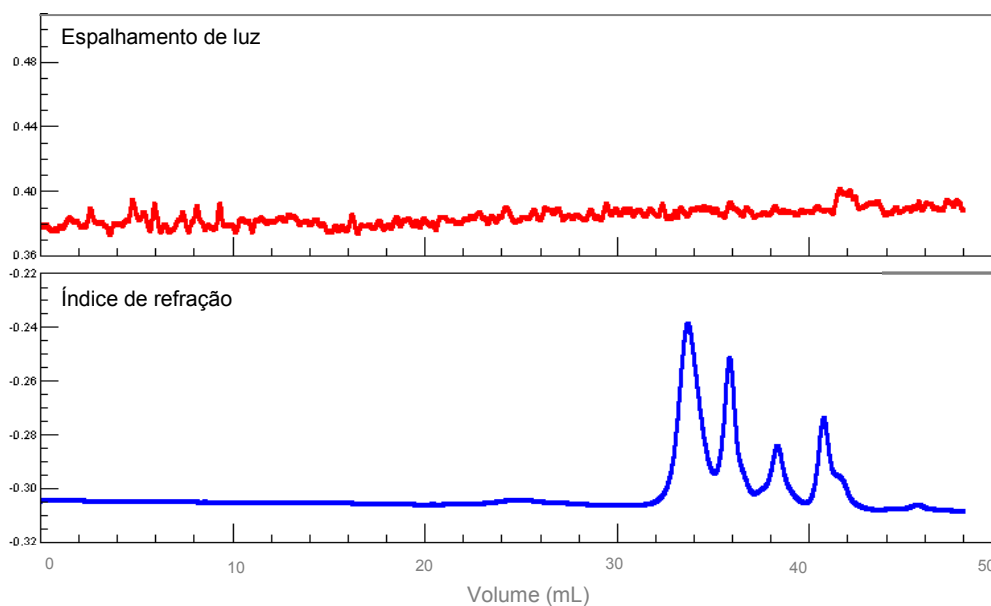


FIGURA 26. Perfil de eluição por HPSEC-MALLS da fração TAC

6.3.4 Purificação da fração polissacarídica bruta TAC

Para testar a hipótese anteriormente citada, a fração polissacarídica bruta isolada de *T. fluviatilis* foi submetida a um processo de diálise. Para isso, a amostra TAC foi ressolubilizada em água Mili-Q e submetida à diálise exaustiva em membrana de 1 kDa de *cut off*, contra água Milli-Q. A fração dialisada, que permaneceu na membrana, foi denominada TAC-d e representou 80% da fração inicial TAC. Após diálise, pode-se perceber, através da análise do perfil cromatográfico, que os picos na região de 60-70 min praticamente desapareceram confirmando que indicavam a presença de sais (Figura 27). Ao mesmo tempo percebe-se o aparecimento de sinal no Espalhamento de Luz, referente a uma molécula de maior tamanho (35-45 min), porém em pequena quantidade. Esta macromolécula, possivelmente não foi detectada na primeira análise devido ao peso do sal na amostra, que pode ter influenciado a representação real da fração no primeiro experimento.

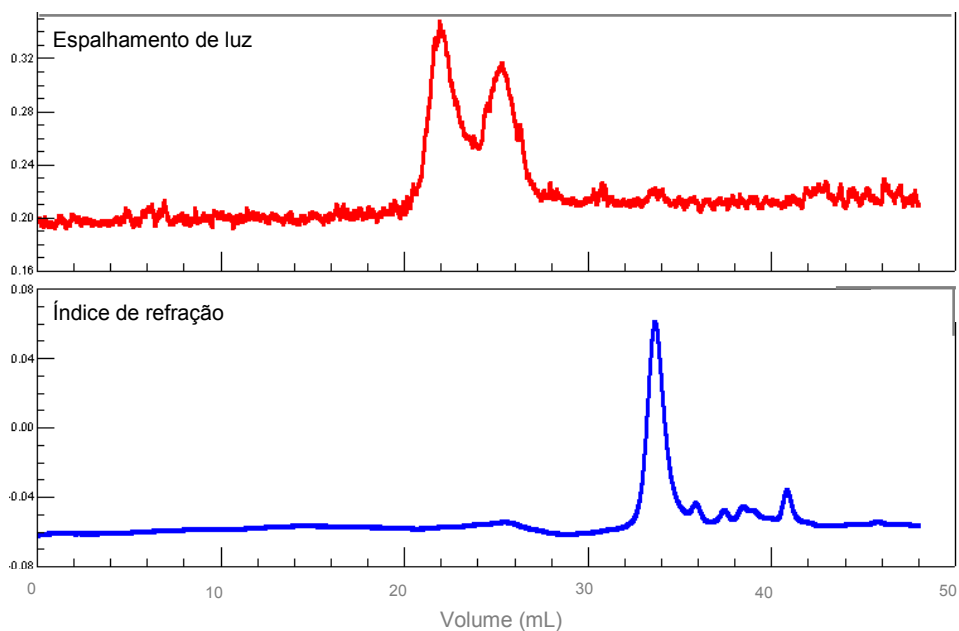


FIGURA 27. Perfil de eluição por HPSEC-MALLS da fração TAC-d

Com a finalidade de separar as duas moléculas visualizadas no perfil cromatográfico e obter somente a molécula de menor tamanho, foi realizada ultrafiltração em membrana de 0,1 μm . Desta forma, obteve-se a fração eluída, denominada TAC-e (79% de rendimento), que apresentou um perfil de eluição simétrico, podendo ser considerada homogênea quanto à sua massa molecular (Figura 28). A massa molecular ponderal média da molécula foi determinada através do cálculo de dn/dc e apresentou valor de 11,7 kDa.

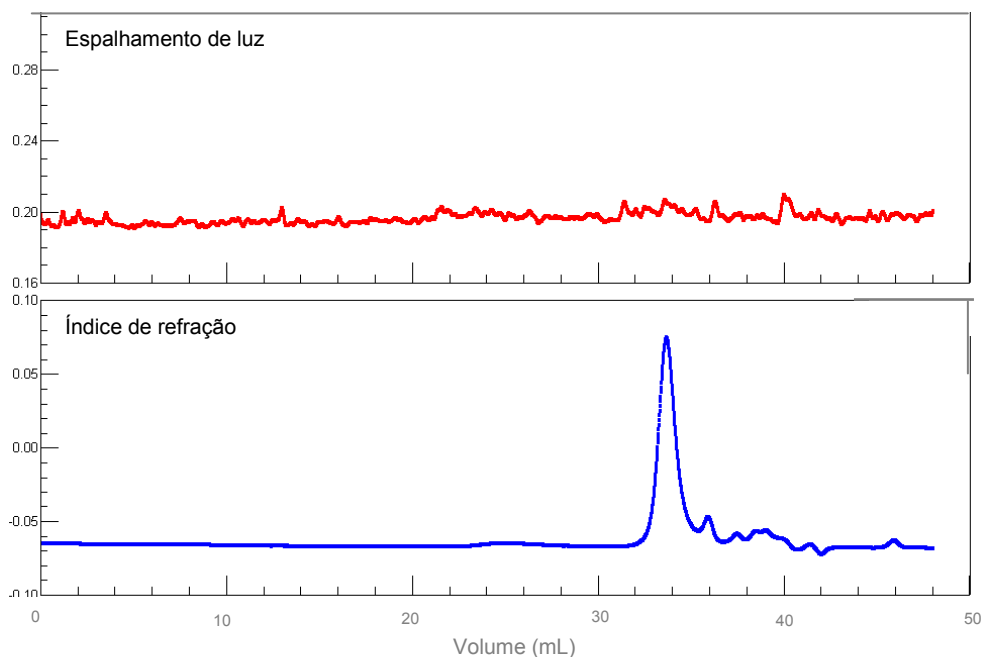


FIGURA 28. Perfil de eluição por HPSEC-MALLS da fração TAC-e

6.3.5 Caracterização química das frações

As análises químicas, tanto da fração bruta (TAC) quanto da fração purificada (TAC-e), apresentaram similaridade. Observa-se a presença majoritária de carboidratos, que aumentou de 52,4% para 59,9% após purificação, e pequena quantidade dos demais compostos (Tabela 11).

TABELA 11. Caracterização química das frações de *T. fluviatilis*

Frações	Carboidrato (%) ^a	Proteína (%) ^b	Sulfato (%) ^c	Ácido urônico (%) ^d
TAC	52,4	2,6	4,3	tr ^e
TAC-e	59,9	2,1	4,1	tr

a, b, c, d = Determinado pelos métodos: DUBOIS *et al.* (1956); LOWRY *et al.* (1951); DOGSON e PRICE (1962); FILIZETTI-COZZI e CARPITA (1991), respectivamente. ^e traço.

A composição monossacarídica demonstrou que, assim como os polissacarídeos extraídos das outras espécies de microalgas, o produto de reserva da diatomácea *T. fluviatilis* é constituído por mais de 90% de glucose, identificando uma glucana (Tabela 12).

TABELA 12. Caracterização monossacarídica das frações de *T. fluviatilis*

Monossacarídeos (Mol%) ^a	TAC	TAC-e
Ramnose	3,7	1,2
Fucose	-	2,4
Ribose	1,8	0,3
Arabinose	0,3	0,3
Xilose	0,7	0,6
Manose	-	0,4
Galactose	-	0,7
Glucose	93,5	94,1

^a Monossacarídeos quantificados em moles%, na forma de acetato de alditóis, por GLC.

6.3.6 Análise de Ressonância Magnética Nuclear – RMN de ^{13}C

O espectro de RMN de ^{13}C da fração TAC apresentou 6 sinais principais, sendo que na região de C-1 observa-se 1 sinal anomérico em 102,5 ppm, característico de anomericidade β das unidades de glucose (Figura 29a). O deslocamento em δ 84,8 é característico de unidades de β -D-glucose ligadas (1 \rightarrow 3), enquanto os demais sinais em δ 73,2; δ 68,4 e δ 75,7 estão relacionados aos C-2, C-4 e C-5, respectivamente. O assinalamento em 61,0 ppm corresponde ao C-6 livre destas unidades de β -D-glucose ligadas (1 \rightarrow 3), confirmado pela inversão de $-\text{CH}_2$ no espectro de RMN ^{13}C -DEPT (Figura 29b). A inversão de somente um sinal no espectro de DEPT, em 61,0 ppm, indica a ausência de C-6 ligado na molécula, em proporções significativas. O espectro de RMN é representativo de uma crisolaminarana, já extraídas de outras diatomáceas (ALEKSEEVA *et al.*, 2004; STØRSETH *et al.*, 2005).

Os pequenos sinais observados em δ 95,9 e 92,2 representam os terminais redutores da cadeia, fechando em β e α , respectivamente (KIM *et al.*, 2000; STØRSETH *et al.*, 2004). Esta evidência, juntamente com o observado pelo perfil de eluição em HPSEC-MALLS, confirma que a β -D-glucana (1 \rightarrow 3)-ligada extraída da *T. fluviatilis* é um polímero de baixa massa molecular.

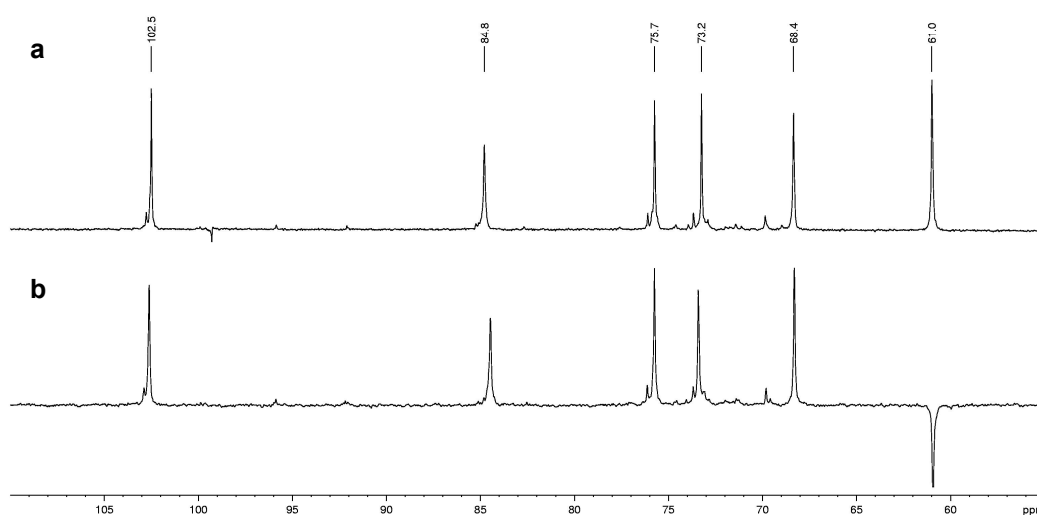


FIGURA 29. Espectro de RMN de ^{13}C (a) e RMN DEPT (b) da fração TAC. Solvente D_2O , temperatura: 40°C

6.3.7 Análise de RMN bidimensional – HSQC

A análise do espectro de HSQC permite correlacionar os sinais de ^{13}C e ^1H e com isso observar a presença de 6 acoplamentos (Figura 30). Na região do C-1/H-1 o acoplamento encontra-se em 102,5/4,78 ppm, confirmando as ligações do tipo β . Em 61,0 ppm, que representa o C-6 livre (sinal invertido pelo experimento de DEPT) observa-se a presença dos acoplamentos em 3,91 e 3,75 ppm característicos de H-6 e H-6', respectivamente.

Na região do C-3 ligado encontra-se o acoplamento em δ 84,8/3,78 (C3-H3). Os demais sinais de H^1 puderam ser assinalados através do acoplamento com ^{13}C , para C-2, C-4 e C-5 (Tabela 13).

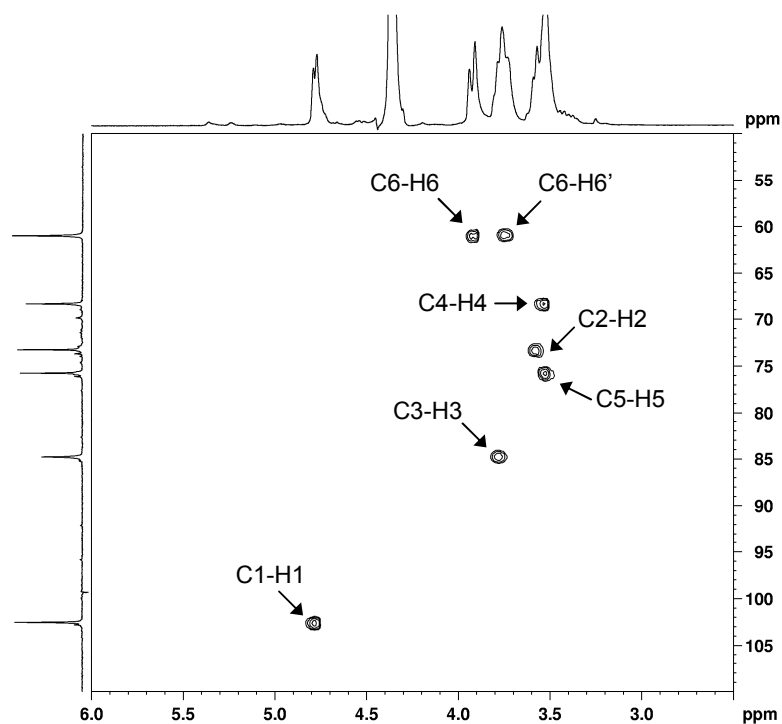


FIGURA 30. Espectro de correlação HSQC da β -D-glucana da fração TAC

TABELA 13. Deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C (δ) da β -D-glucana de TAC

	β -D-Glcp-(1 \rightarrow 3)	
	^1H	^{13}C
H-1/C-1	4,78	102,5
H-2/C-2	3,57	73,2
H-3/C-3	3,78	84,8
H-4/C-4	3,52	68,4
H-5/C-5	3,54	75,5
H-6/C-6	3,91	61,0
H-6'/C-6	3,75	

Solvente D_2O , temperatura: 80°C .

Para a fração TAC também foi realizado RMN ^{13}C tendo como solvente da amostra o $\text{Me}_2\text{SO}-d_6$ a fim de comparar a β -D-glucana (1 \rightarrow 3) extraída da microalga *T. fluviatilis* e demais β -D-glucanas (1 \rightarrow 3) previamente estudadas (Tabela 14).

TABELA 14. Assinalamentos de RMN de ^{13}C da fração TAC solubilizada em $\text{ME}_2\text{SO}-d_6$ em comparação com outros estudos.

	<i>Thalassiosira fluviatilis</i> (diatomácea)	<i>Ganoderma resinaceum</i> (fungo)	<i>Pleurotus tuber-regium</i> (fungo)	<i>Chaetoceros mulleri</i> (diatomácea)
	β -Glc (1 \rightarrow 3) ^a	β -Glc (1 \rightarrow 3) ^b	β -Glc (1 \rightarrow 3) ^c	β -Glc (1 \rightarrow 3) ^d
C1	103,1	102.9	102.6	102,7
C2	73,0	72.8	72.8	73,4
C3	86,3	86.2	85.9	84,4
C4	68,6	68.5	68.1	68,3
C5	76,5	76.4	75.6	75,8
C6	61,0	60.9	60.3	60,9

^a Presente estudo; ^b Amaral *et al.*, 2008; ^c Chenghua *et al.*, 2000; ^d Storseth *et al.*, 2005

6.3.8 Análise de metilação da fração polissacarídica purificada TAC-e

Para maior entendimento da estrutura química do polissacarídeo, foi realizada análise de metilação da fração TAC-e (Tabela 15). Os resultados

confirmam o observado nos espectros de RMN e demonstram que a maior parte da molécula é constituída por unidades de glucose (1→3) ligadas, correspondendo a 75,5% do total do polímero. Porém, a metilação apresenta a existência de uma pequena percentagem de ramificação (4,5%) em C-6, não identificada pelos espectros de RMN. Observa-se também uma pequena quantidade de unidades de glucose (1→4) ligadas, que correspondem a 4,6% do total do polímero.

TABELA 15. Análise de metilação da fração polissacarídica purificada TAC-e

Acetatos de alditóis parcialmente O-metilados ^a	TAC (%)	Rt ^b	Ligação
2,3,4,6-Me ₄ -Glc	15,4	1	Glc β -(1→
2,4,6-Me ₃ -Glc	75,5	1,269	3)-Glc β -(1→
2,3,6-Me ₃ -Glc	4,6	1,393	4)-Glc β -(1→
2,4-Me ₂ -Glc	4,5	1,945	3,6)-Glc β -(1→

^a mol % dos monossacarídeos quantificados na forma de acetato de alditóis parcialmente metilados, analisados em GC-MS; ^b Tempo de retenção em relação ao tetra-metil-Glc β .

6.3.9 Degradação controlada de Smith da fração polissacarídica TAC

Sequencialmente, o polissacarídeo foi submetido à degradação de Smith, com o objetivo de melhor elucidar sua estrutura. Entretanto, a fração resultante deste procedimento, denominada TAC-s, apresentou baixo rendimento (40%), diferente do esperado para um polissacarídeo com grande quantidade de ligações (1→3), que não deveriam ser oxidadas.

O RMN de ¹³C da fração TAC-s demonstrou a predominância de β -D-glucana (1→3) ligada (Figura 31a). A presença de outros sinais de pequena intensidade no espectro pode estar relacionada às extremidades da estrutura que foi oxidada e teve seu tamanho diminuído, como o sinal de C-1 em 104,1 ppm.

Na região de C-6, os sinais em 63,0 e 61,5 ppm (invertidos pelo experimento de DEPT) (Figura 31b) podem ser representativos dos Terminais não redutores (TNR) e dos Terminais Redutores reduzidos com NaBH₄ (TRr), identificados estrutura representada na Figura 31. O pico de maior intensidade (60,8 ppm) representa o C-6 da cadeia (1→3) ligada.

A permanência de uma estrutura (1→3) ligada após degradação de Smith, identificada pelos sinais de RMN de maior intensidade, permite inferir que a cadeia principal do polímero é composta por este tipo de ligação, diferentemente do encontrado para *I. galbana*.

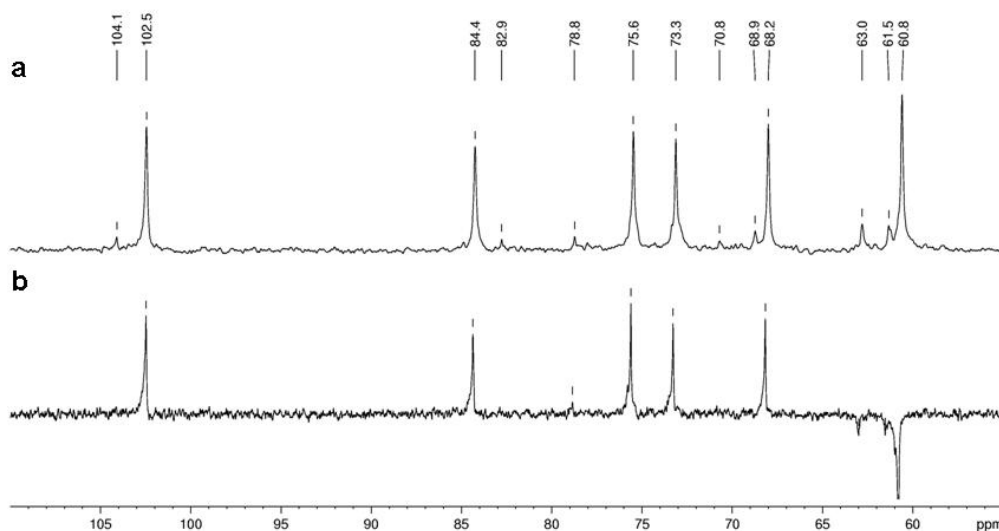


FIGURA 31. Espectro de RMN de ^{13}C (a) e RMN-DEPT (b) da fração TAC-s

Através dos resultados obtidos até então, sugere-se que o polissacarídeo extraído da microalga *T. fluviatilis* é do tipo crisolaminarano, sendo constituído principalmente por β -D-glucana (1→3)-ligada (~75%), com pequena proporção de unidades (1→4)-ligadas além de substituição no C-6 por unidades simples de glucose (Figura 32). Após a degradação de Smith observa-se a permanência das unidades de β -D-glucose (1→3)-ligadas sem ramificações (Figura 33).

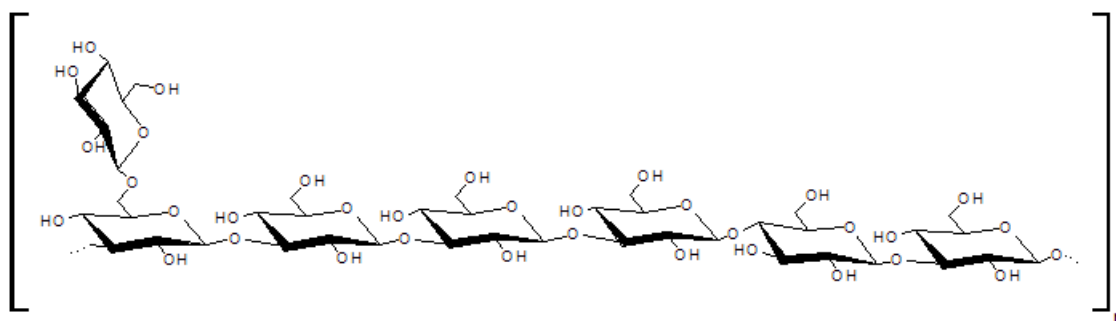


FIGURA 32. Estrutura proposta para o polissacarídeo solúvel em água extraído de *T. fluviatilis*

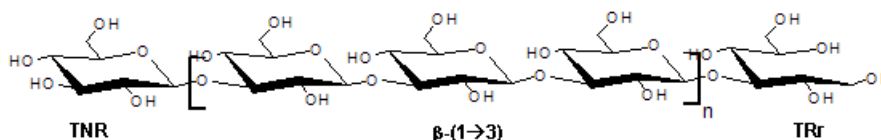


FIGURA 33. Estrutura proposta para o polissacarídeo após degradação de Smith (TAC-s)

Polissacarídeos de diatomáceas são frequentemente divididos em três grupos: os polissacarídeos de parede celular, as mucilagens extracelulares e os polissacarídeos de reserva β -(1 \rightarrow 3)-glucanas (GRANUM e MYKLESTAD, 2002). A parede celular das diatomáceas é composta por sílica e invólucros orgânicos que contêm heteropolissacarídeos com ampla variação na proporção de galactose, glucose, manose (e seus correspondentes ácidos urônicos), xilose, fucose, ramnose e outros resíduos, podendo variar entre diferentes espécies (FORD e PERCIVAL, 1965; GRANUM e MYKLESTAD, 2002). Estes heteropolissacarídeos de parede celular podem ser obtidos de diatomáceas através de extração alcalina (LOPES, 2003; ASCÊNCIO, 2004). As mucilagens extracelulares possuem composição variada, podendo ser a glucose o mais abundante monômero excretado durante a fase exponencial, como o observado para três espécies de diatomáceas por URBANI *et al.* (2005), ou então outros monossacarídeos como a manose, fucose, galactose, em diferentes proporções (PERCIVAL *et al.*, 1980; ASCENCIO, 2004). Os produtos de reserva consistem em gotículas de gordura no citoplasma e/ou um polissacarídeo solúvel derivado de glucose formado por ligações glicosídicas β -(1 \rightarrow 3), a crisolaminarana ou laminarana (LOURENÇO, 2006).

As β -(1 \rightarrow 3)-glucanas, ou laminaranas, competem com a celulose quanto ao mais abundante carboidrato do planeta e a principal reserva alimentar das diatomáceas (PAINTER, 1983; McCONVILLE *et al.*, 1986; PAULSEN e MYKLESTAD, 1978). As que são encontradas nas diatomáceas têm sido chamadas de leucosina ou crisolaminarana (GRANUM e MYKLESTAD, 2002), que se diferenciam da laminarana de algas marrons devido à ausência do seu conteúdo de manitol (PAINTER, 1983).

Os métodos utilizados para extração de crisolaminaranas de diatomáceas geralmente envolvem disrupção celular através do tratamento com ácido diluído, como realizado no presente trabalho. Segundo PAINTER

(1983), através de hidrólise ácida em diatomáceas foi isolada a laminarana cristalina, sendo 99,5% de seu conteúdo composto por D-glucose. Entretanto, CHIOVIOTTI *et al.* (2004) extraíram β -D-glucanas (1 \rightarrow 3) de algumas espécies de diatomáceas, tais como *Cylindrotheca fusiformis*, *Craspedostauros australis* e *Thalassiosira pseudonana* em meio aquoso à quente, e puderam descrever a presença destas moléculas nos vacúolos intracelulares destes microorganismos.

No presente trabalho foi isolada uma β -(1 \rightarrow 3)-glucana com peso molecular de 11,7 kDa, estando este dado de acordo com o afirmado por McCONVILLE *et al.* (1986) e PAULSEN e MYKLESTAD (1978), de que as crisolaminaranas isoladas deste grupo são β -(1 \rightarrow 3)-glucanas, com peso molecular de 1-10 kDa e com variação no grau de ligação nas posições β -(1 \rightarrow 2) e (1 \rightarrow 6). Para *T. fluviatilis*, investigada por este trabalho, porém, encontrou-se pequeno grau de ligação na posição β -(1 \rightarrow 4).

STØRSETH *et al.* (2005), identificaram a presença de crisolaminaranas como polissacarídeos de reserva nas espécies de diatomáceas *Chaetoceros mulleri* e *Thalassiosira weissflogii*, caracterizando ambas como β -(1 \rightarrow 3)-glucanas, ramificadas na primeira espécie e lineares na segunda. Dessa forma, a estrutura das crisolaminaranas pode variar de acordo com a espécie e seu rendimento mudar com os diferentes estágios de crescimento das microalgas (STØRSETH *et al.*, 2005). Em 2006 foi identificada uma β -glucana (1 \rightarrow 3) presente na diatomácea *Chaetoceros debilis* com grande quantidade de unidades β -glucose (1 \rightarrow 6), até então não reportada para diatomáceas (STØRSETH *et al.*, 2006). Isto exemplifica a variedade de estruturas de crisolaminaranas que podem ser encontradas até mesmo dentro de um mesmo gênero.

6.4 ATIVIDADE BIOLÓGICA DOS POLISSACARÍDEOS

Os macrófagos são responsáveis por numerosos processos homeostáticos, imunológicos e inflamatórios e constituem uma defesa imediata contra elementos estranhos ao organismo (MORETÃO, 2004).

Durante o desencadeamento da resposta imune, os macrófagos produzem moléculas sinalizadoras como as citocinas e quimiocinas (IL 1 β , IL

1 α , IL 6, TNF- α , entre outras) de forma muito rápida, além de ativarem aspectos funcionais como: síntese de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, produção de óxido nítrico, ativação da capacidade fagocítica, produção de proteoglicanos, entre outros (MORETÃO, 2004; BRACHT, 2006). Com isso, avaliar a atividade fagocítica de macrófagos é um dos métodos para determinar a estimulação da atividade imunomodulatória nestas células.

Neste trabalho, a avaliação do potencial imunoestimulante dos polissacarídeos obtidos das 3 espécies de microalgas marinhas, *Tetraselmis gracilis*, *Isochrysis galbana* e *Thalassiosira fluviatilis*, foi realizada através da determinação da ativação da capacidade fagocítica em macrófagos da linhagem RAW 264,7, tratados por estes polímeros.

6.4.1 Teste de Viabilidade Celular

Em ensaios de atividade biológica, usualmente se faz necessário o estabelecimento das concentrações ideais para incubação dos compostos a serem estudados, de forma a evitar que doses excessivas causem danos à viabilidade celular. Para tanto, foram realizados testes que avaliem o efeito na viabilidade celular de macrófagos RAW 264,7 em diferentes concentrações das frações polissacarídicas TEQ (extrato aquoso de *T. gracilis*), TEL (extrato alcalino de *T. gracilis*), IAQ (extrato aquoso de *I. galbana*) e TAC (extrato ácido de *T. fluviatilis*).

Inicialmente foi realizado um experimento com as concentrações 25, 50 e 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Nestas condições experimentais os polissacarídeos testados apresentaram alto efeito citotóxico para as células de macrófagos RAW 264,7, visto que a viabilidade esteve próxima a 60 % em todos os tratamentos. Esta alta citotoxicidade observada levou à diminuição das concentrações nos experimentos posteriores para 2,5; 5; 10 e 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Os resultados dos testes de viabilidade indicaram que todos os polímeros apresentaram diferença significativa com relação ao tratamento em meio de cultura sem os polissacarídeos, denominado controle. Os polímeros TEL e TAC, nas concentrações 2,5; 5; 10 e 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, não apresentaram altos efeitos citotóxicos para as células (Figura 34 b e d). Já os polímeros TEQ e IAQ

apresentaram alta citotoxicidade sob essas concentrações (Figura 34 a e c), necessitando serem testados novamente sob concentrações menores.

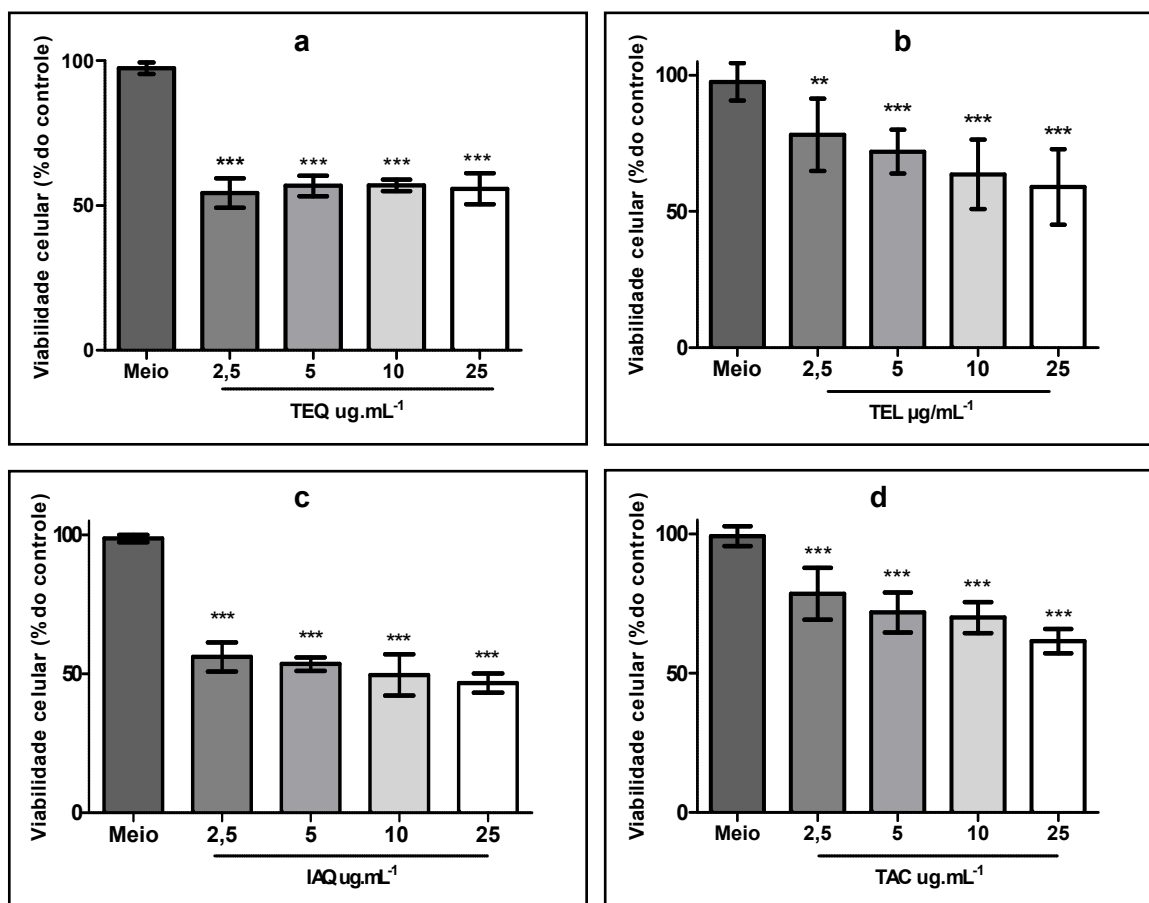


FIGURA 34. Macrófagos RAW 267.4 aderentes foram incubados por 24 horas na presença dos polissacarídeos TEQ (a), TEL (b), IAQ (c) e TAC (d) nas concentrações 2,5; 5; 10 e 25 µg.mL⁻¹. Viabilidade celular determinada pelo teste do MTT. 100% de viabilidade corresponde à viabilidade determinada para as células incubadas em meio DMEM. Os resultados estão expressos como média e desvio padrão de três experimentos independentes em quadruplicata para cada concentração. ***Diferença significativa do controle <0,001; **Diferença significativa do controle <0,01

Sequencialmente, portanto, foram realizados novos experimentos para determinar o efeito citotóxico dos polímeros TEQ e IAQ nas concentrações 0,5 e 1 µg.mL⁻¹. Os testes de viabilidade indicaram que, sob estas concentrações menores, estes polissacarídeos apresentaram citotoxicidade menor para as células (Figura 35).

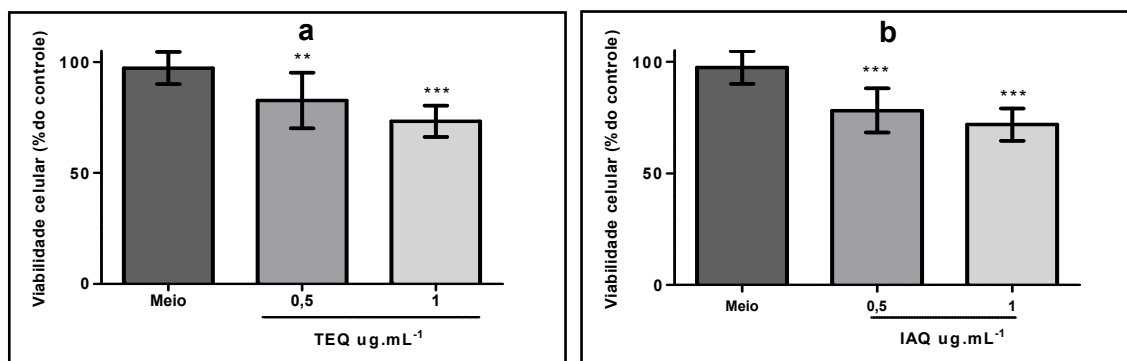


FIGURA 35. Macrófagos RAW 267.4 aderentes foram incubados por 24 horas na presença dos polissacarídeos TEQ (a) e IAQ (b) nas concentrações 0,5 e 1,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Viabilidade celular determinada pelo teste do MTT. 100% de viabilidade corresponde à viabilidade determinada para as células incubadas em meio DMEM. Os resultados estão expressos como média e desvio padrão de três experimentos independentes em quadruplicata para cada concentração. ***Diferença significativa do controle $<0,001$.

Os resultados de viabilidade celular possibilitaram o estudo do efeito biomodulador destes polímeros tornando possível a avaliação da atividade fagocítica em macrófagos RAW 264,7.

6.4.2 Avaliação da atividade fagocítica

A fagocitose constitui a primeira linha de defesa imune contra elementos estranhos, sendo que esta função aumenta durante o processo de ativação do macrófago. Para este estudo foi avaliada a ativação desta função em macrófagos da linhagem RAW 264,7, sendo utilizadas leveduras como partícula fagocítica.

Para isso as células de macrófagos RAW 264,7 foram submetidas ao tratamento com 3 concentrações para cada polissacarídeo, determinadas a partir da avaliação de seus efeitos citotóxicos. Sendo assim, foram utilizadas as concentrações 0,25; 0,5 e 1,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para TEQ; 0,5; 1,0 e 2,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para TEL e para TAC e 0,1; 0,25 e 0,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para IAQ (Figura 36).

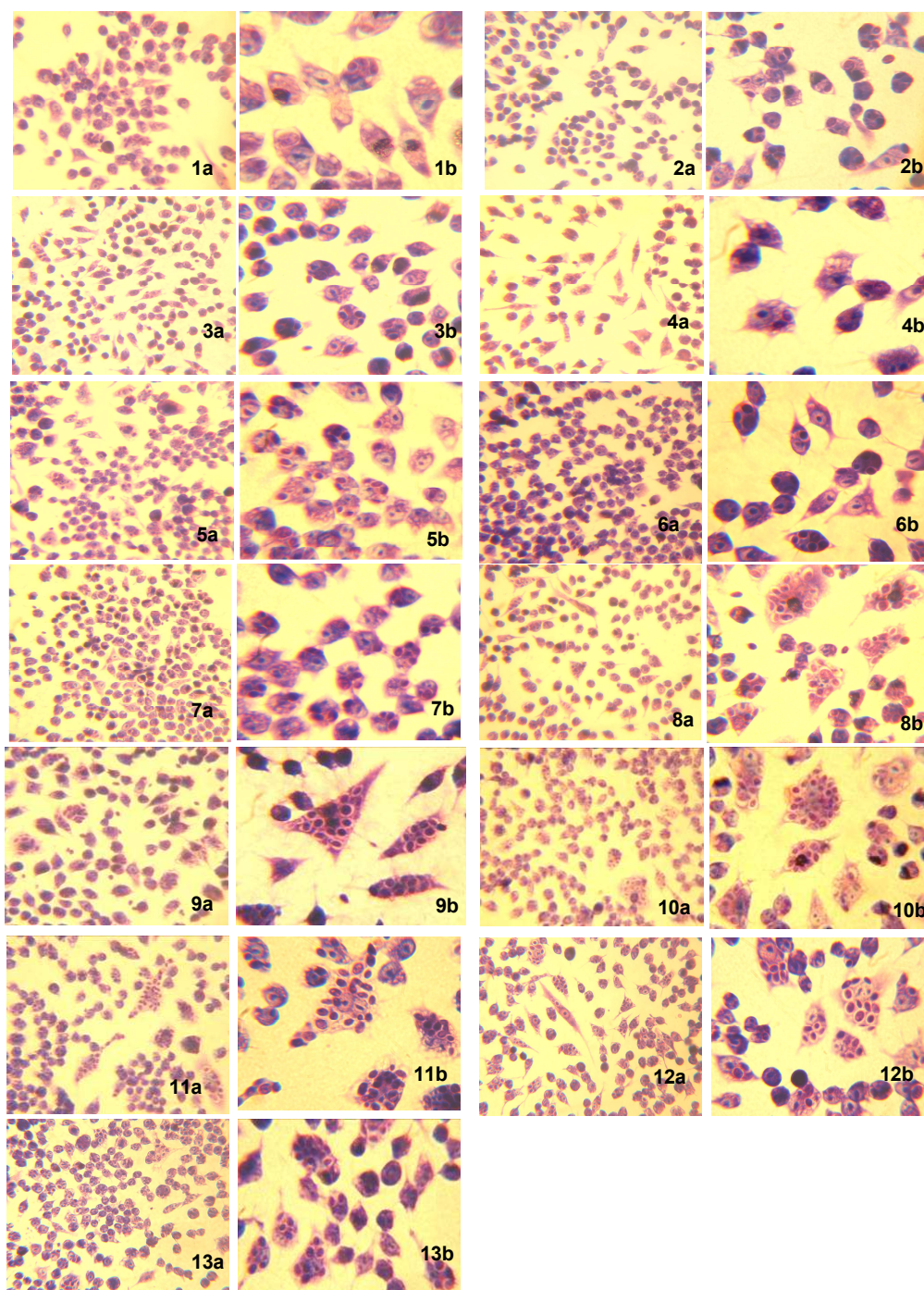


FIGURA 36. Fotos dos macrófagos aderentes em lamínulas de vidro incubados na presença de leveduras, processadas para microscopia óptica. O meio MEM foi utilizado como controle negativo. As micrografias são representativas. Aumentos: 400X (a) 1000X (b). 1) Controle; 2) TEQ $0,25 \mu\text{g.mL}^{-1}$; 3) TEQ $0,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$; 4) TEQ $1,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$; 5) TEL $0,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$; 6) TEL $1,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$; 7) TEL $2,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$; 8) IAQ $0,1 \mu\text{g.mL}^{-1}$; 9) IAQ $0,25 \mu\text{g.mL}^{-1}$; 10) IAQ $0,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$; 11) TAC $0,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$; 12) TAC $1,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$; 13) TAC $2,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

A avaliação da atividade fagocítica leva em consideração a razão entre o número de leveduras fagocitadas e de macrófagos totais, sendo contados 200 macrófagos em cada lamínula. Os resultados desta relação, obtidos para os polissacarídeos testados, estão apresentados na Figura 37.

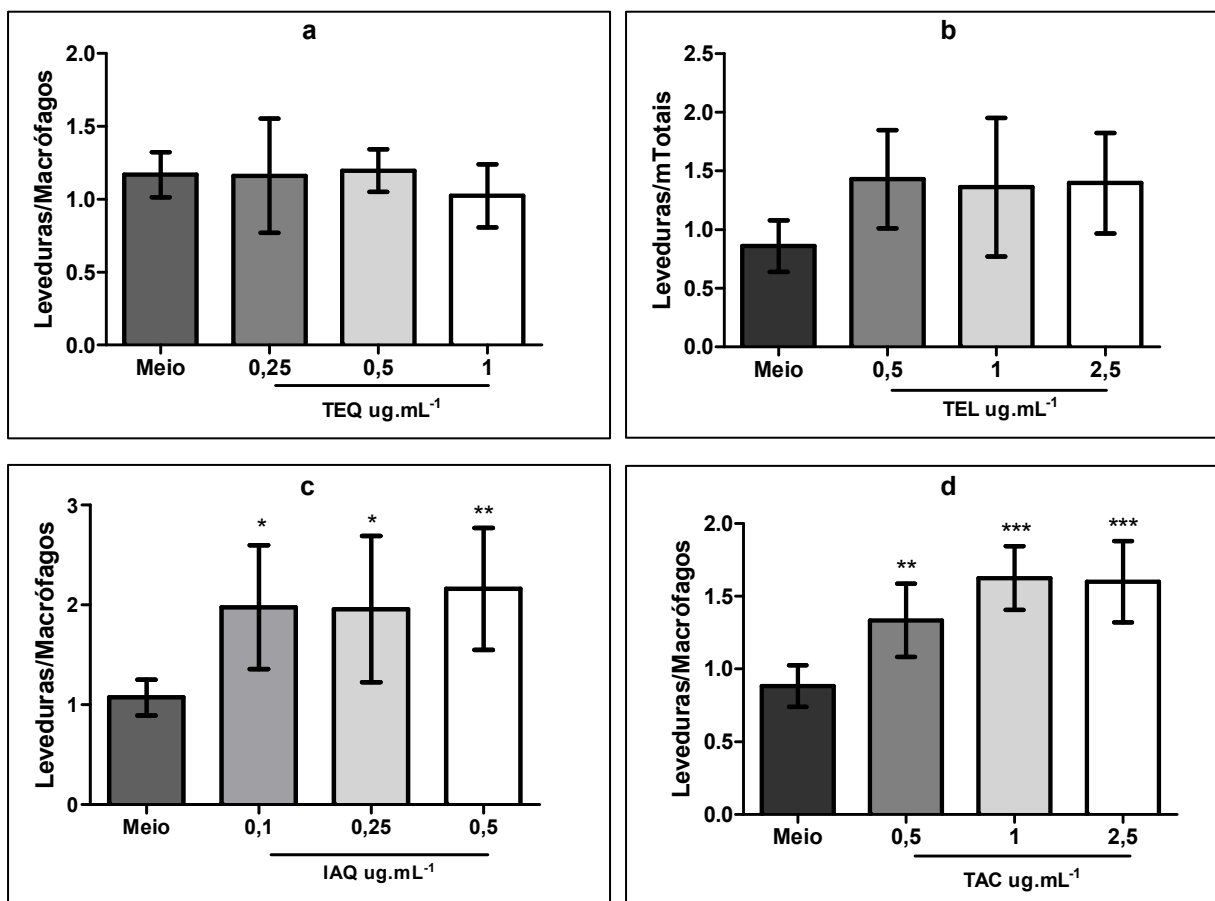


FIGURA 37. Atividade fagocítica caracterizada pela razão entre leveduras e macrófagos (eixo y). Macrófagos aderentes em lamínulas de vidro foram incubados na presença de TEQ (a), TEL (b), IAQ (c) e TAC (d) por 24h, nas concentrações indicadas. As lamínulas foram incubadas com leveduras na proporção de 5 por macrófagos. Após 1 hora de incubação as lamínulas foram processadas para microscopia óptica. O meio MEM foi utilizado como controle negativo. Os resultados estão expressos como média e desvio padrão de três experimentos independentes em triplicata para cada concentração. ***Diferença significativa do controle <0,001. **Diferença significativa do controle <0,01. *Diferença significativa do controle <0,05.

Pode-se observar através da Figura 37a e 37b que as α -glucanas TEQ e TEL não apresentaram diferença significativa entre as células tratadas com os

respectivos polissacarídeos e as células imersas em meio sem tratamento, ou seja, estes polímeros não ativaram a capacidade fagocítica dos macrófagos.

Com relação às β -glucanas IAQ e TAC, observa-se que estes polímeros foram capazes de aumentar significativamente a atividade dos macrófagos quando comparadas ao controle negativo. Sendo assim, a β -D-glucana (1 \rightarrow 3), de baixa massa molecular e pouca ramificação, conforme estrutura determinada para TAC neste trabalho, foi a que apresentou melhores resultados quanto à ativação da fagocitose em macrófagos RAW 264,7 além de menor citotoxicidade.

O princípio o qual os imunomoduladores operam é primariamente baseado na estimulação de determinadas funções específicas e não específicas do sistema imune (OKAZAKI et al., 1995; KULICKE et al., 1997). Neste estudo utilizando glucanas como estimuladoras da atividade fagocítica em macrófagos, observa-se claramente um aumento da capacidade de fagocitose nas células tratadas com as β -glucanas extraídas das microalgas *Isochrysis galbana* e *Thalassiosira fluviatilis*, enquanto as α -glucanas obtidas da microalga *Tetraselmis gracilis* não apresentaram efeito imunoestimulatório.

São raros os estudos que avaliam a atividade biológica de α -glucanas, visto que não se têm na literatura muitas evidências de que estes polissacarídeos apresentem tal capacidade. SUARÉZ et al. (2008), ao avaliarem a atividade imunoestimulatória, através da síntese de óxido nítrico por macrófagos RAW 264.7, submetidos ao tratamento com a fração polissacarídica de baixa massa molecular α -glucose (1 \rightarrow 4) (1 \rightarrow 6) extraída da microalga *Chlorella pyrenoidosa*, não encontraram diferença com relação ao controle. Porém, STUELP-CAMPELO et al. (2002) em seu estudo com a α -D-glucana (1 \rightarrow 3) (1 \rightarrow 4) extraída do líquen *Ramalina celastri* encontraram um aumento de 70% da capacidade fagocítica em células submetidas ao tratamento.

Entretanto, com relação às β -glucanas muitos são os estudos que reconhecem sua capacidade imunoestimulatória, e procuram relacioná-la à sua estrutura (BOHN; BeMUELLER, 1995). Os receptores para β -glucanas em macrófagos vêm recebendo atenção especial nas últimas décadas, por serem capazes de ativar estas células após reconhecimento e fagocitose dos

polímeros (MORETÃO, 2004). Estudo sobre a ativação de macrófagos RAW 264.7 concluiu que estas células são capazes de incorporar (1→3)-β-D-glucanas através de mecanismos e receptores específicos (OKAZAKI et al., 1995).

BAO et al. (2001) encontraram atividade imunomodulatória, em duas estruturas distintas de β-D-(1→3)-glucanas, sendo que a que apresentou menor grau de ramificação foi a mais eficiente. OKAZAKI et al. (1995) também encontraram maior ativação de macrófagos para β-D-glucanas com baixa razão de ramificação e alto peso molecular. Porém, contraditoriamente, KULICKE et al. (1997) ao comparar a influência da estrutura molecular na atividade imunológica de quatro diferentes β-glucanas, constataram que as de baixa massa molecular são as mais eficientes. Apesar desta diferença, todas as β-glucanas investigadas apresentaram atividade maior do que o conhecido medicamento Shizophyllan (KULICKE et al., 1997). Dessa forma, decifrar as características estruturais dos polímeros testados é um pré-requisito essencial para entender como as glucanas são reconhecidas pelo sistema imune.

Muitos são os estudos que envolvem atividade biológica de β-glucanas extraídas de fungos (SUGA et al., 1984; GOMAA et al., 1992; ADACHI et al., 1994; STUELPEL-CAMPELO et al., 2002). Entretanto, o maior obstáculo da utilização clínica das β-glucanas fúngicas é sua relativa falta de solubilidade em meio aquoso (SILVA et al., 2006). As β-glucanas extraídas das microalgas marinhas neste trabalho, porém, apresentaram alta solubilidade em água.

Ainda, o fato de serem encontradas similaridades entre os polissacarídeos intracelulares e os exopolissacarídeos, liberados ao meio, de algumas espécies de microalgas como *Phaeocystis globosa* (RIJSSEL et al., 2000), *Cyandrotheca closterium*, *Thalassiosira pseudonana* e *Skeletonema costatum* (URBANI et al., 2005), estando entre estes polímeros as crisolaminaranas, pode facilitar e tornar possível a aplicação de suas propriedades imunoestimulatórias em sistemas de cultivo de camarões. Assim sendo, a utilização destas microalgas parece ser uma alternativa para melhorar o sistema imune de organismos marinhos destinados ao cultivo, que têm sido bastante suscetíveis a doenças e, dessa forma, reduzir perdas na produção (VADSTEIN, 1997).

Para uma melhor avaliação sobre o efeito imunoestimulante das glucanas, seria importante testá-las quanto à estimulação de outros parâmetros imunológicos *in vitro* e *in vivo*. A confirmação destes resultados, fazendo uso de outros testes imunológicos, seria de grande interesse para aplicação das glucanas extraídas de microalgas marinhas.

São diversas as aplicações de polímeros, semelhantes aos sintetizados pelas microalgas estudadas, como estimuladores do sistema imune em células de animais. Porém, as laminaranas, também representam compostos de elevada aplicação biológica e interesse comercial em outras áreas da ciência. Atualmente, é comercializada com a função elicitora de plantas, ativando seus mecanismos naturais de defesa, com o produto que leva o nome comercial de Vacciplant[®], pertencente à marca Natural Protect[®], produzido com laminaranas sintetizadas por macroalgas marinhas. A grande disseminação de produção de microalgas faz com que estes microorganismos possam representar uma alternativa viável para obtenção de laminaranas.

Outra aplicação biotecnológica que têm desprendido grande interesse científico e econômico nos dias atuais é a utilização de microalgas para obtenção de biodiesel. Para esta finalidade, grande quantidade de biomassa microalgal necessita ser cultivada e seus ácidos graxos extraídos por solventes orgânicos. Após este processo, grande quantidade de biomassa residual, rica em componentes polissacarídicos solúveis em meio aquoso, é gerada e poderiam ser aproveitadas para aquisição de polissacarídeos, com interesse farmacológico, científico e comercial, aplicações estas que possam minimizar os custos da produção do biodiesel e torná-la auto-sustentável.

7 CONCLUSÕES

Os resultados das análises químicas e espectroscópicas permitem concluir que a microalga marinha verde (Chlorophyta) *Tetraselmis gracilis*, pertencente à classe Prasinophyceae, sintetiza α -D-glucanas (1 \rightarrow 4) ligadas, solúveis em meio aquoso e alcalino, com ramificação em C-6 por unidades de α -D-glcp. A fração extraída em meio aquoso diferencia-se da extraída em meio alcalino, com maior rendimento, pelo maior tamanho e menor grau de ramificação. Ambas as frações representam aproximadamente 65% da biomassa microalgal inicial.

A microalga marinha da divisão Prymnesiophyta, *Isochrysis galbana*, sintetiza uma β -D-glucana (1 \rightarrow 6) ligada, com ramificações em C-3 por unidades simples de glucose, β -D-glcp, e por dissacarídeos ligados β -(1 \rightarrow 3). O polímero, extraído em água quente, representa aproximadamente 30% da biomassa microalgal e possui 18,8 KDa de peso molecular.

A diatomácea marinha *Thalassiosira fluviatilis*, pertencente à divisão Ochrophyta, sintetiza uma β -D-glucana (1 \rightarrow 3) ligada, com baixo grau de ramificação em C-6 por unidades β -D-glcp. Este polímero, extraído com ácido diluído, representa aproximadamente 22% da biomassa microalgal inicial e possui peso molecular de 11,7 KDa.

Os polissacarídeos sintetizados por estas espécies de microalgas foram testados quanto à atividade imunoestimulante. Somente as β -D-glucanas, extraídas das microalgas *Isochrysis galbana* e *Thalassiosira fluviatilis*, apresentaram ativação significativa da capacidade fagocítica das células de macrófagos incubadas com leveduras, mesmo em baixas concentrações. As α -D-glucanas extraídas da microalga *Tetraselmis gracilis* não apresentaram aumento significativo da atividade fagocítica com relação ao controle negativo.

As microalgas marinhas representam, portanto, importante fonte de polissacarídeos com elevado interesse biotecnológico, sendo que a estrutura destes polímeros pode variar consideravelmente entre diferentes grupos.

8 REFERÊNCIAS

ADACHI, Y.; OKAZAKI, M.; OHNO, n.; YADOMAE, T.; **Biological & Pharmaceutical Bulletin**. v. 17, p. 1508, 1994.

ADUAN, R.E.; VILELA, M.F.; REIS JR, F.B. Os grandes ciclos biogeoquímicos do Planeta. **Revista EMBRAPA Cerrados**. Planaltina, DF. 25p, 2004.

ALEKSEEVA, S.A.. SHEVCHEMKO, N. M.; KUSAYKIN, M.I.; PONOMORENKO, L.P.; ISAKOV, V.V.; ZVYAGINTSEVA, T.N.; LIKHOSHVAL. Polysaccharides of Diatoms Occuring in Lake Baikal. **Applied Biochemistry and Microbiology**. v, 41, p. 185-191, 2005.

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

ASCÊNCIO, P.G.M. **Diatomácea marinha *Coscinodiscus wailesii* Grane t Angst (Bacillariophyceae): isolamento, cultivo e estudo dos polissacarídeos**. 78f. Dissertação (Mestrado em Ciências - Bioquímica), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, 2004.

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

BAO, X.; LIU, C.; FANG, J.; LI, X. Structural and immunological studies of a major polysaccharide from spores of *Ganoderma lucium* (Fr.) Karst. **Carbohydrate Research**. v. 33, p. 67 – 74, 2001.

BECKER, B.; BECKER, D.; KAMERLING, J.P.; MELKONIAN, M. 2-keto-Sugar acids in green flagellates: A chemical marker for Prasinophycean scales. **Journal of Phycology**. v. 27, n. 4 , p. 498 – 504, 1991.

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

BEHRENFELD, M.J.; RANDERSON, J.T.; McCLAIN, C.R.; FELDMAN, G.C.; LOS, S.O.; TUCKER, C.J.; FALKOWSKI, P.G; FIELD, C.B.; FOURIN,R.; ESAIAS,W.E.;LOBER,D.D e POLLACK, N.H. Biospheric primary production

during na ENSO trasion (El Nino Southern Oscillation). **Science**. v. 291, p. 2594-2597, 2001.

BELAY, A. Current knowledge on potential health benefits of *Spirulina platensis*. **Journal of Applied Phycology**. v.5, p.235-240, 1993.

BERTOLDI, F.C.; SANT'ANNA, E.; OLIVEIRA, J.L.B. Revisão: Biotecnologia de Microalgas. Curitiba: **B. CEPPA**. v. 26, n. 1, 2008.

BLANCO, I. T.; TACON, A.G.J. **La produccion de alimento vivo y su importancia en acuicultura**. AQUILA - Apoyo a las Actividades Regionales de Acuicultura para America Latina y el Caribe. Programa Cooperativo Gubernamental FAO – ITALIA. Documento de campo 12. 90p, 1989.

BLIGH, E.G. e DYER, W.J. A rapid method for total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**. v. 37, p. 911-917, 1959.

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

BORGES, L.; FARIA, B.M.; ODEBRECHT, C.; ABREU, P.C. Potencial de absorção de carbono por espécies de microalgas usadas na aqüicultura: primeiros passos para o desenvolvimento de um “Mecanismo de Desenvolvimento Limpo”. **Atlântica**, Rio Grande. v. 29, n. 1, p. 35-46, 2007.

BOROWITZA, M.A. Microalgae for aquaculture: Opportunities and constraints. **Journal of Applied Phycology**. v. 9, n. 5, p. 393-401, 1997.

BRACHT, L. **Aspectos morfológicos e funcionais de macrófagos peritonias de animais portadores de tumor de Walker 256**. 98f. Dissertação (Mestrado em Ciências – Bioquímica), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, 2006.

BRANDINI, F.P.; LOPES, R.M.; GUTSEIT, K.S.; SPACH, H.L. E SASSI, R. **Planctonologia na plata-forma continental do Brasil: diagnose e revisão bibliográfica**. MMA, CIRM, FEMAR. 196 p, 1997.

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

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

BUCHI, D.F.; SOUZA, W. Internalization of surface components during Fc-receptor mediated phagocytosis by macrophages. **Cell Structure and Function**. v. 18, p. 399- 407, 1993.

CAMPA-CÓRDORA, AI.; HERNÁNDEZ-SAAVEDA, N.Y.; DE PHILIPPIS, R.; ASCENCIO, F. Generation of superoxide-anion and SOD activity in haemocytes and muscle of American white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) as a response to b-glucan and sulphated polysaccharide. **Fish and Shellfish Immunology**. v. 12, p. 353-366, 2002.

CARBONERO, E. R.; MONTAI, A.V., WORANOVICZ-BARREIRA, S.M.; GORIN, P.A.J.; IACOMINI, M. Polysaccharides of lichenized fungi of three Cladina spp.: significance as chemotypes. **Phytochemistry**. v. 61, p. 681–686, 2002.

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

CARMO, E.C.; SANTIAGO, L.S.; TOMÉ, L.M.; OLIVEIRA, A.B. Análise e Diagnóstico Logístico do Setor de Carcinicultura do Estado do Ceará. In: XXII Encontro Nacional de Engenharia de Produção, ABEPRO. **Anais de Congresso**. Curitiba, PR, 2002.

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

CHEETHAM, N.W.H.; TAO, L. Solid state NMR studies on the structural and conformational properties of natural maize starches. **Carbohydrate Polymers**. v. 36, p. 285–292. 1998.

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

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**. v. 25, n. 3, p. 294-306, 2007.

CHIVIOTTI, A.; MOLINO, P.; CRAWFORD, S.A.; TENG, R.; SPURCK, T.; WETHERBEE, R. The glucans extracted with warm water from diatoms are mainly derived from intracellular chysolaminaran and not extracelullar polysaccharides. **European Journal of Phycology**. v. 39, p. 117-128, 2004.

CHOTIGEAT, W.; TONGSUPA, S.; SUPAMATAYA, K.; PHONGDARA, A.; Effect of fucoidan on disease resistance of black tiger shrimp. **Aquaculture**. v. 233, p. 23-30, 2004.

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

DALMO, R.A.; BOGWALD, J.; INGEBRIGTSEN, K.; SELJELID, R. The immunomodulatory effect of laminaran [β (1,3)-D-glucan] on Atlantic salmon, *Salmo salar* L., anterior kidney leucocytes after intraperitoneal, peroral and peranal administration. **Journal of Fish Disease**. v.6. n.19, p. 449-457, 1996.

DALMO, R.A.; MARTINSEN, B.; HORSBERG, T.E.; RAMSTAD, A.; SYVERTSEN, C.; SELJELID, R.; INGEBRIGTSEN, K. Prophylactic effect of β (1,3)-D-glucan (laminaran) against experimental *Aeromonas salmonicida* and *Vibrio salmonicida* infections. **Journal of Fish Diseases**. v. 21. n. 6, p. 459-462, 1998.

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

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

DERNER, R. Comunicação pessoal. Recebida por: Miguel D, Nosedá, em: 30/01/2009.

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

DUERR, E. O., A. MOLNAR e V. SATO. Cultured microalgae as aquaculture feeds. **Journal of Marine Biotechnology**. n. 7, p. 65-70, 1998.

FERREIRA, V.F., ROCHA, D.R., SILVA, F.C. Potencialidades e oPortunidades na química da sacarose e outros açúcares. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 623-638, 2009.

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

FORD, C. W.; PERCIVAL, E. E. Carbohydrates of *Phaeodactylum tricornutum*. **Journal Chemical Society**. p. 7042-7046, 1965.

FURNEAUX, R.H.; STEVENSON, T.T.; The xylogalactan sulfate from *Chondria macrocarpa* (Ceramiales, Rhodophyta). *Hydrobiologia*. v. 204/205, p. 615-620, 1990.

FOSS, P.; GUILLARD, R.R.L.; LIAAEN-JENSEN, S. Prasincoxanthin-A Chemosystematic Marker for Algae. **Phytochemistry**. v. 23, n. 8, p. 1629-1633, 1984.

FRANCESCHINI, I.M.; BURLIGA, A.L.; REVIERS, B.; PRADO, J.F.; RÉZIG, S.H. **Algas: uma abordagem filogenética, taxonômica e ecológica**. 332p. Artmed, Porto Alegre, 2010.

GIROLDO, D.; VIEIRA, A.A.H.; An extracellular sulfated fucose-rich polysaccharide produced by a tropical strain of *Cryptomonas obovata* (Cryptophyceae). **Journal of Applied Phycology**. v. 14, p.185–191, 2002.

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

GOMAA, K.; KRAUS, J.; ROBKOPF, F.; RÖPER, H.; FRANZ, G. Antitumor and

immunological activity of a β 1 \rightarrow 3/1 \rightarrow 6 glucan from *Glomerella cingulata*. **J. Câncer Res. Clin. Oncol.** v. 118, p. 136-140, 1992.

GOODAY, G.W. A Biochemical and autoradiographic study of the role of the Golgi Bodies in thecal formation in *Platymonas tetrahele*. **Journal of Experimental Botany**. v. 22 p. 959-971, 1971.

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

GUIMARÃES, M.; VIANA, A.G.; DUARTE, M.E.R.; ASCENCIO, S.D.; PLASTINO, E.M.; NOSEDA, M.D. Low-molecular-mass carbohydrates and soluble polysaccharides of green and red morphs of *Gracilaria domingensis* (Gracilariales, Rhodophyta). **Botanica Marina**. v. 50, p. 314-317, 2007.

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

JANSE, I.; RJSSEL, M.; HALL, P.; GERWIG, G.J.; GOTTSCHAL, J.C.; PRINS, R.A. The storage glucan of *Phaeocystis globosa* (Prymnesiophyta) cells. **Journal of Phycology**. v. 32, p. 382 – 387, 1996.

JURGENFELD, V.. Produtores catarinenses tentam retomar produção. **Valor On-line**. 30/04/2008. Disponível em: <<http://www.ces.fgvsp.br/index.cfm?fuseaction=noticia&IDnoticia=114090&IDidioma=1>>. Acesso em: 29/01/2009.

KIM, Y.T.; KIM, E.H.; CHEONG, C.; WILLIAMS, D.L.; KIM, C.W.; LIM, S.T. Structural characterization of b-D-(1.3, 1.6)-linked glucans using NMR spectroscopy. **Carbohydrate Research**. v. 328, p. 331–341, 2000.

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

KREMBS, C.; EICKENB, H.; JUNGEA, K.; DEMINGA, J.W. High concentrations of exopolymeric substances in Arctic winter sea ice: implications for the polar

ocean carbon cycle and cryoprotection of diatoms. **Deep-Sea Research**. v. 49, p. 2163–2181, 2002.

KULICKE, W.M.; LETTAU, A.I.; THIELKING, H. Correlation between immunological activity, molar mass, and molecular structure of different (1→3)- β -D-glucans. **Carbohydrate Research**. v. 297, p. 135-143, 1997.

LEANDRO, S.M.; GIL, M.C.; DELGADILLO, I. Partial characterisation of exopolysaccharides exudated by planktonic diatoms maintained in batch cultures **Acta Oecologica**. v. 24, p. 49–55, 2003.

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

LOPES, D. C. **Cultivo das Microalgas Marinhas *Thalassiosira* sp. e *Heterosigma akashiwo* e Análise Química de Seus Polissacarídeos**. 139 f. Dissertação (Mestrado em Ciências - Bioquímica), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, 2003.

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

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

McCONVILLE, M.J., BACIC, A., CLARKE, A.E. Structural studies of chrysolaminaran from the ice diatom *Stauroneis amphioxys* (Gregory). **Carbohydrate Research**. v. 153, n. 2, p. 330–333, 1986.

MIAO, X.; WU, Q. High yield bio-oil production from fast pyrolysis by metabolic controlling of *Chlorella protothecoides*. **Journal of Biotechnology**, v. 110, p. 85-93, 2004.

MORETÃO, M.P. **Propriedades biomoduladoras da arabinogalactana (ARAGAL) de *Anadenanthera colubrina* (Angico branco)**. 145p Tese (Doutorado em Ciências – Bioquímica), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, 2004.

MOHANKUMAR, K.; RAMASAMY, P. White spot syndrome virus infection decreases the activity of antioxidant enzymes in *Fenneropenaeus indicus*. **Virus Research** v. 115 p. 69–75, 2006.

MYKLESTAD, S.M. Release of extracellular products by phytoplankton with special emphasis on polysaccharides. **The Science of the Total Environment**. v. 165, p. 155-164, 1995.

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

OKAZAKI, M.; ADACHI, Y.; OHNO, N.; YADOMAE, T. Structure-Activity Relationship of (1→3)-β-D-Glucans in the Induction of Cytokine Production from Macrophages, *in Vitro*. **Biological Pharmacia Bulletin**. v.18, n.10, p.1320-1327, 1995.

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

PARSONS, T. R., STEPHENS, K., STRICKLAND, J. D.H. On the chemical composition of eleven species of marine phytoplankters. **Journal of the Fisheries Research Board of Canada**. v. 18, p. 1001-1016, 1961.

PARSONS, T.R.; TAKAHASHI, M.; HARGRAVE, B. **Biological Oceanographic Processes**. 3 Ed. Oxford: Pergamon Press, 1984.

PAULSEN, B.S., MYKLESTAD, S. Structural studies of the reserve glucan produced by the marine diatom *Skeletonema costatum* (grev.) Cleve. **Carbohydrate Research**. v. 62, n. 2, p. 386–388, 1978.

PERCIVAL, E.; RAHMAN, M.A. E WEIGEL, H. Chemistry of the polysaccharides of the diatom *Coscinodiscus nobilis*. **Phytochemistry**. v. 19, n. 5, p. 809-81, 1980.

PINHO, J. L. S.; VIEIRA, J.M.P.; CARMO, J.S.A. Modelação Matemática da Produção Primária em Zonas Costeiras. **Revista Engenharia Civil**. Universidade do Minho. n. 16, p.25-41, janeiro/2003. Disponível em: <repositorium.sdum.uminho.pt>. Acesso em: 10/01/2009.

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

RAMAMOORTHY, L.; KEMP, M. C.; TIZARD, I. R. Acemannan, a β -(1,4)-acetylated mannan, induces nitric oxide production in macrophage cell line raw 264. **Molecular Pharmacology**. v. 50, p. 878–884, 1996.

RAMESH H.P.; YAMAKI K.; TSUHIDA T. Effect of fenugreek (*Trigonella foenumgraecum* L.) galactomannan fractions on phagocytosis in rat macrophages and on proliferation and IgM secretion in HB4C5 cells. **Carbohydrate Polymers**. England, v. 50, p. 79-83, 2002.

REILLY, T.P.; BELLEVUE, F.H.; WOSTER, P.M.; SVENSSON, C.K. Comparison of the in vitro cytotoxicity of hydroxylamine metabolites of sulfamethoxazole and dapsone. **Biochemical Pharmacology**. New York, v. 55, p. 803-810, 1998.

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

RICKLEFS, R.E. **A Economia da Natureza**. 5ªed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 503p, 2003.

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

RODRÍGUEZ, J.A. D.A.; PALAU, L.C. e LÓPEZ, M.O.A. Extracción y Cuantificación de Lípidos. In: Vega, B.O.A e Voltolina, D. **Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal**. Baja California Sur, La Paz, México. p. 47-57, 2007.

SAKAI, M. Current research status of fish immunostimulants. **Aquaculture**. v. 172. p. 63–92, 1999.

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

SCHMID, F.; STONE, B.A.; MCDougALL, B.M.; BACIC, A.; MARTIN, K.L.; BROWNLEE, R.T.C.; CHAI, E.; SEVIOURA, R.J. Structure of epiglucan, a highly side-chain:branched (1-3;1-6)- β -glucan from the micro fungus *Epicoccum nigrum* Ehrenb. ex Schlecht. **Carbohydrate Research**. v. 331, p. 163–171, 2001.

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

SKJERMO, J.; VADSTEIN, O. Techniques for microbial control in the intensive rearing of marine larvae. **Aquaculture**. v. 177, p. 333-343, 1999.

SKJERMO, J.; STØRSETH, T.R.; HANSEN, K.; HANDÅ, A.; ØIE, G. Evaluation of β -(1-3, 1-6)-glucans and High-M alginate used as immunostimulatory dietary supplement during first feeding and weaning of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). **Aquaculture**, v. 261, p. 1088–1101, 2006.

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

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

STAATS, N.; STAL, L.J.; MUR, L.R. Exopolysaccharide production by the epipelagic diatom *Cylindrotheca closterium*: effects of nutrient conditions. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**. v. 249, p. 13–27, 2000.

STØRSETH, T.R.; HANSEN, K.; SKJERMO, J.; KRANE, J. Characterization of a β -D-(1 \rightarrow 3)-glucan from the marine diatom *Chaetoceros mulleri* by high-resolution magic-angle spinning NMR spectroscopy on whole algal cells. **Carbohydrate Research**. v. 339, p. 421-424, 2004.

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

STØRSETH, T.R.; KIRKVOLD, S.; SKJERMO, J.; REITAN, K.I. A branched β -D-(1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 6)-glucan from the marine diatom *Chaetoceros debilis*

(Bacillariophyceae) characterized by NMR. **Carbohydrate Research**. v. 341, p. 2108-2114, 2006.

STUELP, P.M.; CARNEIRO LEÃO, A.M.A.; GORIN, P.A.J.; IACOMINI, M. The glucans of *Ramalia celastri*: relations with chemotypes of other lichens. **Carbohydrate Polymers**. v. 40, p. 101-106, 1999.

STUELP-CAMPELO, P.M.; OLIVEIRA, M.B.M.; LEÃO, A.M.A.C.; CARBONERO, E.R.; GORIN, P.A.J.; IACOMINI, M. Effect of a soluble α -D-glucan from the lichenized fungus *Ramalina celastri* on macrophage activity. **International Immunopharmacology**. v. 2, p. 691-698, 2002.

SUÁREZ, E. R.; BUGDEN, S.M.; KAI, F.B.; KRALOVEC, J.A.; NOSEDA, M.D.; BARROW, C.J.; GRINDLEY, T.B. First isolation and structural determination of cyclic beta-(1 \rightarrow 2)-glucans from an alga, *Chlorella pyrenoidosa*. **Carbohydrate Research**. v. 343, n. 15, p. 2623-2633, 2008.

SUGA, T.; SHIIO, T.; YUKIKO, Y.; MAEDA, Y.; CHIBARA, G. Antitumor Activity of Lentinan in Murine Syngeneic and Autochthonous Hosts and Its Suppressive Effect on 3-Methylcholanthrene-induced Carcinogenesis. **Cancer Research** v. 44, p. 5132-5137, 1984.

TEIXEIRA, C.M.; MORALES, M.E. **Microalga como matéria-prima para a produção de biodiesel**. Instituto Nacional de Tecnologia. Programa: Biodiesel, o novo combustível do Brasil. Rio de Janeiro, RJ, 2006.

TORGAN, L. C. e SANTOS, C. B. *Thalassiosira weissflogii* (Coscinodiscophyceae, Bacillariophyta) em ambientes lacustres na Planície Costeira do sul do Brasil. **IHERINGIA, Sér. Bot.**, Porto Alegre, v. 61, n. 1-2, p. 135-138, 2006. Disponível em: <www.fzb.rs.gov.br/publicações/iheringia-botanica/ih61-p135-138.pdf> Acesso em: 02/02/2009.

UNDERWOOD G.J.C.; PATERSON, D.M. The importance of extracellular carbohydrate production by marine epipelagic diatoms. **Advances in Botanical Research**. v. 40, p. 183-240, 2005.

URBANI, R.; MAGALETTI, E.; SIST, P.; CICERO, A.M. Extracellular carbohydrates release by the marine diatoms *Cyndrotheca closterium*, *Thalassiosira pseudonana* and *Skeletonema costatum*: Effect of P-depletion and growth status. **Science of the Total Environment**. v. 353, p.300-306, 2005.

VADSTEIN, O. The use of immunostimulation in marine larviculture: possibilities and challenges. **Aquaculture**. v. 155, n. 1-4, p. 401-417, 1997.

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

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

XU, H.; MIAO, X.; WU Q. High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters. **Journal of Biotechnology**. v. 126, n. 4, p. 499-507, 2006.

WILKE, J. Embargo ao camarão de Santa Catarina. Gazeta Mercantil, São Paulo, 26 de janeiro de 2005. Economia. Disponível em <<http://www.redmanglar.org/redmanglar.php?cat=acuacultura16>>. Acesso em: 29/01/2009.

WU, J.L.; NISHIOKA, T.; MORI, K.; NISHIZAWA, T.; MUROGA, K. A time course study on the resistance of *Penaeus japonicus* induced by artificial infection with white spot syndrome virus. **Fish and Shellfish Immunology** v. 13 n. 5 p. 391–403, 2002.

YEH, S.T.; LEE, C.S.; CHEN, J.C. Administration of hot-water extract of brown seaweed *Sargassum duplicatum* via immersion and injection enhances the immune resistance of white shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Fish and Shellfish Immunology**. v. 20, p. 332-345, 2006.

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

YOUNG, S-H.; YE, J.; FRAZER, D.G.; SHI, X.; CASTRANOVA, V. Molecular Mechanism of Tumor Necrosis Factor- α Production in 1-3-b-Glucan (Zymosan)-activated Macrophages. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 276, n. 23, p. 20781–20787, 2001.