

POLIANA G. MARSON ASCENCIO

DIATOMÁCEA MARINHA *Coscinodiscus wailesii*  
Gran et Angst (BACILLARIOPHYCEAE):  
ISOLAMENTO, CULTIVO E ESTUDO DOS  
POLISSACARÍDEOS.

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

Orientador: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Selma F. Zawadzki Baggio.

CURITIBA  
2004

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida e pela saúde.

Agradeço carinhosamente aos meus pais, Mauricio Marson e Maria Nilze Guerino Marson, pelo amor incondicional, pela dedicação, pelos ensinamentos e pelo apoio em todas os momentos da minha vida. Amo vocês.

Ao meu marido, Sérgio, pelo apoio e dedicação em todos os momentos, em especial nesta conquista. Pelas idéias, orientações e sugestões que tornaram possível a realização deste trabalho. Pelos ensinamentos durante as análises por CLAE e principalmente pela paciência. Sem esquecer é claro, pelo amor e por me fazer muito feliz. Te amo.

Aos meus irmãos Tatiana e Breno e minha avó Olinda, pelo amor e afeto.

Agradeço também a minha sogra (Rosa) e ao meu sogro (Salvador), pelo apoio e por me receberem como filha.

Agradeço a Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Selma Faria. Zawadzki Baggio, pela orientação, pelo apoio, por ouvir e respeitar minhas sugestões e, principalmente, pela amizade e todos os bons momentos compartilhados.

Ao Prof. Dr. Luciano Felício Fernandes, por ter gentilmente cedido a microalga *C. walesii* estudada neste trabalho. Obrigada pela ajuda indispensável que prestou durante o isolamento da microalga, pelas fotografias, pelas valiosas literaturas emprestadas, e principalmente, pela paciência e disposição em partilhar seus conhecimentos, esclarecendo muitas das minhas dúvidas.

Ao Prof. Dr. Cid Aimbiré dos Santos pelos primeiros incentivos a pesquisa.

Ao Prof. Dr. Aguinaldo José do Nascimento, pela ajuda, conselhos e pelos momentos de descontração.

À coordenação do curso de Pós-Graduação em Bioquímica e seu corpo docente pela contribuição na minha formação.

A amiga de laboratório Daniella, pela ajuda nos primeiros cultivos, pelo companheirismo e pelo seu constante otimismo. Aos amigos Andréa, Ana Paula, Juliana, Fernanda, Dani, Vassoler, Rodrigo Faria, Ricardo, Adriano, Paula, Marco, Diogo, Luciana, Lauro e Thales pela amizade, pelos momentos de descontração, pela ajuda e empréstimos de material. A todos os amigos do Departamento que de uma maneira ou outra contribuíram para este trabalho.

Especialmente a amiga Rosiane, pela preciosa ajuda. O conhecimento e a ciência só têm sentido se compartilhado. Que bom que nós já aprendemos essa lição. Obrigada!

A todos os funcionários deste Departamento.

As bibliotecárias, em especial a Izabella e Telma.

Ao CNPq e ao PRONEX-Carboidratos pelo apoio financeiro.

*Ao grande amor da minha vida  
Sérgio Donizeti Ascencio  
e aos meus pais Mauricio Marson e  
Maria Nilze G. Marson.*

*“Não entregues tua alma à tristeza, não atormentes a ti mesmo em teus pensamentos. A alegria do coração é a vida do homem, e um inesgotável tesouro de santidade. A alegria do homem torna mais longa a sua vida”. Eclo 32, 22-23.*

*Orientador: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Selma F. Zawadzki Baggio*

# SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>v</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	<b>vii</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	<b>viii</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>x</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>01</b>
1.1 ALGAS – CARACTERÍSTICAS GERAIS .....	01
1.2 MICROALGAS .....	01
1.2.1 Divisões e classes das microalgas .....	02
1.2.1.1 Classe Bacillariophyceae – Diatomáceas .....	03
1.3 POLISSACARÍDEOS - BACILLARIOPHYCEAE (DIATOMÁCEAS) .....	05
1.3.1 Polissacarídeo de Reserva .....	06
1.3.2 Polissacarídeos da Parede Celular .....	07
1.3.3 Polissacarídeo Extracelular .....	08
1.3.3.1 Exopolissacarídeos Solúveis .....	10
1.3.3.2 Polissacarídeos da Cápsula Mucilaginosa .....	12
1.4 A ESPÉCIE <i>Coscinodiscus wailesii</i> (BACILLARIOPHYCEAE) .....	13
1.4.1 Polissacarídeos da microalga <i>C. wailesii</i> .....	15
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>18</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	18
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	18
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>19</b>
3.1 CULTIVO DA MICROALGA MARINHA <i>Coscinodiscus wailesii</i> .....	19
3.1.1 Material de estudo - <i>Coscinodiscus wailesii</i> .....	19
3.1.2 Preparação do material utilizado no Cultivo .....	19
3.1.3 Condições de Cultivo .....	19
3.1.4 Meios de Cultura .....	20

3.2 ADAPTAÇÃO E ISOLAMENTO DAS CÉLULAS DE <i>C. walesii</i> .....	21
3.2.1 Adaptação das Células em Microcultivos - Adaptação I .....	21
3.2.2 Adaptação das Células em Macrocultivos - Adaptação II .....	22
3.2.3 Descontaminação do Cultivo .....	22
3.3 CURVA DE CRESCIMENTO DA <i>Coscinodiscus walesii</i> .....	23
3.3.1 Condições de cultivo .....	23
3.3.2 Estimativa do Número de Células .....	23
3.3.3 Cálculo do Tempo de Geração e $\mu_{m\acute{a}x}$ .....	23
3.3.4 Metabólitos Dosados Durante a Curva de Crescimento .....	24
3.4 EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS .....	24
3.4.1 Extração dos Exopolissacarídeos Solúveis .....	24
3.4.2 Polissacarídeos da Cápsula Mucilaginosa e da Parede Celular .....	24
3.5 COLORAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS ÁCIDOS E SULFATADOS .....	27
3.6 EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE LIPÍDEOS .....	27
3.7 MÉTODOS ANALÍTICOS .....	27
3.7.1 Dosagem de Proteínas .....	27
3.7.2 Dosagem de Açúcar Total .....	28
3.7.3 Dosagem de Grupamentos Sulfatos .....	28
3.7.4 Dosagem de Ácidos Urônicos (Colorimétrico) .....	28
3.8 PROCEDIMENTOS PARA ANÁLISE DA ESTRUTURA QUÍMICA DOS POLISSACARÍDEOS .....	28
3.8.1 Hidrólise ácida .....	28
3.8.1.1 Curva de hidrólise .....	28
3.8.2 Redução e Acetilação dos Produtos de Hidrólise .....	31
3.8.3 Metilação .....	31
3.9 ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS .....	31
3.9.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) .....	31
3.9.2 Cromatografia Líquido-Gasosa (CLG) .....	32
3.9.3 Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa (CG-EM) .....	32
3.9.4 Cromatografia de Filtração em Gel (CFG) – Análise de Homogeneidade ....	32

3.9.5	Cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-Sephacel .....	33
3.10	ANÁLISE DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR .....	33
3.10.1	Técnicas de Ressonância Magnética Nuclear Monodimensionais .....	33
3.10.1.1	Ressonância Magnética Nuclear de <sup>13</sup> C (RMN- <sup>13</sup> C) .....	33
3.10.1.2	Ressonância Magnética Nuclear de <sup>13</sup> C DEPT (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer) .....	34
3.10.2	Técnicas de Ressonância Magnética Nuclear bidimensionais .....	34
3.10.2.1	HMQC ( <i>Heteronuclear Multiple Quantum Correlation Spectroscopy</i> ) .....	34
3.11	DESPROTEINIZAÇÃO .....	34
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>35</b>
4.1	CULTIVO DA DIATOMÁCEA <i>Coscinodiscus wailesii</i> .....	35
4.2	CURVA DE CRESCIMENTO DA <i>Coscinodiscus wailesii</i> .....	37
4.3	ANÁLISE DOS ÁCIDOS GRAXOS PRODUZIDOS PELA DIATOMÁCEA <i>C. wailesii</i> .....	41
4.4	OBTENÇÃO DAS FRAÇÕES POLISSACARÍDICAS DA DIATOMÁCEA <i>Coscinodiscus wailesii</i> .....	43
4.5	ANÁLISES QUÍMICAS DAS FRAÇÕES POLISSACARÍDICAS OBTIDAS DA DIATOMÁCEA <i>Coscinodiscus wailesii</i> .....	44
4.5.1	Dosagem de açúcar total .....	44
4.5.2	Dosagem de Proteína .....	46
4.5.3	Dosagem Colorimétrica de Ácidos Urônicos .....	47
4.5.4	Dosagem de Grupos Sulfatos .....	48
4.6	DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES OBTIDAS DA DIATOMÁCEA <i>Coscinodiscus wailesii</i> .....	50
4.6.1	Composição Monossacarídica do Exopolissacarídeo Obtido da Diatomácea <i>Coscinodiscus wailesii</i> .....	51
4.6.2	Composição Monossacarídica do polissacarídeo da Cápsula Mucilagínosa Obtido da Diatomácea <i>Coscinodiscus wailesii</i> .....	53
4.6.3	Composição Monossacarídica do Polissacarídeo da Parede Celular	

Obtido da Diatomácea <i>Coscinodiscus wailesii</i> .....	54
4.7 PURIFICAÇÃO DA FRAÇÃO EXO .....	55
4.7.1 Desproteínização da Fração EXO - Análise Química e Determinação da Composição Monossacarídica da Fração EXO-DP .....	55
4.7.2 Fracionamento da Fração EXO-DP por Cromatografia de Troca-Iônica – DEAE-Sephacel .....	58
4.7.2.1 Análise Química Parcial da Fração EXOdp-0,1 .....	60
4.7.2.2 Análise Química Parcial da Fração EXOdp-0,2 .....	63
4.4.2.3 Análise Química Parcial da Fração EXOdp-1,0 .....	65
4.8 CONSIDERAÇÕES .....	66
<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>68</b>
<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>69</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1:</b> Diatomácea <i>Coscinodiscus wailesii</i> . (vista lateral e frontal em aumento de 400 X) .....	15
<b>FIGURA 2:</b> Cromatograma obtido por CLAE da fração EXO hidrolisada a 100 °C com TFA 1M por 6 horas .....	29
<b>FIGURA 3:</b> Cromatograma obtido por CLAE da fração EXO hidrolisada a 100 °C com TFA 1M por 8 horas .....	29
<b>FIGURA 4:</b> Cromatograma obtido por CLAE da fração EXO hidrolisada a 100 °C com TFA 1M por 12 horas .....	30
<b>FIGURA 5:</b> Cromatograma obtido por CLAE da fração EXO hidrolisada a 100°C com TFA 1M por 18 horas .....	30
<b>FIGURA 6:</b> Curva de crescimento Padrão da diatomácea <i>Coscinodiscus wailesii</i> versus concentração de proteínas e carboidratos em µg/ml de meio f/2 aerado .....	38
<b>FIGURA 7:</b> Curva de crescimento Modificada da diatomácea <i>C. wailesii</i> versus concentração de carboidrato e proteína em µg/ ml de meio f/2 aerado, modificado com diminuição de nitrogênio (5X menos) .....	39
<b>FIGURA 8:</b> Composição de ácidos graxos produzidos pela diatomácea <i>C. wailesii</i> ..	42
<b>FIGURA 9:</b> Porcentagem (g %) de açúcar total das frações obtidas de cultivos da microalga <i>C. wailesii</i> .....	45
<b>FIGURA 10:</b> Porcentagem (g %) de proteína das frações obtidas de cultivos da microalga <i>C. wailesii</i> .....	46
<b>FIGURA 11:</b> Porcentagem (g %) de ácido urônico encontrado nas frações obtidas de cultivo da microalga <i>C. wailesii</i> .....	47
<b>FIGURA 12:</b> Fotomicroscopia da diatomácea <i>Coscinodiscus wailesii</i> após coloração de Alcian Blue.....	48
<b>FIGURA 13:</b> Porcentagem (g %) de grupamento sulfato encontrada nas frações polissacarídicas de culturas obtidas da microalga <i>C. wailesii</i> .....	49
<b>FIGURA 14:</b> Cromatograma obtido por CLAE de padrões de monossacarídeos .....	50

<b>FIGURA 15:</b> Porcentagem (g %) de açúcar total, proteína, sulfato e ácido urônico presente na fração EXO e EXO-DP.....	56
<b>FIGURA 16:</b> Espectro de RMN- <sup>13</sup> C da fração EXO-DP obtido da diatomácea <i>C. wailesii</i> . Deslocamentos químicos em (δ) ppm .....	58
<b>FIGURA 17:</b> Espectro de RMN- <sup>13</sup> C da fração EXODP-0,1. Deslocamentos químicos em (δ) ppm .....	61
<b>FIGURA 18:</b> Estrutura apresentada pelo grupo acetal e ácido pirúvico esterificando uma unidade de galactose e seus respectivos deslocamentos químicos por RMN de <sup>13</sup> C .....	63
<b>FIGURA 19:</b> Espectro de RMN- <sup>13</sup> C da fração EXODP-0,2. Deslocamentos químicos em (δ) ppm .....	64
<b>FIGURA 20:</b> Espectro de RMN- <sup>13</sup> C da fração EXODP-1,0. Deslocamentos químicos em (δ) ppm .....	65

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1:</b> Principais monossacarídeos encontrados em exopolissacarídeos exudados por diatomáceas marinhas.....	11
<b>TABELA 2:</b> Rendimento das Frações EXO, EAQ, EAL-S e EAL-P obtidas de cultura da microalga <i>C. wailesii</i> .....	44
<b>TABELA 3:</b> Composição Monossacarídica das Frações brutas obtidas da <i>C. wailesii</i> (mol%) .....	51
<b>TABELA 4:</b> Composição monossacarídica da fração EXO bruta e EXO-DP (mol%)	57
<b>TABELA 5:</b> Composição monossacarídica (mol %) e Análise de Sulfato (NaSO <sub>3</sub> %) das frações obtidas pelo fracionamento da amostra EXO-DP em coluna DEAE-Sephacel .....	59

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\alpha$ : Denota anomeridade alfa;

$\beta$ : Denota anomeridade beta;

$\mu\text{m}\acute{\text{a}}\text{x}$ : número que representa o quanto, em vezes, uma célula cresce por dia;

**CG-EM**: cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa;

**CLAE (HPLC)**: cromatografia líquida de alta eficiência;

**CLG**: cromatografia líquido-gasosa.

**D<sub>2</sub>O**: óxido de deutério;

DEAE: dietilaminoetil;

**DEPT**: distortionless enhancement by polarization;

**EAL-P**: fração insolúvel após neutralização com ácido acético da fração obtida pela extração alcalina (NaOH 0,5M);

**EAL-S**: fração solúvel após neutralização com ácido acético da fração obtida pela extração alcalina (NaOH 0,5M);

**EAQ**: fração obtida pela extração aquosa do material celular da microalga;

**EXO**: fração extracelular obtida por filtração das culturas da microalga *Coscinodiscus wailesii*;

**EXO-DP**: fração obtida após desproteínização da fração EXO;

**EXOdp-0,1**: Fração eluída da coluna de troca iônica (DEAE-Sephacel) com NaCl 0,1M a partir da fração EXO-DP;

**EXOdp-0,2**: Fração eluída da coluna de troca iônica (DEAE-Sephacel) com NaCl 0,2 M a partir da fração EXO-DP;

**EXOdp-0,5**: Fração eluída da coluna de troca iônica (DEAE-Sephacel) com NaCl 0,5 M a partir da fração EXO-DP;

**EXOdp-1,0**: Fração eluída da coluna de troca iônica (DEAE-Sephacel) com NaCl 1,0 M a partir da fração EXO-DP;

**EXOdp-1,5:** Fração eluída da coluna de troca iônica (DEAE-Sephacel) com NaCl 1,5 M a partir da fração EXO-DP;

**EXOdp-2,0:** Fração eluída da coluna de troca iônica (DEAE-Sephacel) com NaCl 2,0 M a partir da fração EXO-DP;

**H<sub>2</sub>O mQ:** água ultra purificada;

**HMQC:** heteronuclear multiple quantum correlation spectroscopy;

**HPSEC-MALLS:** Cromatografia de exclusão estérica acoplada a detector de espalhamento de luz em multiângulos;

**m/z:** razão entre a massa molecular e a carga da molécula;

**NaOH:** hidróxido de sódio;

**ppm:** parte por milhão;

**q.s.p.:** quantidade suficiente para;

**RMN:** ressonância magnética nuclear;

**RMN-<sup>13</sup>C:** ressonância magnética nuclear de carbono-13;

**TCA:** ácido cloroacético;

**TFA:** ácido trifluoroacético;

**TG:** Tempo de geração;

**TR:** tempo de retenção em minutos;

## RESUMO

A diatomácea marinha cêntrica *Coscinodiscus waillesii* Gran et Angst, considerada uma espécie nociva, vem despertando grande interesse ecológico. Suas florações, vêm prejudicando áreas de pesca e cultivo em diferentes regiões do mundo. Entretanto essa microalga marinha é muito pouco estudada em relação ao seu crescimento celular, composição química, produção e caracterização de polissacarídeos e ácidos graxos. Sendo assim, nesse trabalho foi realizado o isolamento e o cultivo da diatomácea *C. waillesii* em diferentes condições; avaliando-se os polissacarídeos biozintetizados durante o cultivo celular; a extração e caracterização química parcial dos exopolissacarídeos, dos polissacarídeos constituintes da parede celular e da cápsula mucilaginosa. A descontaminação das culturas foi realizada por isolamento (micromanipulação) das células, uma vez que o uso de antibióticos como Penicilina G, Espstreptomicina e Kanamicina, não foi satisfatório, havendo morte das células após o tratamento. A diatomácea foi crescida em meio f/2 aerado, sob condições controladas de temperatura,  $22 \pm 1^\circ\text{C}$ , fotoperíodo, de 12L:12E e intensidade de luz de  $45 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ . A fase exponencial da microalga *C. waillesii*, sob condições padrões, inicia-se no 4º e termina no 10º dia, quando inicia a fase estacionária. A partir do 14º dia observa-se a maior produção de carboidrato total. Com alteração no meio de cultivo (5 vezes menos nitrogênio) o desenvolvimento celular da microalga foi prejudicado. Portanto, em condições padrões de cultivo a diatomácea *C. waillesii* se desenvolveu melhor e, conseqüentemente, produziu maiores quantidades de exopolissacarídeos. A partir da curva de crescimento padrão e padronização do cultivo, foram extraídos os polissacarídeos da parede celular, da cápsula mucilaginosa e o exopolissacarídeo. Todas as frações brutas apresentaram teor de açúcar total, proteína, ácido urônico e grupamentos sulfatos em suas composições. Em relação à composição de ácidos graxos, sob as condições de cultivo estabelecidas, a microalga *C. waillesii*, sintetiza somente ácidos graxos saturados (Palmítico, Mirístico, Esteárico e Behêmico), não sendo evidenciado a presença de ácidos graxos insaturados. Foi determinada a composição monossacarídica de todas as frações brutas, e a fração escolhida pra o estudo da estrutura química foi a referente ao exopolissacarídeo (EXO). O fracionamento dessa amostra em coluna de troca-iônica DEAE-Sephacel, rendeu subfrações e, apesar dessas não apresentaram um perfil homogêneo, foram sugeridas suas estruturas químicas parciais através de técnica de RNM-<sup>13</sup>C. As informações obtidas por RMN-<sup>13</sup>C sobre esses polímeros são de suma importância, uma vez que, com exceção do polissacarídeo de reserva (crisolaminarana), pouco se conhece sobre a estrutura química de polissacarídeos de diatomáceas.

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 ALGAS – CARACTERÍSTICAS GERAIS

As algas são organismos pertencentes ao reino vegetal que compreendem um grupo muito diverso de organismos fotossintetizadores (SOUTH; WHITTICK, 1987). São classificadas como talófitas, isto é, plantas inferiores, por apresentarem uma estrutura simples não vascularizada com ausência de raiz, caule e folhas. Suas estruturas reprodutivas são desprotegidas (Crytogâmia), produtoras de esporos e desprovidas de sementes e flores (LEE, 1989).

As algas podem ser procarióticas ou eucarióticas, pluricelulares ou unicelulares, apresentando similaridade em muitos aspectos comuns com as plantas superiores, como por exemplo a composição de seus carboidratos de reserva, proteínas e pigmentos fotossintéticos. Possuem a clorofila “a” como seu pigmento fotossintético primário (VAN DEN HOEK et al., 1989). Outros tipos de clorofila, como os carotenóides ( $\beta$ -caroteno e fucoxantina), a ficocianina e a ficoeritrina apresentam uma distribuição mais limitada nas algas, funcionando como pigmentos acessórios (SOUTH; WHITTICK, 1987).

As algas apresentam uma ampla distribuição geográfica, podendo ser encontradas em praticamente todas as condições ambientais da Terra, desde solos férteis a desertos quentes e frios. Entretanto, são nos ambientes aquáticos, tanto marinho quanto em águas continentais, que encontramos maior prevalência das microalgas (LEE, 1989).

Nos ambientes aquáticos as algas desempenham um papel central na base da cadeia alimentar, na qual funcionam com produtores primários, produzindo matéria orgânica e dióxido de carbono, além de servirem como fonte de oxigênio, necessários para o metabolismo dos consumidores (LEE, 1989).

## 1.2 MICROALGAS

Nos oceanos, as pequenas células fotossintetizantes e pequenos animais suspensos unem-se, formando o plâncton. A palavra “*planktos*” origina-se do grego e designa “o que flutua livremente”.

O plâncton animal (plâncton heterotrófico ou zooplâncton), assim como alguns pequenos peixes, nutrem-se do fitoplâncton, desta forma, as algas planctônicas ou fitoplâncton constituem o início da cadeia alimentar para todos os organismos heterotróficos que habitam os oceanos (RAVEN,1996). Além disso, dentro desses ambientes aquáticos as microalgas desempenham um papel relevante sendo responsáveis por mais da metade da atividade fotossintética de toda Terra (PELEGRIN, 2001). Dessa maneira, o fitoplâncton, que é freqüentemente chamado "grande pasto marítimo", pode ser comparado aos campos terrestres, servindo como fonte de alimento para organismos heterotróficos (RAVEN,1996).

Os estudos sobre microalgas apesar de não serem recentes, foram sempre limitados a poucos grupos e carentes de trabalhos adicionais para avaliação do potencial nutricional e comercial das microalgas (DE PHILIPIS et al., 1993). Atualmente, destaca-se o estudo bioquímico, principalmente, devido ao interesse comercial dos produtos derivados do seu metabolismo. Investigações farmacológicas dos metabólitos produzidos por várias espécies de microalgas mostraram diversas atividades biológicas, entre elas, atividade antibiótica para a microalga *Phaeocystis* sp, atividade antiviral em cianobactérias e atividade antioxidante nas microalgas *Dunaliella primolecta* e *Haematococcus pluvialis* (PELEGRIN, 2001).

Assim sendo, o conhecimento químico dos produtos gerados pelo metabolismo das microalgas é de fundamental importância, tanto para uma possível utilização desses metabólitos em aplicações farmacológicas, nutricionais, entre outras. E também, para o entendimento da fisiologia e ecologia das microalgas, no qual podemos citar o interesse em esclarecer a possível relação entre a toxicidade e os produtos gerados pelo metabolismo de algumas espécies de microalgas tóxicas e/ou nocivas, uma vez que tais algas causam problemas ambientais graves tendo, portanto, grande importância ecológica.

### 1.2.1 Divisões e classes das microalgas

As microalgas são organismos unicelulares que podem apresentar aparência muito simples, ou formas intrincadas e delicadamente ornamentadas, podendo se desenvolver de forma isolada, ou por vezes, reunindo-se em colônias ou filamentos (RAVEN, 1996).

Existem três divisões principais onde estão classificados os protistas fotossintetizantes unicelulares: Euglenophyta (Euglenófitas), Pyrrhophyta (Dinoflagelados) e Chrysophyta (Crisófitas). As crisófitas são subdivididas em três classes: Chrysophyceae (algas douradas), Xanthophyceae (algas verde-amareladas) e classe Bacillariophyceae (diatomáceas) (RAVEN, 1996).

Em geral as crisófitas são organismos unicelulares autotróficos, abundantes tanto em ambientes marinhos quanto em águas continentais. Possuem clorofila “a” e “c”, cuja cor pode ser mascarada, principalmente nos representantes da classe Bacillariophyceae, pelo pigmento acessório fucoxantina, um carotenóide de cor castanho-dourado. Apresentam como principal carboidrato de reserva a crisolaminarana. Suas células podem ser desprovidas de parede celular (nuas), ou com parede celular polissacarídica (RAVEN, 1996).

#### 1.2.1.1 Classe Bacillariophyceae – Diatomáceas

As diatomáceas são organismos em geral unicelulares de grande importância na composição do fitoplâncton, constituindo a fonte alimentar primária para a fauna aquática. A maioria das espécies desta classe é planctônica, porém podemos encontrar algumas espécies em sedimento ou sobre outras algas ou plantas (RAVEN, 1996).

Estima-se em pelo menos 5.600 espécies atuais de diatomáceas. Somando-se ao grande número de espécies extintas, as diatomáceas atingem um total de aproximadamente 40.000 espécies. Frequentemente ocorrem quantidades excepcionais de indivíduos aglomerados em pequenas áreas, sendo que em córregos da América do Norte, podem ocorrer de 30 a 50 milhões de indivíduos do gênero *Achnanthes* em um centímetro quadrado de rocha submersa (RAVEN, 1996).

A luz é um fator de vital importância nos ecossistemas aquáticos. As diatomáceas, que são organismos fotossintetizantes e portanto, necessitam da luz solar para sobreviver, se desenvolvem na Zona Fótica, que representa os 200 metros superiores da águas oceânicas (<http://earthguide.ucsd.edu/diatom/d4.html>).

A classe Bacillariophyceae difere de outras crisófitas pela ausência de flagelos, presentes apenas em alguns gametas masculinos, e pela sua peculiar parede celular.

As diatomáceas são caracterizadas por apresentarem uma parede celular inorgânica, chamada de frústula, refinamente esculpida. A frústula é composta de sílica polimerizada ( $\text{SiO}_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ ) e está dividida em duas metades (valvas) que se encaixam como uma placa de Petri. A valva maior da frústula é denominada epiteca e a valva menor de hipoteca (RAVEN, 1996).

Essa parede de sílica possui alta resistência, muitas vezes permanecendo intacta por um longo período mesmo após a morte celular (BARBER et al., 1981). Após a morte das diatomáceas, suas paredes de sílica alcançam o fundo do mar, e acumulam-se formando uma substância fina e quebradiça conhecida como terra de diatomáceas, a qual pode ser utilizada como abrasivo para polimento de prata, material filtrante, isolante, entre outros.

A taxonomia das diatomáceas está baseada na morfologia da parede de sílica (BARBER et al., 1981). Através da microscopia eletrônica evidenciou-se que as finas estrias de suas paredes celulares são compostas, na verdade, de um grande número de pequenos poros, depressões ou canálculos com formas complexas, que conectam o protoplasma com o exterior (RAVEN, 1996).

Com base na simetria, reconhecem-se dois tipos de diatomáceas: penadas, onde as células apresentam simetria bilateral, e cêntricas apresentando simetria radial. As diatomáceas na forma de pena vivem tanto em águas continentais como nas águas marinhas, enquanto que as diatomáceas cêntricas são mais abundantes em habitats marinhos (LEE, 1989).

As diatomáceas possuem nos seus cloroplastos o pigmento fucoxantina, o que explica sua coloração marrom. As clorofilas presentes nos cloroplastos são as do tipo “a” e “c2” e também “c1” e “c3”. A clorofila “b” ainda não descrita para diatomáceas (HOEK et al., 1995).

A principal forma de reprodução entre as diatomáceas é a reprodução assexuada por divisão celular, onde uma célula se divide em duas (RAVEN, 1996). Quando ocorre a divisão celular, as valvas da célula mãe serão sempre as epitecas (valva maior) das células filhas que produzirá as novas hipotecas (valva menor). Este tipo de reprodução faz com que as células diminuam de tamanho durante várias divisões celulares (LEE, 1989). Quando os indivíduos da espécie chegam a uma redução de cerca de 30% do tamanho inicial pode ocorrer reprodução sexuada. Na reprodução sexuada, após a fecundação dos gametângios femininos pelos masculinos, o “auxósporo” resultante, ou zigoto, desenvolve-se até atingir o tamanho

característico da espécie. Uma vez adulto, o auxósporo se divide e produz novas frústulas idênticas às células parentais (RAVEN, 1996).

As diatomáceas podem formar esporos em alguns momentos do seu ciclo de vida em resposta a condições ambientais desfavoráveis, germinando com a melhora destas condições (LEE, 1989). O processo de germinação forma células maiores do que as células de origem. A formação de esporos é mais freqüentemente utilizada para restabelecer o tamanho das diatomáceas do que a formação de auxósporo, que, dependendo da espécie, pode ocorrer uma vez a cada dois anos (LEE, 1989).

### 1.3 POLISSACARÍDEOS - BACILLARIOPHYCEAE (DIATOMÁCEAS)

A composição e as propriedades, bem como a utilização comercial de muitos carboidratos aniônicos componentes de macroalgas marinhas, como carragenanas, ácido algínico e ágar, são bem conhecidos (PERCIVAL; McDOWELL, 1967 e LEVRING et al., 1969). Entretanto esses tipos de informações são notavelmente escassos para as diatomáceas (ALLAN et al., 1972). Provavelmente, as razões que explicam porque os polissacarídeos no fitoplâncton têm sido muito pouco estudados, podem ser a dificuldade de cultivo e, principalmente, a difícil obtenção de material suficiente para a caracterização química dos polissacarídeos.

As diferentes classes de microalgas diferem muito em seu conteúdo de carboidratos, assim como o de proteínas e lipídios. Embora a diferença na composição bioquímica de muitas espécies possa refletir diferenças genéticas, estas diferenças podem, algumas vezes, ser atribuídas às condições de cultivo ou ao estágio de desenvolvimento da microalga (BROWN et al., 1997).

A importância de estudos sobre a produção e composição de polissacarídeos de diatomáceas em função das condições ambientais são ferramentas de suma importância para o entendimento da bioquímica e ecologia destas células (MYKLESTAD, 1977).

### 1.3.1 Polissacarídeo de Reserva

A principal substância de reserva das diatomáceas é o carboidrato chamado crisolaminarana, a qual está localizada dentro de vesículas celulares (LEE, 1989). A crisolaminarana de diatomáceas difere da laminarana, que é o material de reserva de macroalgas marrons, por não apresentarem terminais redutores de manitol. As diatomáceas, quando submetidas a condições em que exista um baixo grau de nitrogênio no meio que as rodeiam, podem acumular mais de 40% do seu peso do carboidrato de reserva crisolaminarana, correspondendo a 80% do peso seco total do material orgânico (PAINTER, 1982).

A descoberta de uma D-glucana  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3) O-substituída, com ramificações em C-6, que compreendia aproximadamente 14% do peso seco da diatomácea marinha *Phaeodactylum tricornutum*, foi a primeira caracterização química detalhada da crisolaminarana (FORD; PERCIVAL, 1965). MYKLESTAD (1989) estudando o polissacarídeo de reserva da diatomácea *Skeletonema costatum*, caracterizou sua estrutura como sendo uma cadeia média de 11 unidades de D-glucose (1 $\rightarrow$ 3) ligadas, com ramificações nas posições 2 e 6. Este foi o primeiro registro de ligações 1,2 em polissacarídeos de reserva de microalgas, sendo também mais tarde identificadas em algas do continente Antártico.

MYKLESTAD; HAUG (1972), MYKLESTAD (1974) e HAUG; MYKLESTAD (1976) relataram a ocorrência da crisolaminarana em várias microalgas marinhas, e que a glucana  $\beta$ -1,3 ligada pode ser removida por extração ácida fraca das células de diatomáceas, sendo que esse polissacarídeo contém apenas traços de outros açúcares que não glucose.

A função mais conhecida da D-glucana  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3) nas diatomáceas é como produto de reserva. A existência de uma exoenzima  $\beta$ -D-(1 $\rightarrow$ 3)- glucanase em diatomáceas marinhas provavelmente tem a função de hidrolisar esta glucana. A glucose produzida em quantidade considerável fornece energia para os ciclos metabólicos das microalgas e pode suprir o esqueleto carbônico para a biossíntese de aminoácidos (MYKLESTAD, 1989).

Outra função atribuída à crisolaminarana em diatomáceas, pode estar envolvida no desenvolvimento dos esporos, uma vez que estas estruturas são formadas sob condições de grande acúmulo de glucanas. Entretanto essa e outras funções requerem maiores esclarecimentos (MYKLESTAD, 1989).

### 1.3.2 Polissacarídeos da Parede Celular

O componente inorgânico da parede celular das diatomáceas ou frústula, como é mais conhecida, é envolvido por um componente orgânico composto por aminoácidos e principalmente carboidratos (LEE,1989). Esses carboidratos são chamados de polissacarídeos da parede celular.

A composição monossacarídica dos polissacarídeos de parede celular, obtida de várias espécies de diatomáceas já estudadas mostra uma complexa mistura de açúcares. Foi relatada a presença dos monossacarídeos fucose, xilose, manose, galactose, ácido glucurônico e glucose, em grandes variações quantitativas entre as diferentes espécies de diatomáceas (FORD; PERCIVAL, 1965).

Um dos polissacarídeos de parede celular mais estudados é o da diatomácea *Phaeodactylum tricornutum*. Este polissacarídeo solúvel em água apresentou fucose, xilose, manose galactose (LEWIN et al., 1958). Em uma outra investigação com essa mesma microalga marinha foi encontrada uma glucuronomanana sulfatada obtida de uma extração alcalina (4%) a frio. Hidrólise parcial, metilação e oxidação com periodato indicaram que esse polissacarídeo consistia de uma cadeia principal formada por unidades de manose com baixo grau de sulfatação e ramificações com unidades de ácido glucurônico e manose (FORD; PERCIVAL, 1965).

COOMBS; VOLCANI (1968a) estudaram o polissacarídeo da parede celular da diatomácea *Navicula pelliculosa*. A composição monossacarídica mostrou a presença de fucose, xilose, manose e ácido glucurônico. Através do método de incorporação de  $^{14}\text{C}$  pela sílica, foi demonstrado que a fucose e a xilose são depositadas na parede depois que a deposição da sílica cessa, enquanto a manose e o ácido glucurônico são depositados em um estágio posterior, como um crescimento secundário destas paredes (COOMBS; VOLCANI, 1968b).

Estudos dos polissacarídeos da parede celular de seis diferentes espécies de diatomáceas, pertencentes aos gêneros: *Cyclotella*, *Nitzschia*, *Melosira*, *Navicula*, mostraram uma considerável variação na composição monossacarídica sendo que fucose, xilose, manose galactose e glucose foram os principais açúcares enquanto apenas uma quantidade pequena de ramnose estava presente. (HECKY et al., 1973).

HAUG e MYKLESTAD (1976) estudaram sete diferentes espécies de diatomáceas. Os polissacarídeos obtidos após extração ácida fraca das células de

diatomáceas apresentaram mais de 95% do seu conteúdo formado de glucose, identificado como crisolaminarana. Esses dados concordam com as observações de MYKLESTAD e HAUG (1972); MYKLESTAD (1974), que demonstraram a eficiência deste tipo de extração para o polissacarídeo de reserva crisolaminarana. Subseqüente, extrações alcalinas das células das diatomáceas estudadas por HAUG e MYKLESTAD (1976), renderam uma fração polissacarídica que representava os polissacarídeos da parede celular. As frações apresentaram uma complexa mistura e uma grande variação monossacarídica, sendo encontrado ramnose, fucose, galactose, manose e xilose. A quantidade relativa das formas 6-deoxi açúcares fucose e ramnose variaram muito de uma espécie para outra e as amostras obtidas na fase estacionária de cultivo foram mais ricas em 6-deoxi açúcares quando comparadas com amostras obtidas na fase logarítmica

Segundo HAUG e MYKLESTAD (1976) o monossacarídeo ramnose apesar de não ser muito comum em diatomáceas, é um importante constituinte dos polissacarídeos da parede celular do gênero *Chaetoceros*, uma vez que todas as espécies desse gênero mostraram uma alta proporção de ramnose enquanto que nas outras espécies de diatomáceas foram encontrados somente traços ou, como na *Thalassiosira gravida*, não foi encontrado ramnose.

### 1.3.3 Polissacarídeo Extracelular

Estudos mostram que o fitoplâncton pode produzir uma quantidade considerável de compostos orgânicos, nos quais os carboidratos merecem destaque (FOGG, 1993, MYKLESTAD et al., 1989, MALEJ; HARRIS, 1993). Carboidratos de alta massa molar, representam os principais constituintes de mucos secretados pelo fitoplâncton (DECHO, 1990).

Entre as funções dos polissacarídeos secretados pelo fitoplâncton, sugere-se que esses possam estar envolvidos com a propriedade de adesão das células a superfícies e na adesão célula-célula. Além disso, os polissacarídeos possuem um papel importante na formação de agregados orgânicos multicelular, que são fonte de alimento para vários organismos marinhos (YOSHIDA, 1991).

Provavelmente todas as diatomáceas secretam polissacarídeos, alguns dos quais podem se difundir pelo meio que os rodeiam enquanto outros podem

permanecer como uma cápsula gelatinosa ao redor das células chamada de mucilagem (ROUND et al.,1990).

Em células mantidas em cultivo é necessário diferenciar o que é polissacarídeo produzido e secretado pelas células saudáveis e o que é material de vazamento de células que sofreram lise celular, para que esse não seja classificado erroneamente como exopolissacarídeo. Portanto se faz necessário no estudo dos exopolissacarídeos de microalgas um controle rigoroso nas condições de cultivo, assim como a determinação da curva de crescimento, a fim de assegurar células viáveis e saudáveis. A causa mais comum de morte celular ocorre como resultado de condições extremas, como de luz, nutriente, salinidade e pH. Causas biológicas como ataque de bactérias e de vírus são menos comuns mas também podem causar lise celular (MYKLESTAD, 1999).

Na literatura, não está bem claro, se as frações celular e extracelular são polímeros diversos, apresentando composição monossacarídica diferente, ou se possuem a mesma composição química. HAUG e MYKLESTAD (1976) relataram que a composição monossacarídica dos exopolissacarídeos de várias espécies de diatomáceas estudadas é muito diferente dos polissacarídeos celular dessas mesmas microalgas, resultados esses que concordam com os de ALLAN et al. (1972), que relataram uma quantidade considerável de ramnose no produto extracelular e somente traços desse açúcar no polissacarídeo celular de diatomáceas representante dos gêneros: *Nitzschia*, *Cyclotella*, *Navicula* e *Asterionela*.

O mecanismo proposto de exsudação dos polissacarídeos pelas diatomáceas é a exocitose, onde as vesículas formadas pelo complexo de Golgi, na qual se encontram os polissacarídeos, se fundem com a membrana celular despejando o seu conteúdo para fora da célula (MYKLESTAD, 1995).

Neste trabalho denominaremos os polissacarídeos que formam a mucilagem extracelular de polissacarídeos da cápsula mucilagínosa e os polissacarídeos que são solúveis na água do mar de exopolissacarídeos solúveis.

### 1.3.3.1 Exopolissacarídeos Solúveis

Os exopolissacarídeos solúveis são os polissacarídeos secretados pelas células que permanecem dissolvidos e difundidos no meio. A função do exopolissacarídeo solúvel ainda não está bem esclarecida, entretanto propõe-se que a secreção de polissacarídeos por diatomáceas, possa estar envolvida na sua “locomoção” e facilitando adesão das células entre si e a substratos (STAATS et al.,2000).

A TABELA 1 mostra a composição monossacarídica dos exopolissacarídeos de várias espécies de diatomáceas marinhas, evidenciando a grande variedade dos açúcares entre as espécies estudadas. Essa variação é relatada dentro de um mesmo gênero (*Chaetoceros*), bem como, existe variação na composição monossacarídica dentro de uma mesma espécie (*Nitzschia angularis*) reportadas por autores diferentes (ALLAN et al., 1972, HAUG; MYKLESTAD, 1976, MEDCALF et al., 1974). Além disso, a maior parte dos estudos relativos a estes carboidratos se refere à composição monossacarídica dos exopolissacarídeo das frações brutas, ou seja, não são de polímeros isolados.

ALLAN et al. (1972) investigaram a produção de exopolissacarídeos solúveis no cultivo de oito diferentes espécies de diatomáceas, relatando que todas as diatomáceas tiveram uma produção muito pequena de exopolissacarídeos, com exceção da espécie *Nitzschia frustulum*, que apresentou composição monossacarídica formada por ramnose (24%), manose (34%), galactose (8%) e dois componentes não identificados (14 e 20%).

Polissacarídeos das diatomáceas marinhas *Nitzschia angularis* e *Amphora coffaciformis* foram investigadas, sendo que a composição monossacarídica da primeira apresentou xilose e manose, enquanto que a segunda mostrou-se composta por xilose, galactose e glucose como principais constituintes (MEDCALF et al., 1974).

TABELA 1: Principais monossacarídeos encontrados em alguns exopolissacarídeos exudados por diatomáceas marinhas. (\* Exopolissacarídeo purificado).

ESPÉCIES	COMPOSIÇÃO QUÍMICA	REFERÊNCIA
<i>Nitzschia frustulum</i> ;	Ramnose e manose;	ALLAN et al. (1972)
<i>Nitzschia angularis</i> ;	Ramnose e fucose;	
<i>Navicula incerta</i> ;	Ramnose e fucose;	
<i>Cyclotella nana</i> ;	Ramnose;	
<i>Asterionella socialis</i> .	Ramnose.	
<i>Chaetoceros curvisetus</i> .	Fucose, galactose e ramnose.	MYKLESTAD et al. (1975).
<i>Chaetoceros decipiens</i> ;	Manose, ramnose;	HAUG; MYKLESTAD (1976).
<i>Chaetoceros affinis</i> ;	Ramnose, galactose fucose, manose;	
<i>Chaetoceros debilis</i> ;	Galactose, ramnose;	
<i>Chaetoceros socialis</i> ;	Ramnose, fucose e galactose;	
<i>Corethron hystrix</i> ;	Fucose;	
<i>Thalassiosira gravida</i> .	Fucose e galactose.	
<i>Amphora</i> sp;	Xilose, galactose e glucose;	MEDCALF et al. (1974)
<i>Nitzschia angularis</i> .	Xilose, manose.	
<i>Amphipleura rutilans</i> Cleve;	Xilose, manose, ramnose;	DARLEY, (1977)
<i>Navicula pelliculosa</i> Hilse.	Ácido poliglucurônico	
<i>Coscinodiscus nobilis</i> .	Fucose, ramnose, manose, glucose, xilose, ácido glucurônico e galactose.	PERCIVAL et al. (1980)
* <i>Coscinodiscus nobilis</i> .	* Glucose.	PERCIVAL et al. (1980)
<i>Navicula subinflata</i> Hilse.	Glucose.	BHOSLE et al. (1995)
<i>Amphora cofferaeformis</i> .	Glucose.	BHOSLE et al. (1996)
<i>Cylindrotheca closterium</i> e <i>Nitzschia</i> sp	Ácido glucurônico, galactose e ácido galacturônico.	BROUWER; STAL et al. (2002)
<i>Amphora holsatica</i> ;	Ramnose e ácido urônico;	
<i>Melosira nummuloides</i> ;	Ácido urônico; ramnose e glucose;	LEANDRO, et al. (2003)
<i>Navicula directa</i> .	Ácido urônico; ramnose.	
* <i>Thalassiosira</i> sp.	* Fucose e galactose.	LOPES (2003)

A composição monossacarídica do exopolissacarídeos de espécies de diatomáceas pertencentes ao gênero *Chaetoceros* é simples e bem estudada. Três espécies, *C. affinis*, *C. curvisetus*, *C. decipiens*, mostraram produzir quantidades significativas de exopolissacarídeo, principalmente no início da fase estacionária. Esses exopolissacarídeos são todos sulfatados e formados por galactose, ramnose, fucose e manose em diferentes proporções (HAUG; MYKLESTAD et al., 1976). Na espécie *C. affinis* foi relatada a produção de um polissacarídeo altamente ramificado e complexo tendo unidades de ramnose principalmente como grupos terminais, enquanto no polissacarídeo da espécie *C. curvisetus*, os grupos terminais são compostos principalmente de unidades de fucose na forma furanosídica (SMESTAD et al., 1974). Estudos de metilação mostraram que os polissacarídeos produzidos por *C. decipiens* possuem uma estrutura muito similar aos da espécie *C. affinis*, enquanto os polissacarídeos produzidos pela espécie *C. curvisetus* são bem diferentes (MYKLESTAD et al., 1975).

#### 1.3.3.2 Polissacarídeos da Cápsula Mucilaginosa

Muitas diatomáceas sintetizam ao seu redor uma mucilagem viscosa ou gelatinosa que não se difunde no meio aquoso, denominada de polissacarídeos da cápsula mucilaginosa. Em muitos casos a quantidade produzida é pequena em outras essa produção é significativa (PAINTER, 1982). Existem ainda dúvidas, não estando claro na literatura se a composição, assim como a função do polissacarídeo da cápsula mucilaginosa e do exopolissacarídeo, são ou não iguais.

A maioria dos componentes moleculares dessa mucilagem é formada de heteropolissacarídeos complexos contendo uma grande variedade de aldoses (BIERSMITH et al., 1998).

A função da mucilagem nas diatomáceas parece estar envolvida com a sua sobrevivência (PAINTER, 1982). Propõe-se que o microambiente criado pela mucilagem protege as células de rápidas mudanças nas condições ambientais, além de funcionar como ancoras para formação de colônias e concentrando os nutrientes ao seu redor, facilitando o desenvolvimento das diatomáceas (BIERSMITH et al., 1998).

#### 1.4 A ESPÉCIE *Coscinodiscus wailesii* (BACILLARIOPHYCEAE)

A diatomácea cêntrica *Coscinodiscus wailesii* Gran et Angst foi encontrada na costa sudoeste da Inglaterra 1977 (como *Coscinodiscus nobilis* Grunow), sendo originada dos Oceanos Pacífico e Índico (BOALCH; HARBOUR 1977). Desde então, esta microalga tem sido observada em diferentes regiões do mundo formando florações e prejudicando áreas de pesca e cultivo comerciais. Alguns efeitos desta espécie no ecossistema marinho começaram a ser investigados recentemente. NAGAI et al., (1995 e 1995a) observaram sérios danos nas culturas de “Nori” (*Porphyra*), macroalga marinha muito utilizada comercialmente como alimento, devido à absorção acelerada de nutrientes por *C. wailesii* durante sua floração na costa japonesa.

As florações do plâncton marinho têm grande importância ecológica e são eventos caracterizados por um crescimento maciço de determinadas microalgas quando ocorrem simultaneamente condições ótimas de luz, nutrientes e temperatura, permitindo que as células se acumulem por um determinado período (LEGENDRE, 1990; BRANDINI, 1997).

As florações de algumas espécies de microalgas, como a *Coscinodiscus wailesii*, podem trazer conseqüências negativas ao ecossistema e à saúde humana, através da produção e liberação de toxinas para o meio ambiente e através de várias alterações nas cadeias tróficas aquáticas (HALLEGRAEFF et al., 1993 e HALLEGRAEFF et al., 1995).

Estima-se que 300, das 3.400 - 4.100 espécies de diferentes divisões de algas (dinoflagelados, diatomáceas, rafidófitas, cianófitas) do fitoplâncton são, capazes de produzir florações (SMAYDA, 1997).

Algumas diatomáceas podem causar dano e morte aos organismos marinhos, devido as suas florações, através de quatro diferentes maneiras: (1) pela produção de toxinas, como ácido domóico (*Pseudonitzschia* spp.), (2) por dificuldade respiratória devido à irritação da mucosa branquial de peixes causada pelas frústulas (*Chaetoceros* spp.), (3) por absorção acelerada de nutrientes causando como conseqüência à diminuição e morte de outras microalgas do fitoplâncton que são fonte alimentar do zooplâncton e através da depleção de oxigênio na coluna d'água, pela intensa respiração da alga; (4) pela incompleta decomposição da diatomácea por bactérias no fundo do mar (HASLE; FRYXELL, 1995). Estas duas últimas causas

têm sido especuladas como as razões que levam a microalga *Coscinodiscus wailesii* ser nociva.

A distribuição da espécie, antes restrita ao Pacífico Tropical e ao Atlântico Ocidental, ampliou-se até a Europa, Estados Unidos, Japão e Austrália, tornando-se, em algumas áreas, importante componente da comunidade fitoplanctônica (LANGE et al., 1992; RICK; DÜRSELEN, 1995) No Brasil, apesar dos vários trabalhos taxonômicos realizados a partir de 1960, a espécie foi citada apenas recentemente no sul do país (VALENTE-MOREIRA et al., 1987; MOREIRA FILHO et al., 1990; FERNANDES, 1992 e SOUZA-MOSIMANN et al., 1993).

Na Baía de Paranaguá, estado do Paraná, a espécie *C. wailesii* tem sido encontrada desde 1991 em baixas concentrações em todos os meses do ano, e produzindo florações esporadicamente (FERNANDES et al., 1992; BRANDINI et al., dados não publicados). Sendo que nesses períodos de florações foi observada uma marcada diminuição na população do fitoplâncton e zooplâncton da região (LOPES e SPACH, dados não publicados). Embora a relação entre esses eventos ainda não tenha sido explicada, a possibilidade da diatomácea *C. wailesii* causar efeitos nocivos motiva a realização de vários estudos sobre essa espécie ecologicamente importante (FERNANDES, 2001).

A expansão mundial da diatomácea *C. wailesii* nos últimos anos tem sido explicada por vários autores (LANGE, et al., 1992; RICK; DÜRSELEN, 1995). As duas hipóteses mais aceitas são que a espécie tenha sido transportada através de embarcações por água de lastro (HALLEGRAEFF, 1993) ou por organismos marinhos exóticos contaminados que são introduzidos e cultivados para utilização comercial (RINCÉ; PAULMIER, 1986). Na Baía de Paranaguá, o Porto de Paranaguá, recebe navios de vários países do mundo, e não há cultivo de organismos marinhos exóticos na região, mas somente de organismos nativos, como ostras e moluscos. Portanto, a hipótese da microalga *C. wailesii* ter chegado ao Paraná trazida por uma rota através de navio, por água de lastro, parece ser a mais provável (FERNANDES, 2001). Apesar de não ser tóxica, quando encontrada em grande quantidade a *C. wailesii* pode diminuir o índice de nutrientes e também de oxigênio da água provocando a morte de peixes ou migração para outras áreas.

*Coscinodiscus wailesii* é uma diatomácea marinha cêntrica, de grandes dimensões (diâmetro valvar 280-500  $\mu\text{m}$ ), caracterizada pela frústula cilíndrica com a superfície valvar plana, roseta central hialina, duas macrorimopórtulas e dois anéis

marginais de rimopórtulas sobre o manto (FERNANDES, 2001). A FIGURA 1 mostra a microalga *C. wailesii*, retirada de culturas realizadas no Laboratório de Cultivo e Química de Polissacarídeos de Microalgas do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFPR.

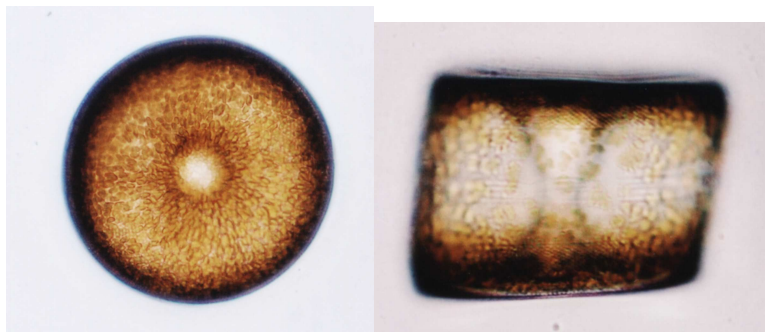


FIGURA 1: Diatomácea *Coscinodiscus wailesii*. (vista lateral e frontal em aumento de 400 X).

A microalga escolhida para este trabalho apresenta a seguinte classificação taxonômica segundo TOMAS et al. (1996):

Reino: Protista;  
Filo: Chrysophyta;  
Classe: Bacillariophyceae;  
Ordem: Biddulphiales;  
Família: Coscinodiscaceae;  
Gênero: *Coscinodiscus*  
Espécie: *Coscinodiscus wailesii*

#### 1.4 Polissacarídeos da microalga *C. wailesii*

Uma cuidadosa revisão bibliográfica foi realizada sobre os estudos de polissacarídeos produzidos pela microalga *C. wailesii* publicados até o momento, visando compreender melhor os danos causados ao ecossistema marinho, uma vez

que esses danos já foram atribuídos à grande quantidade de mucilagem produzida por essa espécie de diatomácea (BOALCH, 1984).

PERCIVAL et al. (1980), estudaram polissacarídeos de *C. wailesii*, ainda classificada como *C. nobilis*, coletada no oeste do Canal Inglês no Reino Unido. Os autores analisaram os polissacarídeos da mucilagem, do extrato da lama coletados do fundo do mar e o exopolissacarídeo, por técnicas de CG-EM e cromatografia em papel. A determinação da composição monossacarídica da mucilagem e do extrato da lama revelou a presença de fucose, ramnose, glucose, galactose e ácido glucurônico, este último revelado por eletroforese em papel.

Os exopolissacarídeos produzidos pela diatomácea *C. wailesii* foram obtidos de cultura em meio Erd-Schreiber. O cultivo foi realizado por 10 semanas e condições como temperatura, iluminação e fotoperíodo não foram padronizados. A análise da composição monossacarídica dessa fração revelou a presença de uma glicana sulfatada rica em unidades de fucose e ramnose, mas também contendo manose, xilose e ácido glucurônico. Análises de metilação mostraram fucose e ramnose ligadas através de ligações (1→3) e (1→2), respectivamente, e também formando ramificações. Unidades de manose apresentaram ligações (1→6) e unidades de xilose estavam presentes principalmente como grupos terminais piranosil. Os exopolissacarídeos foram fracionados em coluna DE-52 celulose e o material mostrou ser composto de, no mínimo, 3 diferentes polímeros: (i) uma glucana; (ii) um polímero contendo todos os monossacarídeos citados acima exceto a glucose e (iii) um polímero contendo manose e fucose. Análises de metilação e oxidação com periodato de sódio da glucana encontrada, revelou ligações principais do tipo (1→3), sendo que essa glucana (1→3) foi caracterizada como sendo o polissacarídeo de reserva crisolaminarana (PERCIVAL et al., 1980).

A crisolaminarana é um polissacarídeo de reserva das diatomáceas (PAINTER, 1982) e não há na literatura relatos se ela pode ou não ser secretada no meio de cultivo celular. Percival et al. (1980) esclarecem que apesar da crisolaminarana ter sido detectada na fração que representava o exopolissacarídeo, não foi possível assegurar se a crisolaminarana também pode ser secretada pelas células ou se foi derivado de células mortas rompidas durante o longo cultivo.

As condições de cultivo celular não padronizadas e principalmente a não determinação de uma curva de crescimento para se conhecer qual as condições das células após as 10 semanas de cultivo (o que representa um tempo muito longo para

que as células continuem viáveis, já que a cultura era estática e não contínua), impediram de esclarecer se a crisolaminarana foi ou não secretada pelas células. Portanto, é possível que os autores PERCIVAL et al. (1980) determinaram como polissacarídeos extracelulares não apenas os exopolissacarídeos secretados pela microalga, mas também os do conteúdo citoplasmático extravasado de células mortas.

Desta forma, os polissacarídeos extracelulares solúveis merecem ser reavaliados, assim como o estudo dos polissacarídeos da cápsula mucilaginosa e da parede celular, uma vez que não se têm relatos dessas frações polissacarídicas de *C. walesii*, que é uma espécie ecologicamente importante pelo seu ocasional dano ao plâncton marinho, inclusive no litoral do Paraná.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho tem como objetivo geral o cultivo e estudo da estrutura e composição química dos polissacarídeos da microalga *Coscinodiscus wailesii*.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar e cultivar a microalga *Coscinodiscus wailesii*, determinando as condições ideais para o cultivo, assim como as fases de crescimento.
- Extrair e isolar os exopolissacarídeos secretados no meio de cultura, os polissacarídeos da parede celular e os polissacarídeos da cápsula mucilaginosa.
- Purificar, caracterizar e determinar a estrutura química do exopolissacarídeo solúvel através de métodos químicos e espectroscópicos.
- Caracterizar a composição lipídica da fração celular .

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 CULTIVO DA MICROALGA MARINHA *Coscinodiscus wailesii*.

##### 3.1.1 *Coscinodiscus wailesii*

A microalga *C. wailesii* foi coletada na Baía de Paranaguá, litoral do Paraná, classificada pelo Prof. Dr. Luciano F. Fernandes (Departamento de Botânica, UFPR, Curitiba-PR) e gentilmente cedida para o isolamento e cultivo.

##### 3.1.2 Preparação do material utilizado no Cultivo

Vidraria e instrumental utilizadas no cultivo foram previamente lavadas, enxaguadas em água destilada, secas em estufa e autoclavadas a 121°C por 20 minutos em autoclave vertical marca PHOENIX. Os balões de cultivo receberam tampões confeccionados com algodão e gaze, recobertos como papel *craft* antes da esterilização. Após esterilização foram levados à estufa, da marca FANEN, Modelo 315 SE, para completa secura a 80°C.

##### 3.1.3 Condições de Cultivo

O cultivo da microalga *C. wailesii* foi realizado em sala climatizada, sobre bancadas, com iluminação proveniente de lâmpadas fluorescentes, posicionadas no alto da sala. A intensidade de irradiação na sala foi de 45 mol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> e fotoperíodo de 12 horas, controlado por um temporizador automático da marca Elcosul. A temperatura da sala foi mantida em 22°C ± 1°C por um aparelho de ar condicionado do tipo *Splitt* da marca Springer.

Para o aumento de biomassa do cultivo celular (Cultura de Extração) e a determinação da curva de crescimento foram utilizados balões de 12 L contendo 7 L de meio de cultura sob aeração constante, que foi mantida por um renovador duplo de ar marca Tropical II conectado a uma mangueira e a uma pipeta de vidro de 20 ml esterilizada que ficou em contato com o meio.

Erlenmeyers de 2 L contendo 1 L de meio de cultura foram utilizados para a manutenção das células e para fornecer material de inóculo para as culturas de extração (Cultura de Manutenção).

#### 3.1.4 Meios de Cultura

Os meios de cultura foram elaborados a partir de água do mar proveniente do litoral do Paraná. As coletas foram realizadas periodicamente a partir do mês de outubro de 2002. Previamente ao preparo do meio, a água foi filtrada em funil contendo algodão por duas vezes.

O meio utilizado para o cultivo da microalga *C. walesii* foi o Guillard-f/2 (GUILLARD; RYTHER, 1962; GUILLARD, 1975) de composição definida e amplamente utilizado em experimentos com microalgas. O meio f/2-Guillard foi preparado a partir das soluções descritas a seguir:

##### Soluções Estoques:

Solução estoque 1 - $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,1g
Solução estoque 2 - $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,2 g
Solução estoque 3 - $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,1 g
Solução estoque 4 - $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1,8 g

Para cada uma das soluções estoques os sais foram pesados e solubilizados separadamente em 100 ml de água destilada.

##### Solução de Metais:

- $\text{Na}_2\text{EDTA}$	0,436 g
- $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,315 g
- Solução estoque 1	0,1 ml
- Solução estoque 2	0,1 ml
- Solução estoque 3	0,1 ml
- Solução estoque 4	0,1 ml
- $\text{H}_2\text{O}$ destilada q.s.p.	100 ml

**Solução A:** NaNO<sub>3</sub>

- NaNO<sub>3</sub> 7,5 g
- H<sub>2</sub>O destilada q.s.p. 100 ml

**Solução B:** NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

- NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. H<sub>2</sub>O 0,5 g
- H<sub>2</sub>O destilada q.s.p. 100 ml

**Solução C:** Na<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub>

- Na<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub>. 9H<sub>2</sub>O 3,0 g
- H<sub>2</sub>O destilada q.s.p. 100 ml

Solução Vitaminas

- Tiamina 100 mg
- Biotina 0,5 mg
- Vitamina B12 0,5 mg
- H<sub>2</sub>O destilada q.s.p. 100 ml

As soluções A, B, C e de metais foram autoclavadas separadamente. O meio enriquecido foi obtido com a adição de 1 ml de cada solução (A, B, C e metais) em 1000 ml de água do mar autoclavada. Por último foi acrescentado 0,5 ml da solução de vitaminas previamente filtradas em filtros estéreis de 0,2 µm. Todo procedimento foi realizado em fluxo laminar vertical (modelo VLFS-12) sob condições assépticas. O pH do meio f/2 é  $8,2 \pm 1$ .

### 3.2 ADAPTAÇÃO E ISOLAMENTO (descontaminação) DAS CÉLULAS DE *C. wailesii*

#### 3.2.1 Adaptação das Células em Microcultivos - Adaptação I

Um total de 4 células da microalga *C. wailesii* foi doado para o cultivo que foi realizado em placas de 96 poços, 24 poços e 12 poços, seqüencialmente. As condições de cultivo e o meio utilizado estão descritos nos itens 3.1.3 e 3.1.4,

respectivamente. Após o período de adaptação e multiplicação, as células eram coletadas (micromanipuladas), com auxílio de pipeta de Pauster e lupa, e colocadas em placas de poços maiores, seguindo a ordem descrita anteriormente. O tempo necessário de adaptação em cada placa variou de 10 dias a 4 semanas.

### 3.2.2 Adaptação das Células em Macrocultivos – Adaptação II

Após o isolamento e a adaptação em microcultivo da microalga *C. wailiesii* (adaptação I), as células foram seqüencialmente crescidas em Erlenmeyers de 250 mL, 500 mL e 2000 mL, sob aeração. Essa etapa foi realizada para promover a adaptação da microalga para o cultivo em balões de 12 L, contendo 7 L de meio de cultura.

### 3.2.3 Descontaminação do Cultivo

Para monitorar a contaminação das culturas de *C. wailiesii* por bactérias, foi utilizada coloração pelo método de Gram. O meio de cultura fixado em lâmina de vidro foi tratado com os reagentes na seguinte ordem: o corante púrpura cristal violeta, a solução de iodo, o álcool e o corante vermelho safranina.

Foram utilizadas duas estratégias para a descontaminação das culturas:

- a) Uso de antibióticos de acordo com os métodos de MYKLESTAD (1974) e WANG (1997): estreptomicina e penicilina G (1:2) na concentração de 600 mg/L de cultura e uma solução de 30 µg/ml de kanamicina, eritromicina e penicilina G, respectivamente.
- b) Descontaminação por isolamento segundo o método de NAGAI et al., (1998) modificado. O isolamento foi realizado em placa de 24 poços contendo meio f/2, com auxílio de lupa e pipeta de Pauster. Uma única célula colocada no poço 1 foi, seqüencialmente, transferida entre os poços, até o 24º. Após a lavagem e descontaminação as células foram cultivadas de acordo como descrito nos itens 3.2.1 e 3.2.2, respectivamente. Todo o procedimento foi realizado sob condições assépticas.

### 3.3 CURVA DE CRESCIMENTO DA *Coscinodiscus wailesii*

#### 3.3.1 Condições de cultivo

Foram realizadas para a diatomácea *C. wailesii* duas curvas de crescimentos as quais diferiram entre si no meio de cultivo:

Curva de crescimento Padrão: Curva realizada em condições de cultivo padrões em meio f/2 com aeração.

Curva de crescimento Modificada: Curva realizada em condições de cultivo padrões em meio f/2 com aeração e diminuição de 5x da concentração de nitrogênio (STAATS et al., 2000).

#### 3.3.2 Estimativa do Número de Células

Culturas em triplicatas foram utilizadas para a determinação de cada curva de crescimento. O inóculo inicial (dia zero), em ambas as curvas, foi de aproximadamente 2 células/mL de meio de cultivo, obtidas de uma cultura anterior em fase logarítmica de crescimento. O desenvolvimento das culturas foi analisado pela contagem de células em dias alternados, até o vigésimo dia.

Para a contagem das células foram coletados 5 mL do meio de cultura, após agitação dos balões de cultivo. O volume coletado foi fracionado em alíquotas de 0,5 ml em placas de 12 poços e as células foram visualizadas e contadas com auxílio de lupa (aumento de 300x). O número de células em cada dia de cultivo foi obtido pela média do número delas visualizadas em dez contagens.

#### 3.3.3 Cálculo do Tempo de Geração e $\mu_{\text{máx}}$

O cálculo do tempo de geração foi realizado segundo SHAPIRO (1997) e o cálculo para  $\mu_{\text{máx}}$  foi realizado segundo EPA (1971), através das seguintes fórmulas:

- a)  $n = (\log N_t - \log N_0) / \log 2$
- b)  $TG = T(t_2 - t_1) / N$
- c)  $\mu_{\text{máx}} = \ln (N_t/N_0) / T$

Onde,  $n$  é o número de geração;  $N_t$  é o número de células no final da fase exponencial,  $N_0$  é o número de células no início da fase exponencial,  $T$  é o período (dias) de duração da fase exponencial.

### 3.3.4 Metabólitos Dosados Durante a Curva de Crescimento

O Açúcar total e a proteína foram dosados conforme itens 3.6.1 e 3.6.2, entre o dia zero e o dia vinte, alternadamente.

## 3.4 EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS

### 3.4.1 Extração dos Exopolissacarídeos Solúveis

A fração extracelular foi obtida por filtração das culturas em funil de Büchner equipado com papel de filtro (Filtrado I). O filtrado foi concentrado em evaporador rotatório BÜCHII à temperatura de 50°C, dialisado contra água corrente, exaustivamente por aproximadamente 10 dias e liofilizado (liofilizador CRYOLISER – New Brunswick Scientific Co. Inc). O material obtido nesta etapa de trabalho foi chamado Fração EXO. A massa celular retida no papel de filtro foi chamada de Resíduo I.

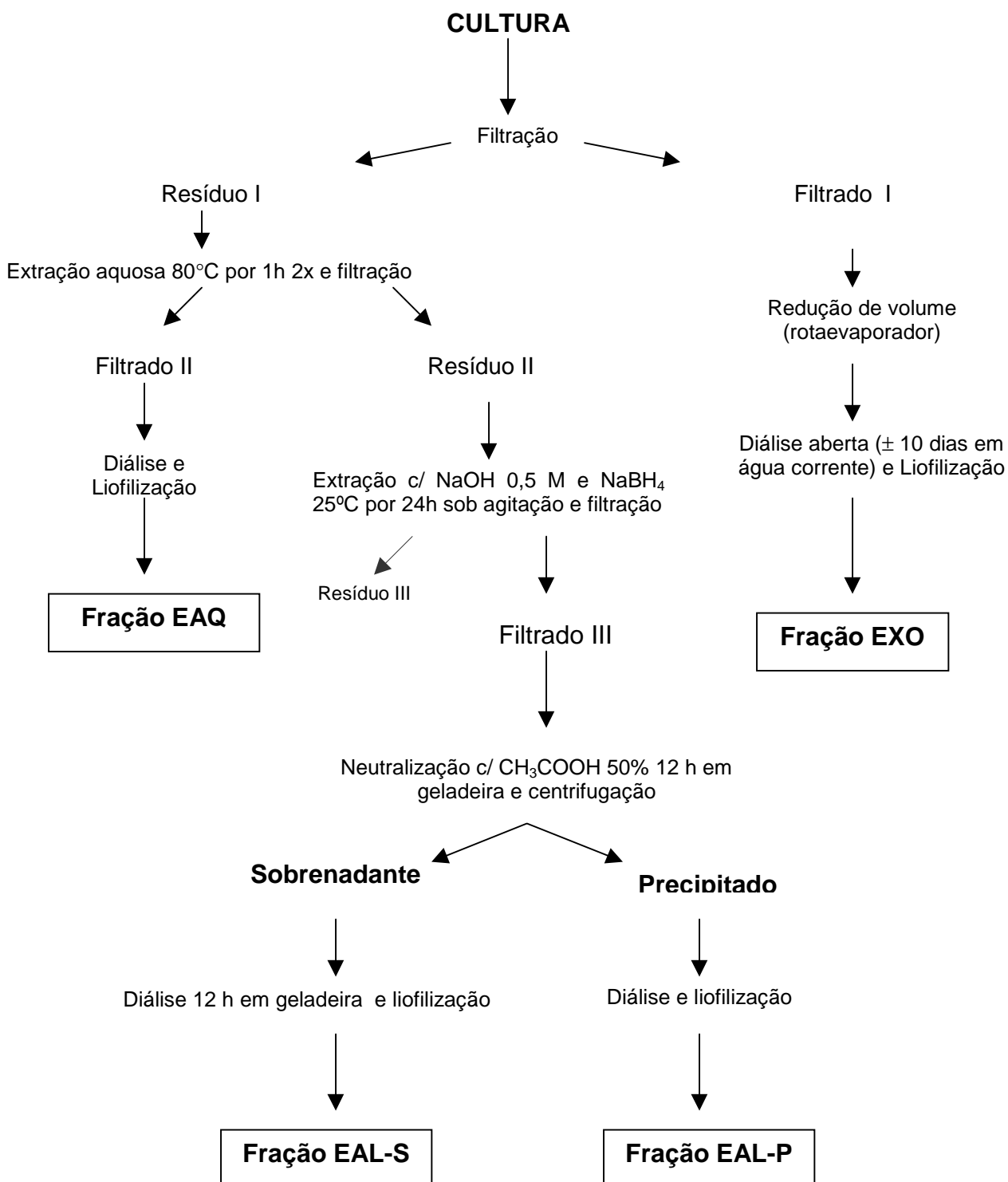
### 3.4.2 Polissacarídeos da Cápsula Mucilaginosa e da Parede Celular

O resíduo I (massa celular) foi ressuspenso em água e submetido à extração aquosa por uma hora a 80°C por 2 vezes. Após as extrações o material foi filtrado (Filtrado II), dialisado, concentrado e liofilizado dando origem a Fração EAQ.

O resíduo da extração aquosa (Resíduo II) foi submetido a uma extração alcalina com NaOH 0,5 M e NaBH<sub>4</sub> por 24 horas sob agitação. Após a extração o material foi filtrado (Filtrado III) e neutralizado com CH<sub>3</sub>COOH a 50%. Esta solução foi mantida em repouso (12 horas em geladeira) e, em seguida, submetida à centrifugação. O sobrenadante obtido foi dialisado e liofilizado, dando origem à Fração EAL-S. O precipitado obtido após a neutralização foi dialisado e liofilizado obtendo-se a Fração EAL-P.

As etapas de obtenção das diferentes frações dos polissacarídeos da microalga *C. walesii* (exopolissacarídeos solúveis, polissacarídeos da cápsula mucilaginosa e polissacarídeos da parede celular) estão descritas no FLUXOGRAMA I.

FLUXOGRAMA I: ESQUEMA DE EXTRAÇÃO E OBTENÇÃO DAS DIFERENTES FRAÇÕES DE POLISSACARÍDEOS.



### 3.5 COLORAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS ÁCIDOS E SULFATADOS

Para a coloração dos polissacarídeos foi utilizado o método do Alcian Blue, segundo LOPES (2003). A solução do corante foi preparada utilizando-se 1 g de Alcian Blue, 3 ml de ácido acético glacial solubilizados em água destilada q.s.p. 100 mL. A solução foi ajustada para pH 1,0. Foram preparadas lâminas compostas de células coradas, que foram visualizadas e fotografadas em microscópio óptico.

### 3.6 EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE LIPÍDEOS

A massa celular da alga liofilizada foi submetida à extração de lipídeos utilizando clorofórmio-metanol (2:1). As extrações foram realizadas em um sistema de refluxo, mantendo-se a temperatura em 80° C. Foram realizadas três extrações de 2 horas cada. Após estes períodos, os extratos foram reunidos, filtrados a quente e evaporados à temperatura ambiente.

A análise da composição de ácidos graxos foi realizada após processo de metanólise. A 10 mg do material de extração foram adicionados em 1 mL de metanol saturado com HCl, e mantido por 2 horas a 85° C. Foi adicionado carbonato de prata até pH 7,0. Após a precipitação do cloreto de prata, os ácidos graxos derivatizados na forma de metil-ésteres, que estavam no sobrenadante, foram submetidos à análise em CG - EM. A identificação dos compostos foi feita baseada nos tempos de retenção e no perfil de fragmentação.

### 3.7 MÉTODOS ANALÍTICOS

#### 3.7.1 Dosagem de Proteínas

A dosagem de proteínas foi realizada segundo BRADFORD (1976). Albumina bovina foi usada como padrão em concentrações de 5 µg a 50 µg/ml. O método baseia-se no princípio da formação de um complexo pela ligação entre o corante (*Coomassie Brilliant Blue G250*) e proteína. A leitura do complexo formado foi realizada em 595 nm. A sensibilidade do método varia entre 1 e 100 µg de proteína.

### 3.7.2 Dosagem de Açúcar Total

A dosagem de açúcar total foi realizada segundo DUBOIS et al. (1956). A curva padrão foi realizada utilizando glucose em concentrações de 20 a 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . O complexo colorido foi medido por espectrofotômetro em 490 nm.

### 3.7.3 Dosagem de Grupamentos Sulfatos

A determinação de grupamentos sulfatos foi realizada empregando o método descrito por DODGSON, (1961), que utiliza gelatina-bário como reagente e padrão de sulfato de sódio. As leituras foram feitas em espectrofotômetro a 360 nm.

### 3.7.4 Dosagem de Ácidos Urônicos (Colorimétrico)

Para a determinação de ácidos urônicos foi utilizado o método do m-hidroxibifenil descrito por FILIZETTI-COZZI; CARPITA (1991). A percentagem de ácido urônico foi calculada a partir de uma curva padrão utilizando concentrações de 5 a 40  $\mu\text{g}$  de ácido glucurônico. A leitura foi feita em espectrofotômetro em 520 nm.

## 3.8 PROCEDIMENTOS PARA ANÁLISE DA ESTRUTURA QUÍMICA DOS POLISSACARÍDEOS

### 3.8.1 Hidrólise ácida

#### 3.8.1.1 Curva de hidrólise

Anteriormente à determinação da composição monossacarídica das frações estudadas, foram realizadas hidrólises em diferentes tempos para a determinação das condições ideais de hidrólise para o material em estudo.

O melhor tempo de hidrólise para cada fração foi determinado através do perfil cromatográfico, obtido por CLAE, das amostras hidrolisadas em tempos diferentes. Como exemplo, o perfil cromatográfico, obtido por CLAE, das hidrólises da fração EXO nos tempos de 6 horas (FIGURA 2), 8 horas (FIGURA 3), 12 horas

(FIGURA 4) e 18 horas (FIGURA 5), mostra que em todos os tempos de hidrólise realizados não houve a geração de produtos de degradação de hidrólise (furfural e metil furfural), sendo que para esta fração o tempo de 18 horas foi mais eficiente. Este fato pode ser evidenciado nos cromatogramas, uma vez que para hidrólises de 18 horas houve uma menor produção de oligossacarídeos, observados em tempo de retenção abaixo de 9 minutos.

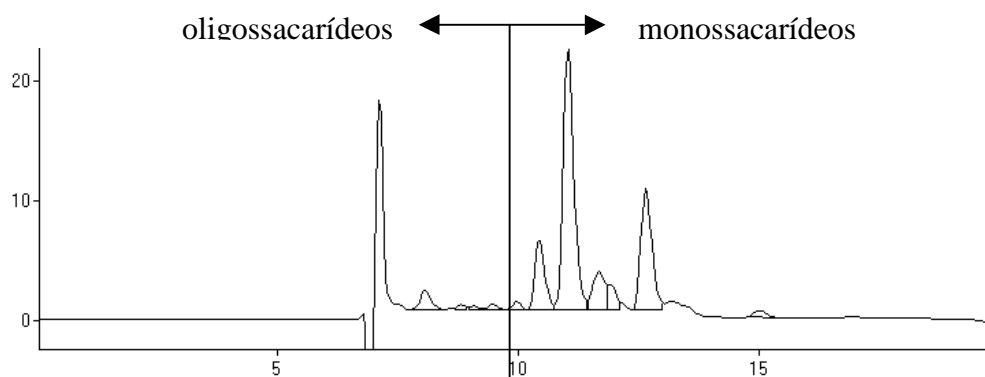


FIGURA 2: Cromatograma obtido por CLAE da fração EXO hidrolisada a 100 °C com TFA 1M por 6 horas.

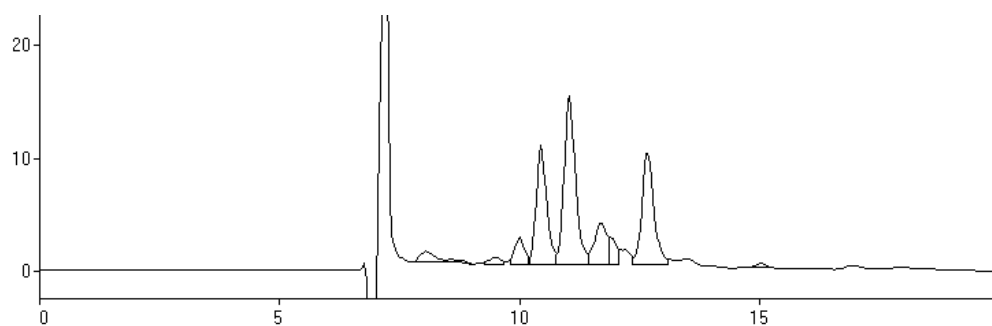


FIGURA 3: Cromatograma obtido por CLAE da fração EXO hidrolisada a 100 °C com TFA 1M por 8 horas.

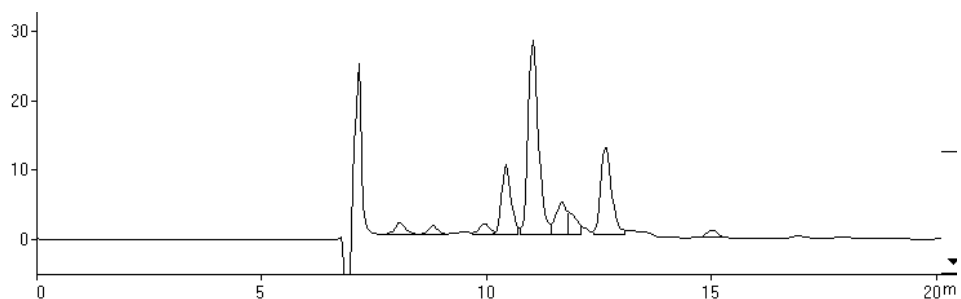


FIGURA 4: Cromatograma obtido por CLAE da fração EXO hidrolisada a 100 °C com TFA 1M por 12 horas .

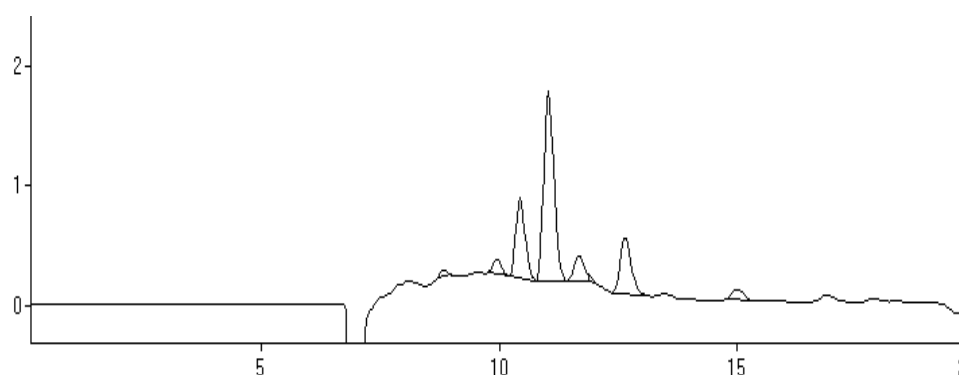


FIGURA 5: Cromatograma obtido por CLAE da fração EXO hidrolisada a 100°C com TFA 1M por 18 horas.

a) Hidrólise ácida total foi realizada em tubos devidamente selados utilizando ácido trifluoroacético (TFA) 1 M em estufa a 100°C. O catalisador dessa reação (TFA) foi removido por evaporação em centrífuga a vácuo até pH 5,6 aproximadamente, as amostras foram divididas em duas alíquotas uma para ser analisada por CLAE e outra submetida ao passo de redução e acetilação descritos a seguir, para análise em CLG e/ou CG-EM .

b) Hidrólise de Saeman foi realizada em tubos devidamente selados utilizando ácido sulfúrico 72% m/m (0,5 mL) em banho de gelo por uma hora, posteriormente a amostra foi diluída para 8% (6,7 ml de água destilada) e aquecida em estufa a 100°C por 5 horas. Após a remoção do ácido sulfúrico por precipitação com carbonato de bário, o hidrolisado foi submetido ao passo de redução e acetilação descrito a seguir, para análise em CLG e/ou CG-EM .

### 3.8.2 Redução e Acetilação dos Produtos de Hidrólise.

Os produtos de hidrólise foram reduzidos com borohidreto de sódio por 12 horas à temperatura ambiente e, em seguida, tratados com resina Lewatit, forma H+, para retirar os íons sódio. Após a filtração, as soluções foram concentradas, a 50° C, até secura. O ácido bórico formado foi eliminado na forma de seu éster volátil, o borato de trimetila, por sucessivas co-destilações com metanol. Os alditóis formados foram então submetidos a acetilação com anidrido acético e piridina (1:1 v/v), durante 24 horas à temperatura ambiente. O processo de acetilação foi interrompido pela adição de gelo e os alditóis acetilados foram extraídos com clorofórmio. A fase clorofórmica foi lavada várias vezes com água destilada e adicionado o sulfato de cobre a 5% para a remoção de piridina, finalmente foi levada a seco, à temperatura ambiente e submetida à análise de CLG e CG - EM.

### 3.8.3 Metilação

O processo de metilação das frações de polissacarídeos foi conduzido de acordo com o método de CIUCANU e KEREK (1984) através da adição alternada de NaOH pulverizado (100 mg) e iodeto de metila (0,3 mL). Foram realizados dois ciclos de metilação. Após as etapas de metilação as frações polissacarídicas foram hidrolisadas por hidrólise de Saeman, reduzidas, acetiladas e analisadas por CLG e/ou CLG-EM, na forma de acetatos de alditóis parcialmente metilados.

## 3.9 ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS

### 3.9.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

As análises de cromatografia líquida de alta eficiência foram realizadas em aparelho SHIMADZU equipado com detector por índice de refração (RID 10A) da marca SHIMADZU. Para a separação dos monossacarídeos foi utilizada uma coluna para ácidos orgânicos (coluna HPX-87H 300x 7,80 mm) (AMINEX® ÍON EXCLUSION-BIO RAD), a uma temperatura de 40°C, sendo utilizado como fase móvel a solução de ácido sulfúrico 8 mM.L<sup>-1</sup> em H<sub>2</sub>O mQ (desgaseificada com gás hélio). Os tempos de

retenção dos monossacarídeos componentes das amostras foram comparados com padrões autênticos. As percentagens relativas dos monossacarídeos componentes das amostras foram calculadas por integração de áreas, sendo feito o ajuste de resposta ao detector para cada monossacarídeo.

### 3.9.2 Cromatografia Líquido-Gasosa

As análises foram realizadas em cromatógrafo HEWLETT PACKARD 5890, com detector de ionização de chama (300° C) e injetor (250° C), utilizando nitrogênio como gás de arraste e coluna capilar de sílica fundida (30m X 0,25 mm d.i.), revestida com DB-225 (0,25  $\mu$  m). As análises cromatográficas para os acetatos de alditóis foram realizadas a 220° C.

### 3.9.3 Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa (CG-EM)

As análises foram realizadas em cromatógrafo a gás VARIAN, modelo 3.300, equipado com coluna capilar de sílica fundida (30m x 0,25 mm d.i.) modelo DB-225 da marca J.W e acoplado a espectrômetro de massa da marca FINNIGIAN MAT, modelo ITD 800. Foi utilizado Hélio como gás de arraste. Os espectros de massa foram obtidos por impacto de elétrons a 70 meV, repetidamente a cada 1/8 de segundo, na faixa de 90 a 550  $m/z$ .

### 3.9.4 Cromatografia de Filtração em Gel (CFG) – Análise de Homogeneidade.

As análises de homogeneidade foram realizadas em cromatógrafo de exclusão estérica de alta pressão (HPSEC) WATERS, equipado com um detector de índice de refração diferencial WATERS modelo 2410 e com detector de espalhamento de luz em multiângulos (MALLS WYATT TECHNOLOGY) modelo DAWN DSP com 18 detectores dispostos ao redor da fotocélula em diferentes ângulos. Foi utilizado o programa ASTRA (WYATT TECHONOLOGY), para analisar os dados obtidos. Para as amostras, foi efetuada uma medida do espalhamento do feixe luminoso em função da concentração do polímero e em função do ângulo.

### 3.9.5 Cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-Sephacel.

As análises foram realizadas em coluna de vidro preenchida com 130 ml de gel DEAE-Sephacel na forma de sal de triletilamônio. Após a montagem, a coluna foi lavada com NaCl 2,0 M (3 vezes o volume total da coluna) e depois com água mQ até o eluato ser negativo para cloretos. Antes da aplicação da amostra, o eluato foi testado quanto à presença de carboidratos, assegurando-se resultado negativo pelo método de fenol-ácido sulfúrico. A amostra foi eluída em gradiente descontínuo de NaCl (0,1M, 0,2 M, 0,5 M, 1,0 M, 1,5 M, 2,0 M). A detecção dos açúcares foi feita pelo método de fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS et al., 1956) entre uma eluição e outra.

Todas as frações obtidas após o fracionamento foram concentradas, dializadas contra água destilada e liofilizadas.

## 3.10 ANÁLISE DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

Os espectros de ressonância magnética nuclear foram obtidos em espectrômetro da marca BRUKER, série Avance, modelo DRX 400, incorporado à Transformada de Fourier. As amostras, solubilizadas em 0,5 ml de água deuterada, foram colocadas em tubos de 5 mm de diâmetro e analisadas à temperatura de 70°C por 12 horas.

### 3.10.1 Técnicas de Ressonância Magnética Nuclear Monodimensionais

#### 3.10.1.1 Ressonância Magnética Nuclear de $^{13}\text{C}$ (RMN $^{13}\text{C}$ )

Os espectros de ressonância magnética nuclear de  $^{13}\text{C}$  foram obtidos na frequência base de 100,16 MHz. Utilizou-se o intervalo de 0,6 segundo entre os pulsos para as aquisições dos sinais, sendo feitas, em média, 50K aquisições. Os deslocamentos químicos foram expressos em ppm utilizando-se como padrão interno à acetona (30,200 ppm).

### 3.10.1.2 Ressonância Magnética Nuclear de $^{13}\text{C}$ DEPT (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer)

Existem diferentes tipos de experimentos de DEPT, os quais diferem quanto ao ângulo de transferência de polarização ( $\theta_z = 45, 90$  ou  $135$ ) para observação de  $^{13}\text{C}$  acoplado a hidrogênio ( $^1\text{H}$ ). Variando-se este ângulo é possível visualizar os carbonos  $\text{CH}$ ,  $\text{CH}_2$  e/ou  $\text{CH}_3$  como sinais negativos em relação à linha de base. É importante mencionar que nos três tipos de DEPT, os sinais dos carbonos quaternários (não ligados diretamente ao H) não aparecem. Assim, os espectros de RMN –  $^{13}\text{C}$  DEPT foram obtidos em um  $\theta_z$  de  $135^\circ$ , onde  $\text{CH}$  e  $\text{CH}_3$  ocorrem em fase positiva em relação à linha de base, enquanto que  $\text{CH}_2$  aparece em fase negativa. A frequência utilizada foi de 100,61 MHz em janela espectral de 220 ppm e resolução de 32 K.

### 3.10.2 Técnicas de Ressonância Magnética Nuclear bidimensionais

#### 3.10.2.1 HMQC (*Heteronuclear Multiple Quantum Correlation Spectroscopy*)

Esta técnica heteronuclear ( $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ ) faz a correlação dos sinais referentes ao núcleo de hidrogênio e ao núcleo de carbono ao qual está ligado aquele hidrogênio. Dessa forma permite determinar quais átomos de hidrogênio ( $^1\text{H}$ ) estão ligados a quais átomos de carbono ( $^{13}\text{C}$ ) a partir de sinais de  $^{13}\text{C}$  conhecidos ou de sinais de  $^1\text{H}$  já determinados por COSY.

## 3.11 DESPROTEINIZAÇÃO

A fração EXO foi submetida a desproteínização através da adição da solução de TCA 20% (1:1 v/v). A solução obtida foi centrifugada e o sobrenadante neutralizado com NaOH 5%, dialisado contra água destilada e liofilizado resultando na fração EXO-DP.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 CULTIVO DA DIATOMÁCEA *Coscinodiscus wailesii*

O meio de cultivo e vários fatores abióticos, como intensidade luminosa, temperatura, fotoperíodo, salinidade, agitação do meio de cultivo, entre outros, influenciam no crescimento e desenvolvimento de microalgas marinhas em culturas (ROITMAN et al., 1991).

Para o cultivo da microalga *C. wailesii* foi realizada uma rigorosa padronização nas condições de cultivo, como fotoperíodo, temperatura, aeração e meio de cultura. Para a obtenção de quantidades suficientes de polissacarídeo para o presente estudo foi necessário a realização de várias culturas da microalga. Assim sendo, a padronização das condições de cultivo foi essencial para se obter uma reprodutibilidade no estado fisiológico das células, assim como no seu crescimento, obtendo-se culturas sempre com o mesmo padrão de desenvolvimento e produção de polissacarídeos.

A água do mar é o meio ideal para o cultivo de microalgas marinhas, porém, apesar de conter cerca de 50 elementos minerais conhecidos e inúmeros compostos orgânicos, é necessário seu enriquecimento com alguns nutrientes para o melhor desenvolvimento das culturas (MCLACHLAN, 1973). Grande parte dos cultivos de microalgas marinha utiliza o meio Guillard- f/2, que é composto por água do mar acrescido de fontes de nitrogênio, fósforo, silicato, vitaminas e metais. No presente trabalho, este meio foi utilizado com sucesso para o cultivo da microalga *C. wailesii*.

Estudos de MYKLESTAD et al. (1972), MYKLESTAD (1977) e MYKLESTAD et al. (1989) com culturas de diatomácea *Chaetoceros affinis* foram sempre realizados sob aeração do meio, assim como ALLAN et al. (1972) também cultivaram as diatomáceas *Skeletonema costatum*, *Cyclotella nana*, *Nitzschia angularis*, *Nitzschia frustulum*, *Cylindrotheca fusiformis*, *Navicula incerta*, *Asterionella socialis* e *Amphiprora paludosa* borbulhando ar nas culturas. Devido a esses relatos, foram realizadas culturas de *C. wailesii* sob aeração e sem aeração sendo que, em culturas aeradas, obteve-se um melhor desenvolvimento das células. A aeração garante que as células não se depositem

nos frascos podendo haver um melhor aproveitamento dos nutrientes do meio pela diatomácea.

Para o sucesso de um bioensaio é necessário que as células estudadas apresentem uma boa condição fisiológica. Uma vez que a microalga em estudo foi retirada do seu habitat natural e submetida a uma condição de estresse (cultivo), foi necessária uma adaptação às condições em laboratório.

Para a adaptação ao cultivo em laboratório, partiu-se de quatro células da microalga *C. wailiesii* que estavam isoladas de outras microalgas. As células foram microcultivadas em placas fechadas, com poços de tamanhos crescentes de diâmetro. Assim que se adaptavam e não mais morriam em um determinado tamanho de poço, eram passadas para a próxima etapa de microcultivo a qual utilizava placas com poços de maior diâmetro. Desta maneira, houve uma adaptação e um aumento do número de células para que assim pudessem ser cultivadas em frascos de maior tamanho.

Apesar de isoladas de outras microalgas, as células não necessariamente estavam isoladas de outros microorganismos, como por exemplo bactérias. Após análise de microscopia óptica utilizando colorações pelo método de Gram, as culturas apresentaram um número considerável de bactérias, sendo portanto, necessário realizar o isolamento da microalga, ou seja, a descontaminação da cultura, uma vez que a presença de bactérias poderia fornecer resultados não verdadeiros em relação aos carboidratos da microalga em estudo.

A primeira estratégia de descontaminação foi o uso de antibióticos, segundo MYKELSTAD (1974) e WANG (1997). Utilizando Penicilina G, Estreptomicina e Kanamicina houve morte das células de *C. wailiesii* após alguns dias de tratamento. Como o uso de antibióticos não foi satisfatório, a descontaminação das culturas foi realizada por uma seqüência de lavagens das células em meio f/2 estéril, o que garantiu uma cultura unialgal com um mínimo de contaminação, certificada por análises microscópicas pela coloração de Gram. Esse método de descontaminação possui como principal vantagem, a não adição de qualquer substância química, como os antibióticos, que poderia influenciar na fisiologia normal da microalga.

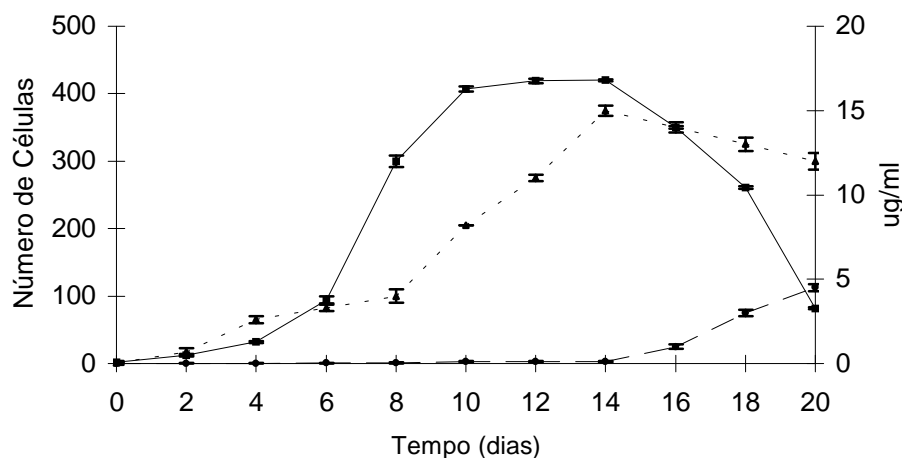
#### 4.2 CURVA DE CRESCIMENTO DA microalga *Coscinodiscus wailesii*

A microalga *C. wailesii* foi cultivada em frascos contendo meio líquido, em um sistema fechado de cultivo, onde nenhum novo nutriente foi adicionado ao sistema e sem a remoção de qualquer produto metabólico.

Nessas condições, há inicialmente um aumento no número de células por um período de tempo, porém, esta multiplicação das células eventualmente cessa, quando os nutrientes são consumidos ou quando os produtos metabólicos se acumulam em quantidades suficientes para que o crescimento seja interrompido (PELCZAR JR et al., 1997).

As várias fases de crescimento em um sistema fechado de cultivo constituem uma curva de crescimento que pode ser dividida em quatro períodos ou fases distintas. O período inicial é chamado de fase *lag*, no qual parece não haver crescimento em termos do aumento do número de células, embora essas estejam metabolicamente ativas (reparando possíveis danos celulares e sintetizando enzimas). A fase *lag* é seguida por um período de rápido crescimento celular, que é chamada de fase exponencial, ou fase *log*. A terceira fase é denominada fase estacionária, onde não ocorre mais um aumento no número de células, que é seguida pela fase de declínio, onde há uma diminuição na população viável até que todas as células morram (PELCZAR JR et al., 1997).

Através de análises de culturas, submetidas nas condições padrões de cultivo já anteriormente descritas, obteve-se a curva de crescimento da microalga *C. wailesii*, a qual foi denominada curva de crescimento Padrão. A FIGURA 6 mostra essa curva, onde a fase exponencial inicia-se no 4<sup>o</sup> e termina no 10<sup>o</sup> dia de cultivo quando a diatomácea inicia a fase estacionária de cultivo. É na fase estacionária, mais especificamente no 14<sup>o</sup> dia, que se observa a maior produção de carboidrato total (15 µg/ml).



**TG= 1,63    umáx= 0,98**

—■— N° células    -●- Proteína    -▲- Açúcar

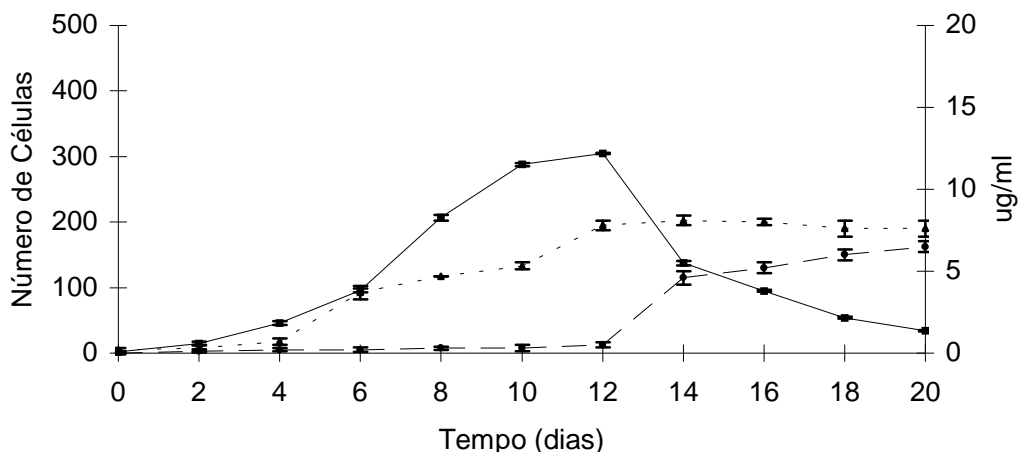
FIGURA 6: Curva de crescimento Padrão da diatomácea *Coscinodiscus wailesii* versus concentração de proteínas e carboidratos em  $\mu\text{g/ml}$  de meio f/2 aerado.

A maior produção de polissacarídeo solúvel no meio pela diatomácea *C. wailesii* na fase estacionária está de acordo com os dados de MYKLESTAD; HAUG (1972), HAUG e MYKLESTAD (1976), para as espécies pertencentes ao gênero *Chaetoceros*: *C. affinis* e *C. curvisetus*, respectivamente. Igualmente, esses dados estão de acordo com os estudos de STAATS et al. (2000) e LOPES (2003) com as diatomáceas *Cylindrotheca closterium* e *Thalassiosira* sp, respectivamente. Desta forma, a curva de crescimento apresentada mostra-se típica para diatomáceas, evidenciando o sucesso das condições de cultivo.

A quantidade de proteína solúvel no meio de cultivo durante os estágios de crescimento da microalga foi insignificante, tendo um pequeno aumento a partir do 16º dia de cultivo, provavelmente, por extravasamento celular recorrente de células mortas quando essas entram na fase de declínio celular. Esses dados sugerem que não ocorreu morte celular nas fases iniciais de crescimento (fase exponencial e estacionária), o que confirma que nessas fases a dosagem de carboidrato total é apenas de polímeros secretados pelas células e não de carboidratos resultantes de extravasamento celular. Este fato é de grande importância uma vez que um dos objetivos deste trabalho é determinar os polissacarídeos secretados por esta microalga e diferencia-los dos carboidratos de reserva e da parede celular. Segundo MYKLESTAD et al. (1972), STAATS et al. (2000) e KNUCKEY et al. (2002) uma limitação na concentração de nitrogênio

no meio de cultura causa um aumento na produção de carboidratos produzidos por diatomáceas. Entretanto MYKLESTAD (1999) afirma que a produção de polissacarídeos não é influenciada pela limitação de nutrientes como nitrogênio e fósforo, contradizendo os dados anteriores.

Na tentativa de obter-se um melhor rendimento na produção de polissacarídeos foi determinada a curva de crescimento Modificada da *C. walesii*, onde as células foram cultivadas em meio f/2 com aeração e uma diminuição de 5 vezes a concentração de nitrogênio, conforme STAATS et al. (2000). Observou-se que sob essa condição, o desenvolvimento celular da microalga *C. walesii* está prejudicado, quando comparado com a condição Padrão de cultivo.



**TG= 2,29    umáx= 0,30**

—■— N° células    —●— Proteína    - - -▲- - Açúcar

FIGURA 7: Curva de crescimento Modificada da diatomácea *C. walesii* versus concentração de carboidrato e proteína em  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de meio f/2 aerado, modificado com diminuição de nitrogênio (5X menos).

Através da análise dos dados apresentados na FIGURA 3, observa-se que o 4º e o 10º dia, correspondem ao início e final da fase exponencial, respectivamente, demonstrando que a diatomácea *C. walesii* nessas condições entra na fase estacionária no 10º dia. Esses dados são semelhantes aos observados para a curva de crescimento Padrão. Todavia, diferentemente da curva de crescimento Padrão, em condições de limitação de Nitrogênio, houve uma rápida e brusca morte celular a partir do 12º dia, onde se observa uma queda

considerável no número de células, coincidindo com um aumento de proteína no meio, devido ao extravasamento protéico pela lise das células.

Para uma melhor comparação na análise do crescimento celular entre as duas curvas de crescimento, foi calculado o Tempo de geração (TG) e  $\mu_{\text{máx}}$ . TG significa o tempo, em dias, que uma célula leva para dobrar em número, e o  $\mu_{\text{máx}}$  significa o quanto, em vezes, uma célula cresce em um dia. Na curva de crescimento Padrão, as células de *C. wailiesii* apresentam um TG de 1,63 e  $\mu_{\text{máx}}$  de 0,98. Já as células sob condições da curva de crescimento Modificada apresentam o TG igual a 2,29 e  $\mu_{\text{máx}}$  de 0,30. Estes dados demonstram que a diatomácea, nas condições da curva de crescimento Padrão, cresce muito mais rapidamente do que nas condições da curva Modificada.

Em relação à produção de carboidratos, as duas condições de cultivo são marcadamente diferentes. Nas condições com limitação de nitrogênio, a curva de crescimento não apresenta um perfil clássico, uma vez que há uma evidente redução na duração da fase estacionária quando comparada à curva de crescimento Padrão. Nesta fase, a máxima produção de carboidrato da curva de crescimento com limitação de nitrogênio, é de 7,8  $\mu\text{g/ml}$ , enquanto nas condições Padrão, a produção de carboidrato é cerca de duas vezes maior, sendo de 15  $\mu\text{g/ml}$  de meio de cultivo. Outrossim, nas condições com menos nitrogênio, a maior concentração de carboidrato que é detectada após o 12º até o 20º dia, certamente não representa somente os carboidratos secretados pela microalga, e sim um “pool” de carboidratos liberados pelas células que entraram na fase de declínio, confirmados pelo aumento na concentração de proteínas do meio, que é indicativo de extravasamento de material citoplasmático. Uma avaliação dos exopolissacarídeos nestas circunstâncias estaria comprometida, uma vez que carboidratos de reserva ou de parede celular poderiam estar contaminando o meio de cultura.

Evidencia-se nesses fatos, a grande importância do estabelecimento da padronização de cultivo e da curva de crescimento no estudo de polissacarídeos de microalgas. A realização dessas padronizações para a diatomácea *C. wailiesii* garante culturas com a mesma reprodutibilidade na produção de polissacarídeos. Além disso, assegura que os polissacarídeos extracelulares sejam secretados por células viáveis, fator importante para não se classificar como exopolissacarídeo o material de lise celular.

Para a microalga *C. walesii* observa-se uma menor produção de carboidrato em meio com limitação de nitrogênio. STAATS et al. (2000) afirmaram que limitações de nitrogênio no meio de cultivo causam um aumento na produção de exopolissacarídeo da diatomácea *Cylindrotheca closterium*, entretanto os autores também afirmaram que o crescimento da microalga não é afetado nessas mesmas condições. Esses dados são marcadamente diferentes dos encontrados para a diatomácea *C. walesii*, uma vez que em meio com limitação de nitrogênio o número de células e o desenvolvimento da microalga, evidenciado pelo TG e  $\mu$ -máx, foram marcadamente diminuídos. Conclui-se então que, para a diatomácea *C. walesii* o cultivo com limitação de nitrogênio afeta o seu desenvolvimento celular.

Por outro lado, se for analisada a produção de carboidrato pelo número de células e não por mililitro de meio de cultivo, a razão entre o número de indivíduos e produção de carboidratos nas duas condições de cultivo testadas, não apresentam diferenças significativas, concordando com os resultados relatados por MYKLESTAD (1999) que afirmou que a produção de polissacarídeos não é influenciada pela limitação de nutrientes.

A partir dos resultados referentes as duas curvas de crescimento, o cultivo da microalga *C.walesii* para extração dos polissacarídeos, foi realizado segundo as condições da curva de crescimento Padrão, ou seja, em meio f/2 aerado sem limitação de fonte de nitrogênio. As culturas foram filtradas entre o 13<sup>o</sup> e o 14<sup>o</sup> dia para a extração de polissacarídeos.

#### 4.3 ANÁLISE DOS ÁCIDOS GRAXOS PRODUZIDOS PELA DIATOMÁCEA *C. walesii*

As microalgas possuem um papel central na base da cadeia alimentar, servindo de fonte alimentar para o zooplâncton (VOLKMAN et al., 1979). A composição bioquímica está intimamente ligada à qualidade nutritiva das microalgas, sendo os lipídeos componentes de fundamental importância (RENAUD et al., 2002). Desta forma, como não existe na literatura dados sobre composição lipídica da microalga *C. walesii*, foi realizada a extração e a caracterização dos ácidos graxos dessa diatomácea.

A FIGURA 8 mostra que, sob as condições de cultivo estabelecidas, a diatomácea *C. walesii*, sintetiza ácidos graxos saturados, não sendo evidenciada a presença de ácidos graxos insaturados. O principal ácido graxo com uma porcentagem de 55% foi o ácido palmítico (C16:0), seguido do ácido mirístico (C14:0) com 33% e do ácido esteárico (C18:0) com 12%. Foram encontrados apenas traços de ácido behênico (C22:0).

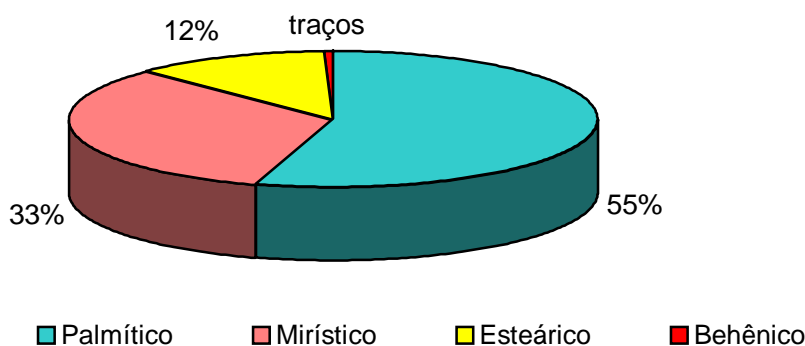


FIGURA 8: Composição de ácidos graxos produzidos pela diatomácea *C. walesii*.

Os dados obtidos para a composição de ácidos graxos da diatomácea *C. walesii*, são semelhantes aos resultados de LOPES (2003), na qual relata a presença de 76,4% de ácido graxo saturado, sendo 52,8% de ácido palmítico e 23,6 de ácido mirístico, em uma diatomácea do gênero *Thalassiosira*.

Em outros estudos com diatomáceas do gênero *Thalassiosira*, observa-se que na espécie *T. pseudonana* há uma baixa concentração dos ácidos graxos saturados (21,5%), enquanto os ácidos graxos insaturados apresentaram uma porcentagem de 21% para os monoinsaturados, e 48% para os polinsaturados. Para a espécie *T. oceanica*, os ácidos graxos saturados representam 42%, 31,4% de monoinsaturado e 22,7% de polinsaturados (VOLKMAN; HALLEGRAEFF, 1988).

Não há na literatura dados referentes à composição lipídica de espécies do gênero *Coscinodiscus*, porém esses resultados sugerem que a grande porcentagem de ácidos graxos saturados em diatomáceas deva exercer um importante papel fisiológico, que pode estar relacionado com a fluidez de membrana dessas microalgas.

#### 4.4 OBTENÇÃO DAS FRAÇÕES POLISSACARÍDICAS DA DIATOMÁCEA *Coscinodiscus wailesii*.

Não há na literatura uma padronização de extração de polissacarídeos em microalgas, existindo, portanto diferentes denominações para cada fração de polissacarídeos produzidos. A maneira de extração, bem como a denominação dada às frações é peculiar de cada grupo de pesquisa nos diversos estudos de polissacarídeos produzidos por diatomáceas.

Entre as várias metodologias de obtenção de frações polissacarídicas, podemos citar como exemplo, a metodologia realizada por BHOSLE et al. (1995 e 1996), nas quais os autores não consideraram o exopolissacarídeo solúvel, mas apenas o exopolissacarídeo ligado à célula como exopolissacarídeos. Nesta técnica, as células cultivadas foram liofilizadas e o exopolissacarídeo foi extraído com 0,005 M EDTA ou 1 M NaOH ou 1,5 M NaCl em temperatura ambiente.

Já em estudos realizados por ALLAN et al. (1972), somente o material solúvel em meio de cultivo é denominado carboidrato extracelular, enquanto o obtido de extração aquosa a quente não é considerado carboidrato extracelular, e sim carboidrato celular.

BROUWER et al. (2002) apresentaram uma metodologia de extração na qual denominaram exopolissacarídeo solúvel (EPS solúvel), o obtido do meio de cultivo e “EPS-ligado” (exopolissacarídeo da cápsula mucilaginosa), o obtido das células após uma extração aquosa por 1 hora a 30°C.

Como esses estudos são as únicas fontes disponíveis sobre polissacarídeos em diatomáceas, serão usados em comparações neste trabalho.

A técnica de extração utilizada para obtenção das frações polissacarídicas da microalga *C. wailesii* foram as padronizadas pelo Laboratório de Cultivo de Microalgas do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFPR. Nessa técnica, são extraídos separadamente os exopolissacarídeos, os polissacarídeos da cápsula mucilaginosa e da parede celular da diatomácea marinha.

As culturas da diatomácea *C. wailesii* que estavam entre o 13º e 14º dia de cultivo foram filtradas e renderam o sobrenadante, o qual foi exaustivamente dialisado por 10 dias. O produto de diálise foi concentrado e liofilizado originando a fração denominada EXO. O resíduo celular foi submetido à extração aquosa (100°C por uma hora), dando origem à fração EAQ, a qual representa os

polissacarídeos da cápsula mucilaginosa, seguida de uma extração alcalina (NaOH 0,5M), que originou as frações EAL-P e EAL-S, respectivamente (FLUXOGRAMA I).

A TABELA 2 mostra o rendimento obtido de cada uma das frações polissacarídicas da microalga *C. walesii*. O baixo rendimento das frações polissacarídicas obtidas nas culturas, mostra a dificuldade de obtenção do material de trabalho, o que pode justificar o número reduzido de trabalhos realizados sobre a caracterização química de polissacarídeos de microalgas.

TABELA 2: Rendimento das Frações EXO, EAQ, EAL-S e EAL-P obtidas de cultura da microalga *C. walesii*.

<b>FRAÇÕES</b>	<b>mg/L de cultura</b>	<b>Total obtido (mg)</b>
EXO	31	1953
EAQ	10	630
EAL-S	1,5	94,5
EAL-P	1	63

#### 4.5 ANÁLISES QUÍMICAS DAS FRAÇÕES POLISSACARÍDICAS OBTIDAS DA DIATOMÁCEA *Coscinodiscus walesii*

##### 4.5.1 Dosagem de açúcar total das frações obtidas da *C. walesii*

A porcentagem de carboidrato total encontrado nas diatomáceas pode variar dentro de um mesmo gênero entre as diferentes espécies (KNUCKEY et al., 2002). A FIGURA 9 mostra as porcentagens de açúcar total obtidas das frações extraídas da cultura de *C. walesii*.

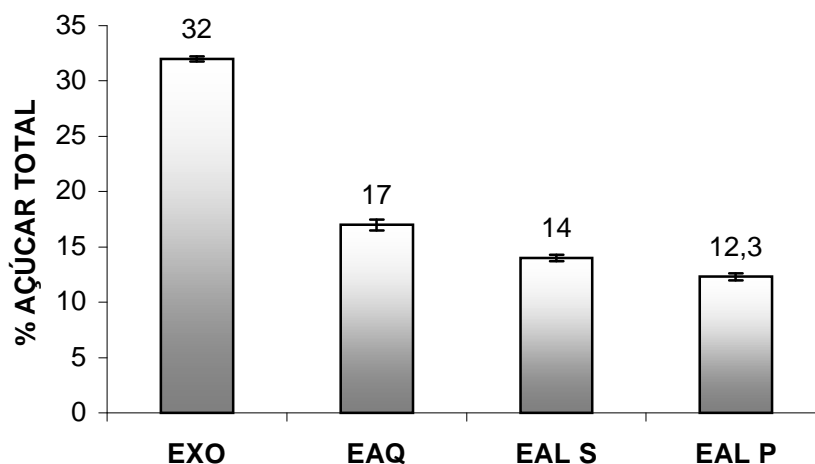


FIGURA 9: Porcentagem (g%) de açúcar total das frações obtidas de cultivos da microalga *C. wailesii*.

A porcentagem média de carboidrato celular total produzida pela microalga *C. wailesii*, somando-se as duas frações correspondentes, EAL-S e EAL-P, foi de 26,3% e a porcentagem de exopolissacarídeo total, somando-se a fração EXO (exopolissacarídeo solúvel) e a fração EAQ (exopolissacarídeo da cápsula mucilaginosa) foi de 49%.

Porcentagens maiores de carboidrato celular foram encontradas em outros gêneros de diatomáceas, entre elas as maiores foram *Chaetoceros decipiens* com 71,5% e *C. debilis* com 68,5%, *Thalassiosira gravida* com 40,2% e *Chaetoceros curvisetus* com 34,0%.(HAUG; MYKLESTAD, 1976).

ALLAN et al. (1972) relataram que a porcentagem de exopolissacarídeos solúveis e de açúcar obtido de extração a quente (cápsula mucilaginosa) em oito espécies diferentes de diatomáceas variaram de 1 a 22% e 2 a 15% respectivamente, sendo, portanto semelhantes para as frações EXO (32%) e EAQ (17%) da diatomácea *C. wailesii*. Para a diatomácea *Amphora coffeaeformis* a fração exopolissacarídica apresentou 41,2% de açúcar total (BHOSLE et al., 1996) e para a *Navicula subinflata* foi 74,6% (BHOSLE et al., 1995), resultados maiores que os observados para *C. wailesii*.

Esses resultados mostram a variação na porcentagem entre as diferentes espécies de diatomáceas, inclusive entre as diferentes frações. Até o momento não há dados para diatomáceas pertencentes ao gênero *Coscinodiscus*.

#### 4.5.2 Dosagem de Proteína das frações obtidas da *C. wailesii*

O conteúdo de proteína isolado de material extracelular em várias diatomáceas planctônicas variaram de 0 a 30%, segundo HOAGLAND et al. (1993). A dosagem do conteúdo protéico da microalga *C. wailesii* foi baixo quando comparado com a porcentagem da maioria das diatomáceas estudadas (FIGURA 10).

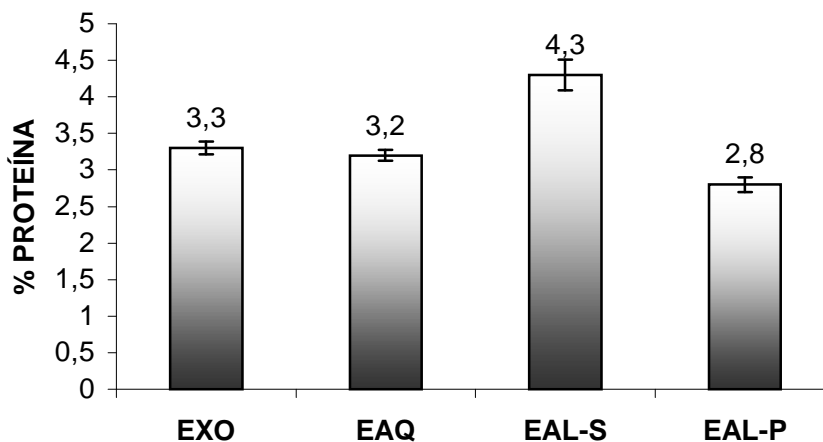


FIGURA 10: Porcentagem (g%) de proteína das frações obtidas de cultivos da microalga *C. wailesii*.

A fração polissacarídica que apresentou maior conteúdo protéico foi a EAL-S com 4,3% e a menor porcentagem protéica foi encontrada para a fração EAL-P com 2,8%. Entretanto, para a diatomácea *C. wailesii* não se observa diferenças significativas no conteúdo protéico entre as frações polissacarídicas

Estudos de HAUG e MYKLESTAD (1976) realizados em várias espécies de diatomáceas, em especial com o gênero *Chaetoceros*, relataram porcentagens de proteína extracelular que variaram de 16,9 a 40,0%. Porém, a porcentagem de proteína presente no exopolissacarídeo de duas diatomáceas estudadas por BHOSLE et al. (1995 e 1996) dos gêneros *Navicula* e *Amphora* foram de 1,95% e 5,92%, respectivamente. Estes são resultados semelhantes aos encontrados para a diatomácea *C. wailesii*. Estes dados demonstram a variabilidade no conteúdo protéico entre as várias espécies de diatomáceas.

#### 4.5.3 Dosagem Colorimétrica de Ácidos Urônicos das frações Polissacarídicas Obtidas da Microalga *C. walesii*

A presença de componentes como ácidos urônicos, piruvato e sulfato indicam a natureza ácida dos exopolissacarídeos de microalgas. Esses têm sido observados em biofilmes produzidos por bactérias e diatomáceas (CORPE, 1970; FLETCHER; FLOODGATE, 1973; READ; COSTERTON, 1987; RODRIGUES; BHOSLE, 1991; BHOSLE et al., 1995 e 1996).

A dosagem colorimétrica de ácidos urônicos revelou que, na diatomácea *C. walesii*, a fração que apresentou maior porcentagem foi a EAQ, correspondente ao polissacarídeo da cápsula mucilaginosa, com 13,4%, seguida da Fração EXO com 11% (FIGURA 11).

Resultados similares para o exopolissacarídeo foram obtidos para as diatomáceas *Navicula subinflata* e *Amphora coffeaformis* que apresentaram uma porcentagem de ácidos urônicos de 8,62 e 16,32% respectivamente (BHOSLE et al., 1995 e 1996).

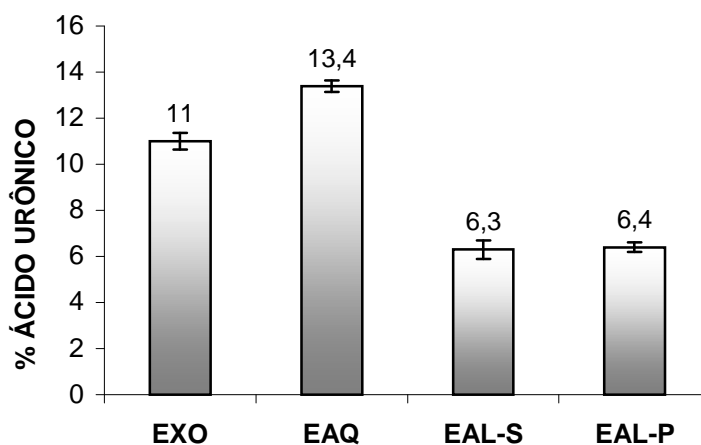


FIGURA 11: Porcentagem (g%) de ácido urônico encontrado nas frações obtidas de cultivo da microalga *C. walesii*.

O conteúdo de ácido urônico no exopolissacarídeo total da *C. walesii*, somando-se a Fração EXO (exopolissacarídeo solúvel) e a Fração EAQ (exopolissacarídeo da cápsula mucilaginosa), foi relativamente alto (24,4%). Portanto, através desse estudo e de outros vários pode-se sugerir que

polissacarídeos ácidos são de ocorrência comum em microalgas conforme relatado por BHOSLE et al. (1995 e 1996).

Tem sido reportado que polissacarídeos extracelulares de microorganismos ricos em ácidos urônicos exibem uma alta capacidade de ligação com metais, o que pode oferecer vantagens às microalgas (MANZINAI et al., 1984).

Através da coloração de Alcian Blue foi possível observar e confirmar a presença de compostos ácidos nas células da microalga *C. wailiesii*. O corante Alcian Blue cora polissacarídeos carboxilados e sulfatados. Quanto maior a intensidade da cor azul, maior a porcentagem de polissacarídeos ácido presentes na microalga. Observa-se na FIGURA 12 a coloração azul na parede celular, referente aos polissacarídeos ácidos, a coloração azul ao redor das células, que representa os exopolissacarídeos ácidos. A intensa coloração da cápsula mucilaginosa confirma a maior porcentagem de ácidos urônicos na fração EAQ.

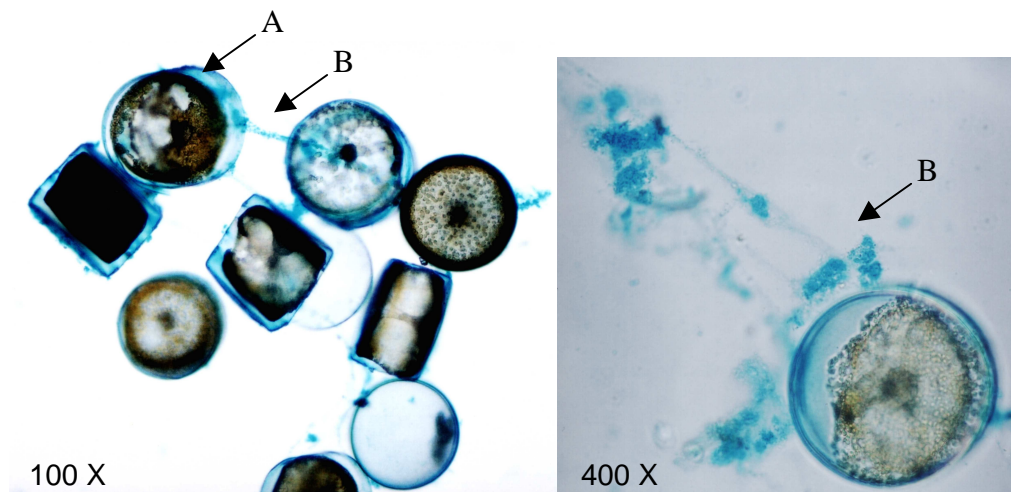


FIGURA 12: Fotomicroscopia da diatomácea *Coscinodiscus wailiesii* após coloração de Alcian Blue.

<sup>A</sup> Polissacarídeo da parede celular; <sup>B</sup> Polissacarídeo extracelular.

#### 4.5.4 Dosagem de Grupos Sulfatos das frações obtidas da microalga *C. wailiesii*

Os polissacarídeos sulfatados são reportados como tendo um papel importante em oferecer flexibilidade e proteção ao dessecação da célula de microalgas, quando são submetidas a condições adversas (DANIEL et al., 1987).

Considerando esta importância, as frações polissacarídicas obtidas da microalga *C. walesii* foram analisadas quanto a sua porcentagem de sulfato.

As frações EAQ e EXO foram as que apresentaram maiores quantidades desses grupamentos, sendo de 22 e 18% respectivamente. Percentagens menores foram encontradas para as frações obtidas após extração alcalina, representando polissacarídeos da parede celular (FIGURA 13).

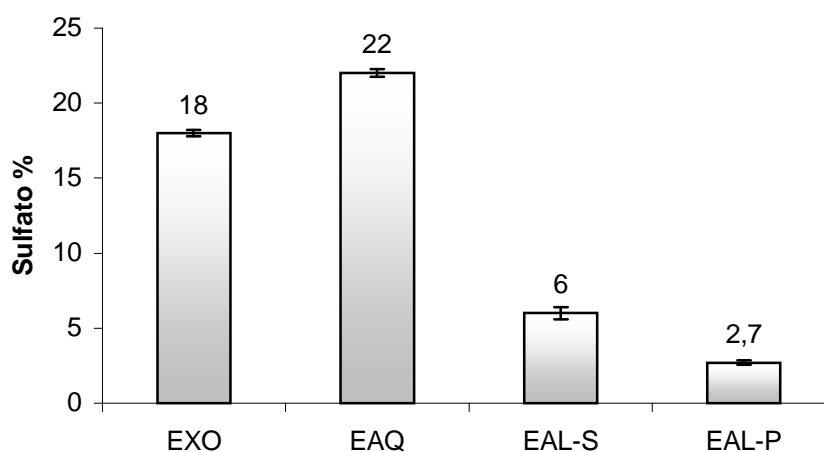


FIGURA 13: Porcentagem (g%) de grupamento sulfato encontrada nas frações polissacarídicas obtidas de culturas da microalga *C. walesii*.

A porcentagem de sulfato encontrada na fração correspondente ao polissacarídeo extracelular da *C. walesii* foi um pouco maior que as encontradas nas diatomáceas *Navicula subinflata* e *Amphora coffeaformis*, 9,57% e 7,94%, respectivamente (BHOSLE et al., 1995 e 1996). Entretanto para a diatomácea *Thalassiosira* sp o conteúdo de sulfato da Fração EXO foi de 68%, muito maior que o encontrado para a *C. walesii*, enquanto a porcentagem da fração correspondente a EAQ, para essa mesma diatomácea, foi de 16% (LOPES, 2003).

Além da presença de ácidos urônicos, as altas porcentagens de grupamentos sulfatos, demonstram a natureza ácida dos exopolissacarídeos produzidos pela diatomácea *C. walesii*, tanto do exopolissacarídeo solúvel quanto do exopolissacarídeo da cápsula mucilaginosa.

#### 4.6 DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES OBTIDAS DA DIATOMÁCEA *Coscinodiscus wailesii*

A composição monossacarídica foi inicialmente determinada por CLAE. A principal vantagem dessa metodologia, além da alta sensibilidade e rapidez nas análises, uma vez que não necessita derivatização dos monossacarídeos, é a determinação direta de ácidos urônicos e açúcares aminados sem que seja necessário submeter a amostra à carboxirredução, fato importante quando se utiliza pouco material de trabalho.

Porém, a coluna de separação cromatográfica (HPX-87H) utilizada na determinação por CLAE, não é capaz de separar os monossacarídeos galactose, manose e xilose (FIGURA 14), que possuem tempos de retenção muito próximos. Portanto, foi utilizada uma combinação desta técnica, com Cromatografia Líquida-Gasosa (CLG), para auxiliar na determinação da composição monossacarídica das frações polissacarídicas obtidas da diatomácea *C. wailesii*.

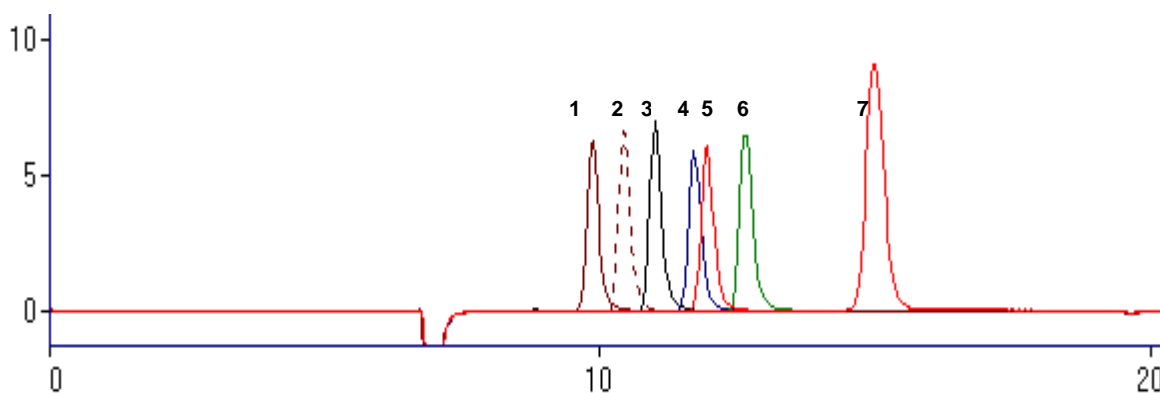


FIGURA 14: Cromatograma obtido por CLAE de padrões de monossacarídeos. 1- ácido galacturônico (TR=9,90 minutos), 2-glucose (TR=10,39 minutos), 3-manose (TR=10,99 minutos); galactose (TR=11,00 minutos) e xilose (TR=11,1 minutos), 4-ramnose (TR=11,63 minutos), 5-arabinose (TR=11,85 minutos), 6-fucose (TR=12,60 minutos) e 7-N-acetil galactosamina (TR=14,98 minutos).

Os resultados da composição monossacarídica por CLAE e CLG de todas as frações estudadas foram muito similares, não havendo diferenças relevantes entre as técnicas. A TABELA 3 mostra a composição monossacarídica das frações brutas obtidas da microalga *C. wailesii*. Cada fração será discutida separadamente.

TABELA 3: Composição Monossacarídica das Frações brutas obtidas da *C. walesii* (mol%).

FRAÇÃO	Glc	Man	Gal	Xyl	Fuc	Rha	Ara	GalA	GalNAc
EXO	22	16	24	TR	20	8	4	4	2
EAQ	14	35	10	3	19	10	-	9	-
EAL-S	15	34	11	-	28	8	-	4	-
EAL-P	13	31	11	2	9	16	-	18	-

- = não detectado

TR = Traços

#### 4.6.1 Composição Monossacarídica do Exopolissacarídeo Obtido da Diatomácea *Coscinodiscus walesii*

Há na literatura uma grande diversidade de dados quanto à composição monossacarídica dos exopolissacarídeos secretados pelas diatomáceas (TABELA 1). Essas podem ser qualitativas, por apresentarem diferenças de dados quanto à composição monossacarídica, ou quantitativas. Isso parece ser devido aos inúmeros materiais e métodos utilizados para obtenção dessa fração, bem como por variabilidade interespecies.

BHOSLE et al., (1995 e 1996) encontraram, no exopolissacarídeo de duas diatomáceas pertencentes aos gêneros *Navicula* e *Amphora*, a glucose como principal monossacarídeo apresentado porcentagens de 79,4 e 93,3% e apenas traços de galactose, manose, xilose, fucose, arabinose e ramnose.

Para o gênero *Chaetoceros* os principais monossacarídeos constituintes do exopolissacarídeo são ramnose, galactose e fucose. A glucose esteve presente em porcentagem relativamente menor. Entretanto, foi observado que dentro do mesmo gênero há uma grande diversidade na composição monossacarídica entre as espécies, como por exemplo, a diatomácea *C. affinis* que apresentou 52% de ramnose, 18% de galactose, 11% de fucose e 6% de manose, enquanto para a espécie *C. decipiens* porcentagens para esses mesmos açúcares foram 25, 7, 4 e 32%, respectivamente (HAUG e MYKLESTAD, 1976).

Os exopolissacarídeos das diatomáceas *Cylindrotheca closterium* e *Nitzschia* sp apresentaram como principal açúcar neutro a galactose (28 e 24%) e um alto teor de açúcares ácidos, principalmente ácido glucurônico (36 e 30%),

seguido de uma porcentagem menor de ácido galacturônico (1 e 2,9%) (BROUWER; STAL et al., 2002).

PERCIVAL et al. (1980) relataram que o polissacarídeo extracelular produzido pela diatomácea *C. waillesii*, apresentou-se rico em sulfato contendo os monossacarídeos fucose (34%), manose (19%), glucose (16%), ramnose (15%), xilose, (6%) ácido glucurônico (9%) e traços de galactose. No entanto, no presente trabalho, o exopolissacarídeo produzido pela diatomácea *C. waillesii*, apresenta uma composição monossacarídica diferente quando comparado à composição monossacarídica de várias outras espécies de diatomáceas, inclusive a da mesma espécie, estudada por PERCIVAL et al. (1980). O exopolissacarídeo da microalga *C. waillesii* é composto por galactose (24%), glucose (22%), fucose (20%), manose (16%), ramnose (8%), arabinose (4%), ácido galacturônico (4%), N-acetil galactosamina (2%) e traços de xilose, conforme resultados da TABELA 3.

As principais diferenças encontradas na composição monossacarídica do exopolissacarídeo da microalga *C. waillesii* obtido nesse trabalho e o realizado por PERCIVAL et al. (1980) são: a porcentagem de galactose, o tipo de ácido urônico e a presença ou não de açúcar aminado,

A galactose é o principal monossacarídeo no presente estudo, sendo encontrado apenas traços no exopolissacarídeo da diatomácea estudada por PERCIVAL et al. (1980), o qual apresentou como monossacarídeo majoritário a fucose. Outra diferença na composição de açúcares entre os dois estudos, é a detecção de arabinose no presente estudo, o qual não havia sido detectado por aquele autor.

Diferente dos trabalhos com outras diatomáceas que apresentaram o ácido glucurônico como principal açúcar ácido, a microalga marinha *C. waillesii* apresentou como único açúcar carboxilado, o ácido galacturônico, ressaltando que a detecção desse foi realizada por CLAE, uma técnica altamente sensível. Essa diferença também é observada nos estudos de PERCIVAL et al. (1980), onde os autores relataram a presença de ácido glucurônico no exopolissacarídeo de *C. waillesii*, sendo que nesse caso, o açúcar ácido foi detectado por eletroforese de papel.

Uma consideração significativa na composição monossacarídica do exopolissacarídeo da microalga *C. waillesii*, é a presença de N-acetil

galactosamina, sendo que essa é a primeira vez que se relata a presença de açúcar aminado em polissacarídeos de diatomáceas.

A composição monossacarídica do exopolissacarídeo secretado pela microalga *C. wailesii* estudada nesse trabalho mostra grandes diferenças quando comparado com o exopolissacarídeo da mesma espécie estudada por PERCIVAL et al. (1980). Na realização do presente estudo foi padronizada a condição de cultivo, bem como, foi realizada a curva de crescimento da microalga. Portanto, o estado das células durante o cultivo é conhecido. Uma vez que as frações foram obtidas de culturas que estavam no 14<sup>o</sup> dia de cultivo, pode-se assegurar que a composição monossacarídica determinada para a fração EXO representa os polissacarídeos secretados pela diatomácea. Entretanto, como não houve a mesma padronização nos estudos realizados por PERCIVAL et al. (1980), a probabilidade, da composição monossacarídica encontrada para o exopolissacarídeo estudado por esses autores ser a soma do exopolissacarídeos mais os carboidratos intracelulares e de reserva derivado de células rompidas, é muito grande. Sendo assim, justifica-se a importância do estabelecimento da curva de crescimento no estudo de exopolímeros produzidos pela microalga *C. wailesii*.

#### 4.6.2 Composição Monossacarídica do polissacarídeo da Cápsula Mucilaginosa Obtido da Diatomácea *Coscinodiscus wailesii*

Não é certo se a composição do polissacarídeo da cápsula mucilaginosa é diferente ou não da composição do exopolissacarídeo solúvel no meio de cultura, existindo na literatura uma controvérsia entre vários pesquisadores. MYKLESTAD et al. (1972) estudaram os polissacarídeos dissolvidos no meio de cultura produzidos por diatomáceas, principalmente do gênero *Chaetoceros*, e observaram que estes eram diferentes daqueles constituintes da cápsula mucilaginosa, descartando a possibilidade de que esses polissacarídeos encontrados no meio eram provenientes da morte ou degradação celular durante a fase estacionária do cultivo.

Experimentos conduzidos com as diatomáceas *Cylindrotheca closterium* e *Nitzschia* sp mostraram que há uma diferença na composição e na dinâmica de

produção entre o exopolissacarídeo solúvel (EPS-solúvel) e o da cápsula mucilaginosa (EPS-ligado). Os autores afirmam que essas diferenças na composição, localização e produção dos polissacarídeos sugerem fortemente que o EPS-solúvel e EPS-ligado servem para diferentes propósitos e que, provavelmente, possuem um controle metabólico diferente (BROUWER; STAL, 2002).

Segundo STAATS et al. (2000), a diatomácea marinha *Navicula salinarum* também produziu uma substância extracelular que é diferenciada em duas frações sendo uma delas secretada no meio e a outra acumulada ao redor da célula. Estas duas frações apresentaram composições monossacarídicas diferentes sendo, portanto, polímeros diversos.

Entretanto, RAMUS (1972) relatou que o exopolissacarídeo deve ser qualitativamente igual aos polissacarídeos da cápsula mucilaginosa, e que a produção da cápsula dependerá da relação entre a taxa de secreção e da taxa de solubilização. Se esta última for menor que a primeira, a cápsula será formada e poderá ser visualizada. Caso contrário, se a taxa de secreção for menor que a de solubilização, a cápsula não se formará e os polissacarídeos estarão dissolvidos no meio de cultura.

O exopolissacarídeo da cápsula mucilaginosa produzido pela diatomácea *C. wailesii* é composto por 35% de manose, 19% de fucose, 14% de glucose, 10% de galactose, 10% de ramnose, 9% de ácido galacturônico, não apresentando arabinose. Essa composição é quantitativamente e qualitativamente diferente da encontrada para o exopolissacarídeo que é constituído de 24% de galactose, 22% de glucose, 20% de fucose, 16% de manose e apresentando 4% de arabinose e 2% de açúcar aminado. A partir desses dados, para a diatomácea *C. wailesii* a idéia defendida por MYKLESTAD et al. (1972) e STAATS et al. (2000) parece ser a mais adequada do que a de RAMUS (1972).

#### 4.6.3 Composição Monossacarídica do Polissacarídeo da Parede Celular Obtido da Diatomácea *Coscinodiscus wailesii*

As frações EAL-S e EAL-P obtidas através de extração alcalina fazem parte da parede celular das microalgas (LOPES, 2003). Para a microalga *C.*

*walesii* a composição monossacarídica das frações correspondentes à parede celular são constituídas principalmente por manose, sendo a porcentagem na EAL-P 31% e na EAL-S 34%. HECKY et al. (1973) relataram resultados similares na composição monossacarídica para as espécies de diatomáceas *Cyclotella cryptica*, *Nitzschia brevirostris* e *Melosira nummuloides*, onde os principais monossacarídeos constituintes da parede celular foram manose, fucose, glucose e galactose

As principais diferenças entre as duas frações foi a porcentagem de fucose, maior na EAL-S (28%) do que na fração EAL-P (9%); a presença de xilose (2%) na fração EAL-P, e a ausência desse mesmo monossacarídeo na fração EAL-S e a porcentagem de ácido galacturônico. A fração EAL-P possui um caráter mais ácido (18%) do que a fração EAL-S (4%). As diferenças observadas na porcentagem de ácido galacturônico, entre as duas frações correspondentes à parede celular da microalga *C. walesii*, mostram que o processo de precipitação com ácido acético separou polímeros com diferentes porcentagens de ácidos urônicos.

#### 4.7 PURIFICAÇÃO DA FRAÇÃO EXO

##### 4.7.1 Desproteínização da Fração EXO - Análise Química e Determinação da Composição Monossacarídica da Fração EXO-DP.

Devido ao maior rendimento e ao maior teor de açúcar total, a fração EXO foi escolhida para o estudo da estrutura química de seus polímeros. Essa fração foi submetida à análise de RMN-<sup>13</sup>C sem o sucesso esperado, não sendo possível obter um espectro de qualidade. Na tentativa de eliminar interferentes, o primeiro passo de purificação foi a desproteínização da amostra. A fração obtida após essa desproteínização recebeu o nome de Fração EXO-DP.

Após a desproteínização, a amostra apresentou uma diminuição considerável em sua massa, havendo uma perda de material de aproximadamente 50% em relação à fração original. Entretanto, na fração EXO-DP observa-se um aumento na quantidade de açúcar total e de ácido urônico e um decréscimo na porcentagem de proteína e sulfato em relação à fração EXO.

A FIGURA 15 mostra as porcentagens de açúcar total, proteína, ácido urônico e sulfato presentes nessa fração, comparando-as com a Fração EXO a qual lhe deu origem.

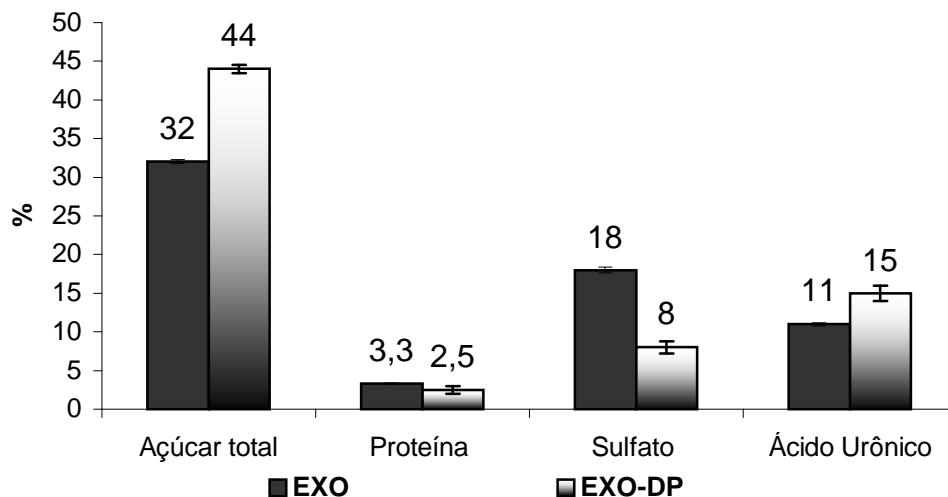


FIGURA 15: Porcentagem (g %) de açúcar total, proteína, sulfato e ácido urônico presente na fração EXO e EXO-DP.

Apesar do processo realizado ser uma desproteíntização, o decréscimo na porcentagem de proteína na amostra EXO-DP não foi significativo, porém o aumento na quantidade de açúcar total foi evidente. Uma explicação plausível para esse fato, pode ser que após o processo de desproteíntização com ácido tricloroacético 20% (TCA), por mudança de pH e/ou pela realização de nova diálise, tenha ocorrido perda de sal que ainda estava presente na amostra EXO bruta. Esse fato justificaria a pequena diminuição de proteína após a desproteíntização, a diminuição de sulfato e o aumento considerável de açúcar total e ácido urônico da fração EXO-DP, além da diminuição expressiva na quantidade de material. Outra consideração importante é que somente após a desproteíntização da amostra foi possível obter espectros de RMN-<sup>13</sup>C de qualidade.

Por apresentar maior porcentagem de açúcar total e menor porcentagem de proteína, a fração EXO-DP, foi submetida a passos de purificação adicionais. Primeiramente, foi determinada a composição monossacarídica da fração EXO-DP. Os dados mostram que não há uma mudança significativa na composição monossacarídica da fração EXO após a desproteíntização (TABELA 4).

TABELA 4 Composição monossacarídica da fração EXO bruta e EXO-DP (mol%).

<b>FRAÇÃO</b>	<b>Glc</b>	<b>Man</b>	<b>Gal</b>	<b>Xyl</b>	<b>Fuc</b>	<b>Rha</b>	<b>Ara</b>	<b>GalA</b>	<b>GalNAc</b>
<b>EXO</b>	22	16	24	TR	20	8	4	4	2
<b>EXO DP</b>	20	18	29	1	16	7	3	4	2

TR= traços

Após o processo de desproteíntização da fração EXO, os principais monossacarídeos continuam sendo galactose, glucose, fucose e manose. As porcentagens dos demais monossacarídeos também foram semelhantes nas duas frações.

A fração EXO-DP foi submetida à análise de RMN-<sup>13</sup>C (FIGURA 16). O resultado desta análise mostrou um espectro de RMN-<sup>13</sup>C altamente complexo, com muitos sinais na região de açúcares (110-50 ppm). Evidencia-se uma grande variedade de sinais na região referente aos carbonos anoméricos, com uma predominância de três principais sinais (103,5, 100,7 e 100,0 ppm). Ainda, nas regiões extremas (campo mais baixo e campo mais alto) podem ser observados alguns sinais característicos tais como: a presença do sinal em 174 ppm referente a carbono carboxílico; sinais em 16,6 e 15,4 ppm que sugerem a presença de grupamentos metil de deoxi-açúcares e o sinal em 22,1 ppm sinal atribuído a metil ligado a carbono carboxílico.

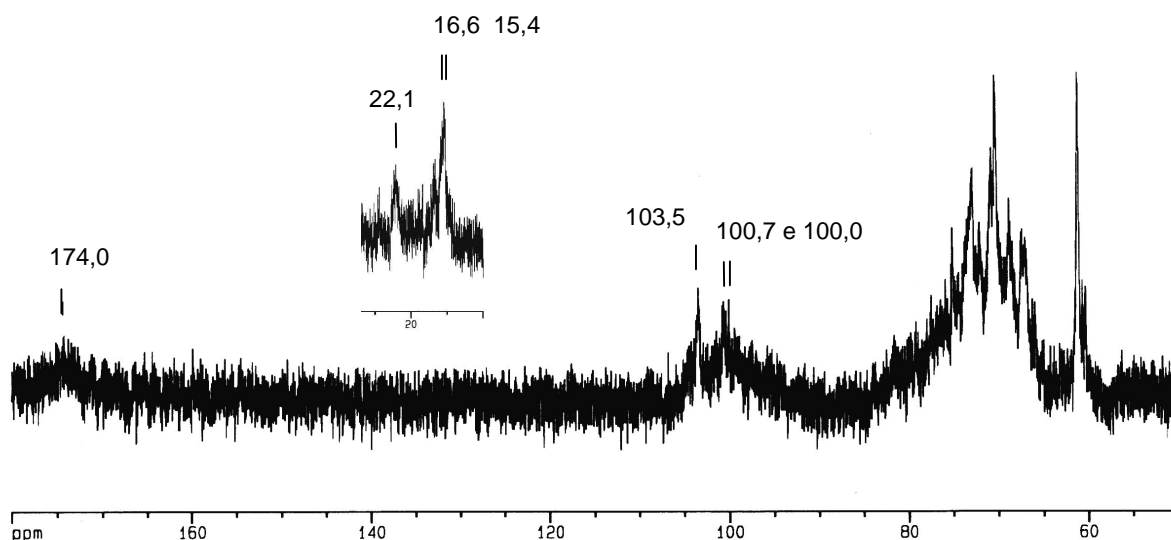


FIGURA 16: Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  da fração EXO-DP obtido da diatomácea *C. wailiesii*. Deslocamentos químicos em ( $\delta$ ) ppm. Calibração interna acetona (30,2 ppm).

#### 4.7.2 Fracionamento da Fração EXO-DP por Cromatografia de Troca-Iônica – DEAE-Sephacel.

Devido à complexidade do espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  obtido para a fração EXO-DP, esta foi submetida a uma cromatografia de troca-iônica na tentativa de isolar os possíveis polímeros presentes.

Após ser solubilizada em água, a amostra foi aplicada em coluna de troca iônica DEAE-Sephacel e eluída com gradiente descontínuo de NaCl. Desta forma, foram obtidas 7 frações denominadas: EXO-DP A (eluída com água  $\text{H}_2\text{O}$  mQ), EXO-DP 0,1 (eluída com 0,1M NaCl), EXO-DP 0,2 (eluída com 0,2M NaCl), EXO-DP 0,5 (eluída com 0,5M NaCl) EXO-DP 1,0 (eluída com 1,0M NaCl), EXO-DP 1,5 (eluída com 1,5M NaCl) e EXO-DP 2,0 (eluída com 2,0M NaCl).

A TABELA 5 mostra a composição monossacarídica das sete frações obtidas após o fracionamento da amostra EXO-DP em coluna de troca-iônica.

TABELA 5: Composição monossacarídica (mol%) e análise de sulfato (NaSO<sub>3</sub>%) das frações obtidas pelo fracionamento da amostra EXO-DP em coluna DEAE-Sephacel.

FRAÇÕES EXOdp	Glc	Gal	Man	Xyl	Fuc	Rha	Ara	GalA	GalNAc	Sulfato
<b>A</b>	10	15	18	4	12	6	35	-	-	NR
<b>0,1</b>	12	64	4	3	2	6	8	-	-	3,3
<b>0,2</b>	14	46	2	TR	4	15	10	7	3	1,4
<b>0,5</b>	22	8	22	2	27	13	-	5	-	6,5
<b>1,0</b>	8	8	30	TR	41	10	-	2	-	12,7
<b>1,5</b>	18	12	21	TR	33	7	TR	7	-	NR
<b>2,0</b>	42	13	13	TR	17	9	-	4		NR

TR = traços

NR = não realizado (material insuficiente)

- = não detectado

Todas as frações obtidas por fracionamento em coluna de troca-iônica mostraram diferenças nas suas composições monossacarídicas. As principais foram:

A fração EXOdp-A apresentou como principal monossacarídeo a arabinose, não apresentando ácido urônico na sua composição. Enquanto, as frações EXOdp-0,1 e EXOdp-0,2 são constituídas principalmente por galactose, porém essa última, apresentou uma porcentagem maior de ramnose, além da presença de ácido galacturônico e N-acetil galactosamina, ausentes na fração EXOdp-0,1;

A fração EXOdp-0,5 apresentou porcentagens equivalentes de fucose, manose, glucose e ausência de arabinose. Já as frações EXOdp-1,0 e EXOdp-1,5 apresentaram como monossacarídeos principais fucose e manose, entretanto essa última apresentou maior porcentagem de glucose. Entre todas as frações a EXOdp-0,5 foi a que apresentou a maior porcentagem de glucose.

As frações EXOdp-0,1, EXOdp-0,2 e EXOdp-1,0, que apresentaram maior rendimento e solubilidade em água, foram escolhidas para estudo da estrutura química de seus polissacarídeos.

Inicialmente, foi realizada dosagem de sulfato das frações (TABELA 5). Segundo esses dados, podemos sugerir que o processo de separação da amostra EXO-DP em cromatografia de troca-iônica com gradiente descontínuo de

NaCl, pode ter ocorrido principalmente em função do grau de sulfatação das subfrações, uma vez que a porcentagem de sulfato nas amostras foi maior e proporcional ao aumento da força iônica da fase móvel aplicada no processo cromatográfico.

Com a finalidade de se avaliar a homogeneidade das amostras obtidas no fracionamento por cromatografia por troca-iônica, as frações EXOdp-0,1, EXOdp-0,2 e EXOdp-1,0 foram submetidas à cromatografia de exclusão estérica acoplada a detectores de espalhamento de luz e de índice de refração. Segundo os dados obtidos dos perfis cromatográficos, nenhuma fração apresentou-se homogênea. Portanto, é necessário que essas frações sejam submetidas a passos adicionais de purificação como, por exemplo, uma cromatografia de exclusão, uma vez que a obtenção de polímeros homogêneos é importante para se propor uma estrutura química fina definida.

Entretanto, segundo as informações obtidas pela composição monossacarídica é possível sugerir diferenças existentes entre as frações EXOdp-0,1 e EXOdp-1,0. A fração eluída em menor força iônica, fração EXOdp-0,1, apresenta maior porcentagem relativa de galactose e, concomitantemente, menor porcentagem relativa de fucose e manose; enquanto que a fração eluída em maior força iônica, fração EXOdp-1,0, apresenta maior porcentagem relativa de fucose e manose (TABELA 5).

Portanto, apesar do perfil heterogêneo das amostras, esses dados sugerem que o aumento na concentração de NaCl, utilizado no fracionamento da cromatografia, foi eficiente na separação dos principais polímeros: A fração Exodp-0,1 é composta principalmente por um polissacarídeo de galactose e a fração EXOdp-1,0 é composta principalmente por um polissacarídeo sulfatado constituído de fucose e manose ou dois polímeros distintos, sendo uma fucana e uma manana.

#### 4.7.2.1 Análise Química Parcial da Fração EXOdp-0,1

A fração EXOdp-0,1 apresentou perfil heterogêneo apesar da composição monossacarídica possuir uma predominância de galactose. Análise de RMN-<sup>13</sup>C dessa fração mostra um espectro melhor definido que o espectro da fração EXO-DP, contudo ainda é observada uma grande variedade de sinais (FIGURA 17).

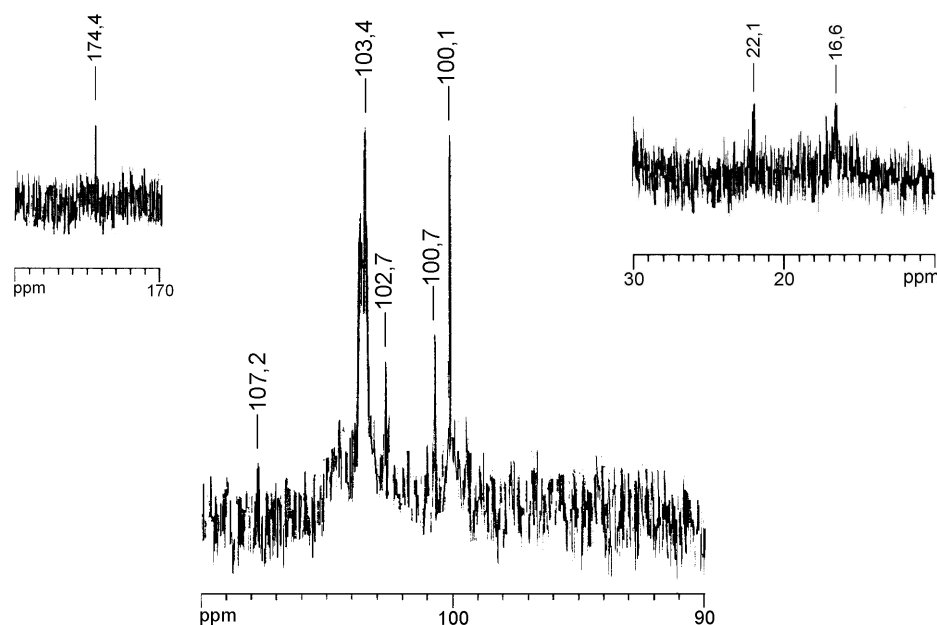


FIGURA 17: Espectro de RMN-<sup>13</sup>C da fração EXOp-0,1. Deslocamentos químicos em (δ) ppm. Calibração interna acetona (30,2 ppm).

Os assinalamentos mais intensos 103,4 e 100,1 ppm encontrado na região anomérica no espectro de RMN-<sup>13</sup>C, são sugestivos do C-1 da unidade de β-D-galactopiranosose e do C-1 de unidade de α-L-galactopiranosose, respectivamente. (GORIN; MAZUREK, 1975, SIERAKOWSKI et al., 1987, MENESTRINA et al., 1998, DELGOBO et al., 1999, DUARTE et al., 2002, ZIBETTI, 2001, FRANSEN et al., 2000).

O assinalamento em 102,7 ppm do espectro de RMN-<sup>13</sup>C pode ser atribuído a unidades de β-glucose (STORSETH et al., 2004, CARBONERO, 2001, REIS et al., 2002, ALQUINI et al., 2003), e o sinal anomérico em 100,7 ppm sugere unidades de glucose com anomericidade alfa (GORIN, 1988, IACOMINI, 1990). O sinal em 61,2 ppm corresponde ao C-6 livre das unidades monossacarídicas, foram confirmados como sendo carbonos primários pela inversão do sinal em experimentos de DEPT-135 (dados não mostrados) (IACOMINI et al., 1987 e PRADO et al., 1999).

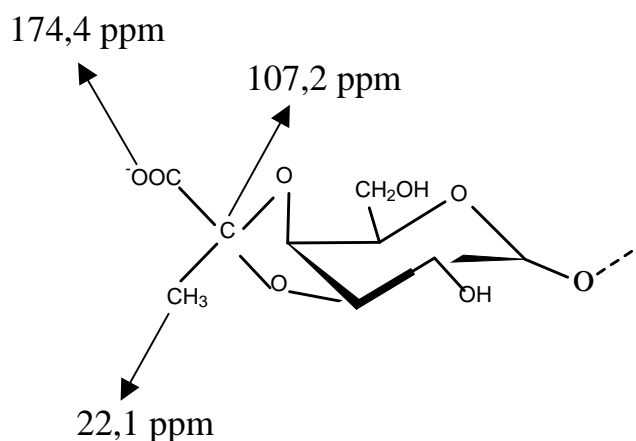
A heterogeneidade e a maior intensidade dos sinais no espectro de RMN- $^{13}\text{C}$ , referentes à galactose, quando comparados aos da glucose, sugerem uma mistura de dois principais polímeros, uma galactana em maior concentração e uma glucana em menor concentração, entretanto somente com a purificação dessa fração é possível elucidar a presença de um ou mais polímeros nessa fração.

A possível galactana, pode ser formada de unidades de  $\beta$ -D-Gal 3-O substituída a unidades de  $\alpha$ -L-Gal 4-O substituída, onde os sinais atribuídos ao C-1 são 103,5 e 100,2 ppm, respectivamente (DUARTE et al., 2002, MILLER et al., 1996 e ZIBETTI, 2001). Sinal atribuído ao C-1 de a  $\beta$ -D-Gal sofre um deslocamento para campos mais baixo do espectro, em torno de 104,8 ppm, se estiver ligada a unidades de  $\alpha$ -D-Gal (96,1 ppm) (MILLER et al., 1996).

A presença de  $-\text{CH}_3$  da ramnose é demonstrada com o sinal em 16,6 ppm (GORIN; MAZUREK, 1975). A ausência de ácido urônico na fração EXOdp-0,1 e a presença de sinais em 174,4 ppm e 22,1 ppm sugerem a presença de ácido pirúvico e/ou acetil na fração EXO-dp 0,1.

Os sinais em 23,7 e 175,2 ppm, referentes ao grupo metil ( $-\text{CH}_3$ ) e ao grupo carbonila ( $-\text{C}=\text{O}$ ), de acetal de ácido pirúvico, respectivamente, são referentes a unidades  $\beta$ -galactose piruvatadas em C-3 e C-4 (RAVENS-CROFT et al., 1994, GAREGG; LINDBERG, 1979 e CHIOVITTI et al., 1997).

O sinal em 107.2 ppm (no espectro da fração EXOdp-0,1), pode sugerir substituição por acetal de ácido pirúvico esterificando os carbonos 3 e 4 de unidades de galactose. Segundo RAVENS-CROFT et al. (1994), quando o ácido pirúvico está ligado ao C-3 e C-4 (FIGURA 18), o anel formado nessa estrutura assemelha-se a um anel furanosídico, fazendo com que o sinal referente ao C-2 do acetal pirúvico sofra um deslocamento para campo mais baixo no espectro (107,23 ppm). Todavia, segundo GORIN et al. (1982), o tempo de relaxamento ( $T_1$ ) do carbono acetálico pode impedir sua detecção por espectroscopia de RMN- $^{13}\text{C}$ , mesmo quando este substituinte está presente em uma quantidade significativa, o que então, não descarta a possibilidade do sinal ser também resultante da presença de unidades furanosídicas de arabinose, uma vez que este monossacarídeo está presente na amostra (MENESTRINA et al., 1998, DELGOBO et al., 1998, DONG; FANG, 2001, FRANSEN et al., 2000).



### 3,4-O-(1-CARBOXIETILIDENO)-GALACTOSE

FIGURA 18: Estrutura apresentada pelo grupo acetal e ácido pirúvico esterificando uma unidade de galactose e seus respectivos deslocamentos químicos por RMN de  $^{13}\text{C}$ .

Não há na literatura relatos da presença de ácido pirúvico em polissacarídeos de diatomáceas. O ácido pirúvico ligado como acetal cíclico a uma unidade glicosil, é comum em polissacarídeos extracelulares de bactérias. Frequentemente se encontra ligado ao carbono-4 e carbono-6 de unidades de D-glucopirranose, D-manopirranose ou D-galactopirranose. Estas unidades podem ser terminais ou estarem no meio da cadeia (GAREGG et al., 1980). O acetal de ácido pirúvico tem sido também encontrado em polissacarídeos de origem animal, bem como em polissacarídeos de algas vermelhas (GORIN et al., 1982, CHIOVITTI et al., 1997, CHIOVITTI et al., 1998 e NOSEDA et al., 2000).

#### 4.7.2.2 Análise Química Parcial da Fração EXOdp-0,2

A fração EXOdp-0,2 não se apresentou homogênea quando submetida à cromatografia de gel filtração. Em composição é constituída principalmente de galactose, ramnose, glucose e arabinose. Possui ainda na sua composição, ácido galacturônico, N-acetil galactosamina e pequena porcentagem de sulfato. A composição monossacarídica e o espectro de RNM- $^{13}\text{C}$  dessa amostra mostram um perfil diferente da fração anterior (FIGURA 19).

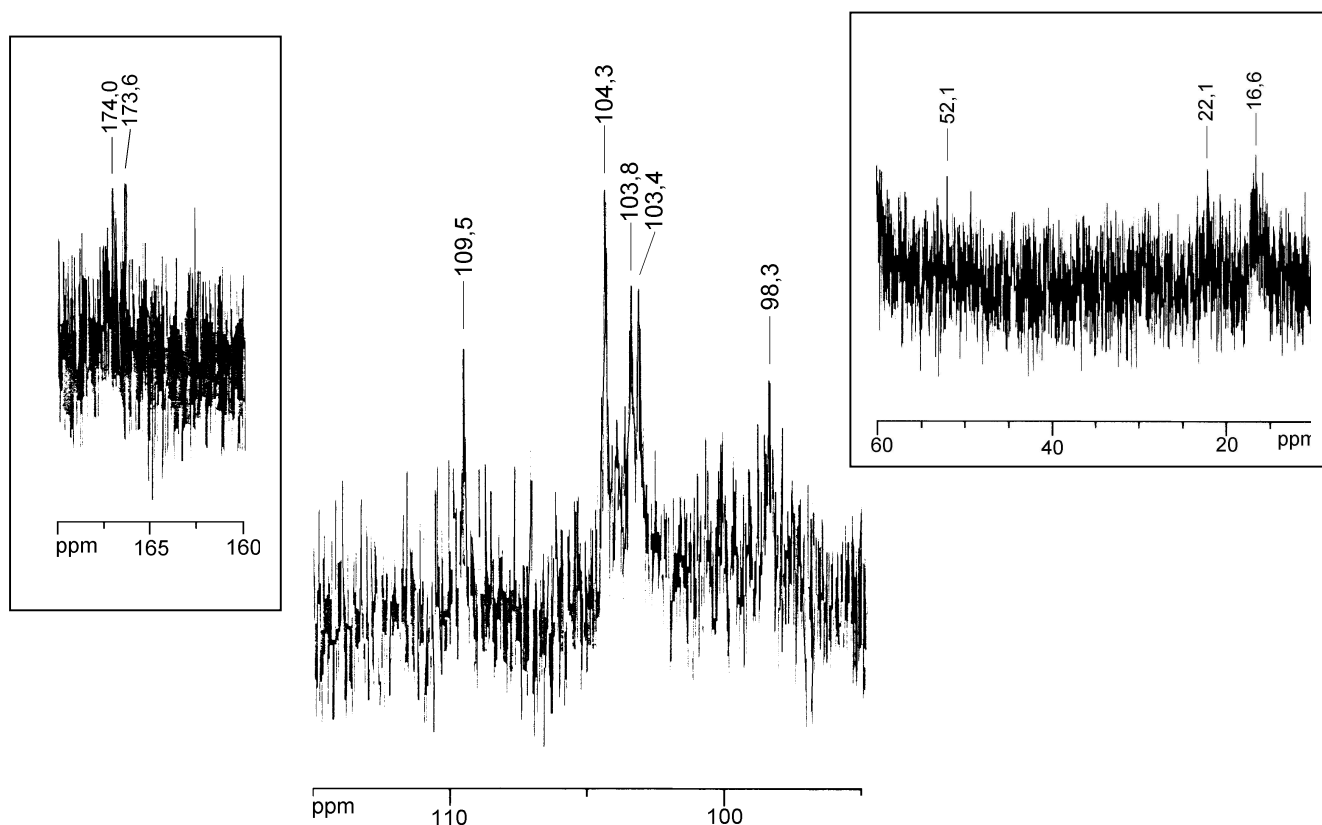


FIGURA 19: Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  da fração EXODP-0,2. Deslocamentos químicos em ( $\delta$ ) ppm. Calibração interna acetona (30,2 ppm).

Na região anomérica os sinais em 104,3 e 103,8 podem ser atribuídos a unidades de  $\beta$ -D-galactopirranose devido a maior porcentagem de galactose na amostra (GORIN e MAZUREK, 1975, MENESTRINA et al., 1998, PINTO et al., 1998, DELGOBO et al., 1999, FRANSEN et al., 2000, DUARTE et al., 2002, ZIBETTI, 2001).

Deslocamentos químicos para campos mais baixos para arabinose indicam sua forma furanosídica e configuração  $\alpha$ . O sinal em 109,5 ppm presente na fração EXO 0,2 é sugestivo do C-1 de unidades terminais não redutores de  $\alpha$ -arabinofuranose (DELGOBO et al., 1998, MENESTRINA et al., 1998, DONG; FANG, 2001, FRANSEN et al., 2000, TISCHER et al., 2002).

Na região do espectro de campo mais alto, observa-se a presença do sinal em 16,6 ppm sugestivo de grupamento metil da ramnose (GORIN; MAZUREK, 1975). O sinal em 98,3 ppm pode ser sugestivo ao C-1 das unidades de  $\alpha$ -ácidos urônicos (RENARD et al., 1998). A presença de sinais na região de campo mais baixo do espectro (174,0 a 173,6 ppm) é atribuído ao C-6 de carboxila, devido a

presença de ácido galacturônico (GORIN; MAZUREK, 1975) e a N-acetil galactosamina (LESLEY et al., 1999). Assim como, sinais em 22,1 e 52,1 ppm sugerem sinais do metil ligado ao carbono carboxílico e do C-2 ligado a nitrogênio do N-acetil galactosamina (LESLEY et al., 1999).

#### 4.7.2.3 Análise Química Parcial da Fração EXOdp-1,0

A fração EXOdp-1,0 não se apresentou homogênea quando submetida à cromatografia de gel filtração. Sua composição monossacarídica foi marcadamente diferente das outras frações discutidas acima, sendo uma fração sulfatada, constituída principalmente por fucose e manose. Mudanças nos assinalamentos no espectro de RMN-<sup>13</sup>C dessa fração, em relação às demais frações, também são observadas (FIGURA 20).

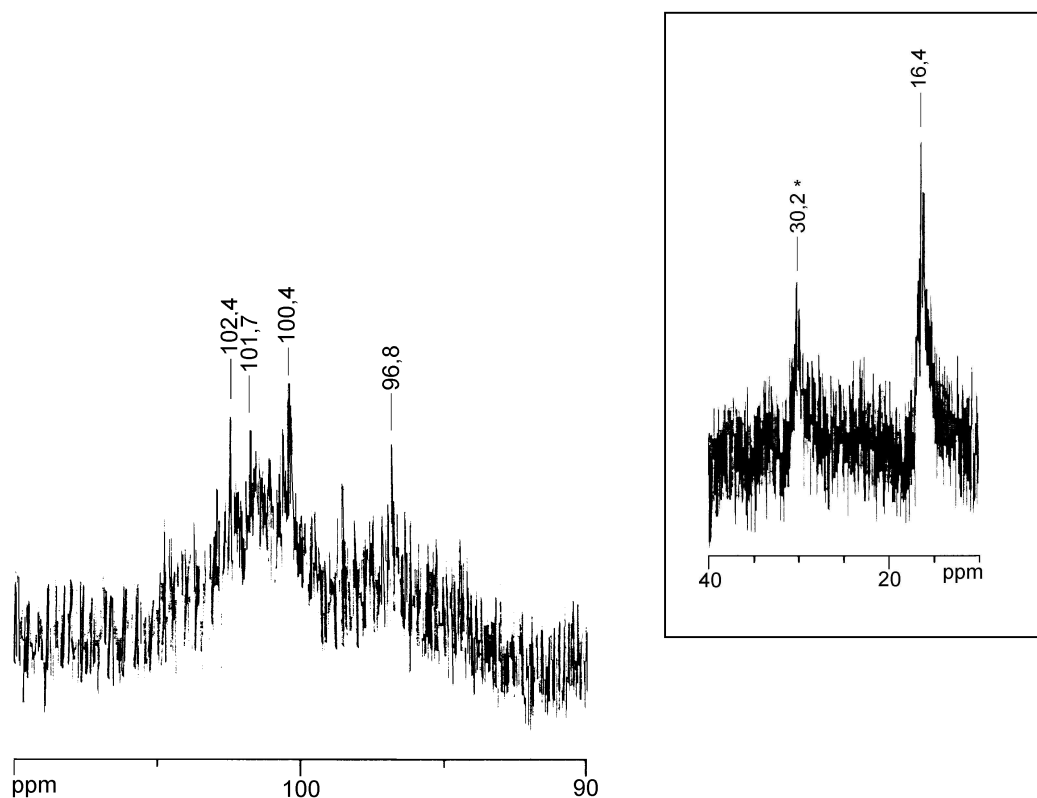


FIGURA 20: Espectro de RMN-<sup>13</sup>C da fração EXODP-1,0. Deslocamentos químicos em ( $\delta$ ) ppm. Calibração interna acetona (30,2 ppm).

O espectro de RMN-<sup>13</sup>C da fração EXOdp-1,0 mostra um elevado grau de complexidade na região anomérica. Devido a grande variação de

monossacarídeos, e da relação 1:1 entre fucose e manose, um único sinal na região anomérica do espectro pode ser atribuído a mais de um tipo de unidade, não sendo possível definir seu assinalamento. Podemos citar como exemplo o sinal em 102,4 ppm que pode ser atribuído ao C-1 de  $\alpha$ -L-fucopiranosose (USUI et al., 1981, PONCE et al., 2003) ou ao C-1 de unidades terminais não redutoras de manopiranosose (JAKOVLJEVIC et al., 1998, ALQUINI et al., 2003).

Outra dificuldade para o assinalamento dos sinais dessa fração, é o fato dessa amostra ser sulfatada. Substituições por sulfato causam deslocamentos químicos nos sinais. Sendo assim, a heterogeneidade da fração, a provável complexidade dos polímeros e ausência de dados na literatura referente à estrutura de polissacarídeos de diatomáceas, dificultam uma análise química mais detalhada dessa fração. Entretanto alguns sinais mais característicos podem ser discutidos:

A presença de grupos O-metil de fucose e ramnose é demonstrada com sinais em 16,2 a 16,4 ppm (GORIN; MAZUREK, 1975). Devido à baixa porcentagem de ácido urônico na amostra, não foi evidenciado o sinal referente ao C-6 do grupamento carboxílico em 174,0 ppm. Diferentemente das frações EXOdp-0,1 e EXOdp-0,2 não aparecem no espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  da fração EXOdp-1,0, sinais em campo mais alto (22,1 ppm) de metil ligado a carbono carboxílico de ácido pirúvico e/ou N-acetil galactosamina.

Para a determinação da estrutura química fina da fração EXOdp-1,0, além da purificação e conseqüente homogeneidade da fração será necessário a determinação do posicionamento dos grupos sulfatos através de análises comparativas de metilação e de RMN- $^{13}\text{C}$  do polímero nativo e dessulfatado, que permitirão identificar a localização dos grupos sulfato no polímero original.

#### 4.8 CONSIDERAÇÕES

Todas as frações foram submetidas a três ciclos de metilação. As análises dos derivados metilados da fração EXOdp-0,2 apresentou uma grande porcentagem de terminais não redutores. Os derivados majoritários presentes nesta fração foram: 2,3-Me<sub>2</sub>-Rha e 3,4-Me<sub>2</sub>-Rha que demonstram ligações (1→4) e (1→2) nas unidades de ramnose; 2,3,6-Me<sub>3</sub>-Gal que demonstra ligação (1→4)

nas unidades de galactose. Observa-se também, a presença de terminais não redutores de unidades de arabinofuranose através do derivado metilado 2,3,5-Me<sub>3</sub>-Araf. Entretanto, como essa amostra assim como as outras, não apresentam homogeneidade, propor uma estrutura com esses dados, poderia ser contestado. Portanto, as análises dos derivados metilados auxiliaram em parte a elucidação das estruturas propostas pelo RMN-<sup>13</sup>C, sendo necessário à homogeneidade das frações para que essa técnica possa ser utilizada como sucesso nesse estudo.

A amostra EXOdp-0,2 também foi submetida à técnica de ressonância magnética nuclear bidimensional heteronuclear. A técnica HMQC, foi utilizada com a finalidade de se obter maiores informações sobre os sinais anoméricos dessa amostra, uma vez que essa técnica correlaciona os sinais referentes ao núcleo de carbono e o núcleo de hidrogênio ligado a esse carbono. Entretanto, as correlações esperadas não foram obtidas com sucesso. A explicação mais provável para esse fato, foi à pequena quantidade de amostra disponível para a realização do experimento.

Neste trabalho foram determinados os aspectos químicos gerais dos polímeros constituintes da diatomácea *C. wailiesii*. As informações obtidas por técnicas de RNM-<sup>13</sup>C sobre esses polímeros, representam um grande avanço em relação aos polissacarídeos de diatomáceas publicados atualmente, principalmente, porque com exceção do polissacarídeo de reserva (crisolaminarana), quase não há na literatura dados, sobre a estrutura química de polissacarídeo de diatomácea, que não sejam somente sobre a composição monossacarídica.

Devido ao tempo não hábil para obtenção de material suficiente para o estudo químico da estruturas presentes, não foi possível a purificação dos polímeros e, conseqüentemente, a caracterização química fina dos mesmos. Entretanto, uma vez que a condição de cultivo e a extração dos polissacarídeos da microalga foram determinadas, a elucidação das estruturas desses polissacarídeos é possível de ser realizada, em futuros estudos.

## CONCLUSÕES

- O desenvolvimento e produção de carboidrato total solúvel pela microalga *C. wailiesii* foi melhor e maior em meio f/2 aerado sem modificações, do que em meio com redução de nitrogênio, sendo que a maior produção de carboidrato solúvel foi na fase estacionária. Nas condições de cultivo estabelecidas a diatomácea *C. wailiesii* não se desenvolveu na presença de antibióticos, mostrando morte celular após o tratamento.
- Todas as frações brutas apresentam teor de açúcar total, proteína, ácido urônico e grupamentos sulfatos em suas composições.
- A fração Exodp-0,1 demonstrou ser constituída principalmente por uma galactana com esterificações por ácido pirúvico. Este é o primeiro relato de polissacarídeos piruvatados em diatomáceas do gênero *Coscinodiscus*.
- A fração Exodp-0,2 demonstrou ser composta principalmente por uma galactana. Além disso, esta fração apresenta unidades monossacarídicas de ácido galacturônico e N-acetilgalactosamina, sendo que é a primeira vez que se relata a presença de açúcar aminado em polissacarídeos de diatomáceas
- A fração EXOdp-1,0 demonstrou ser composta principalmente por um polissacarídeo sulfatado constituído de fucose e manose, ou dois polímeros distintos, sendo uma fucana e uma manana.
- As principais diferença encontrada na composição monossacarídica do exopolissacarídeo da microalga *C. wailiesii* obtido nesse trabalho e do realizado por PERCIVAL (1980) foram: a porcentagem de galactose, o tipo de ácido urônico e a presença ou não de açúcar aminado.
- A diatomácea *C. wailiesii*, sob as condições de cultivo estabelecidas, sintetizou ácidos graxos saturados, não sendo evidenciado a presença de ácidos graxos insaturados. Esta foi a primeira vez que foi descrito composição lipídica para diatomáceas do gênero *Coscinodiscus*.
- As informações obtidas por RMN-13C, das amostras obtidas do fracionamento da fração EXO-DP, são de suma importância, uma vez que, com exceção do polissacarídeo de reserva (crisolaminarana), pouco se conhece sobre a estrutura química de polissacarídeos de diatomáceas.

## REFERÊNCIAS

- ALLAN, G. G.; LEWIN, J.; JOHNSON, P. G. Marine Polymers. IV diatom polysaccharides. **Botanica Marina**, Berlin, v. 15, p. 102-108, 1972.
- ALQUINI, G.; CARBONERO, E. R.; ROSADO, F. R.; COSENTINO, C.; IACOMINI, M. Polysaccharides from the fruit bodies of the basidiomycete *Laetiporus sulphureus* (Bull.: Fr.) Murr. **FEMS Microbiology Letters**, Netherlands, v. 18, p. 1-6, 2003.
- BHOSLE, N. B.; SAWANT, S. S.; GARG, A.; WAGH, A. B. Isolation and partial chemical analysis of exopolysaccharides from the marine fouling diatom *Navicula subinflata*. **Botanica Marina**, Berlin, v. 38, p. 103-110, 1995.
- BHOSLE, N. B.; SAWANT, S. S.; GARG, A.; WAGH, A. B.; EVANS, L. V. Chemical characterization of exopolysaccharides from the marine fouling diatom *Amphora coffeaeformis*. **Biofouling**, v. 10(4), p. 301-307, 1996.
- BIERSMITH, A.; BENNER, R. Carbohydrates in phytoplankton and freshly produced dissolved organic matter. **Marine Chemistry**, Amsterdam, v. 63, p. 131-144, 1998.
- BOALCH, G. T. Algal blooms and their effects on fishing in the English Channel. **Hydrobiologia**, Dordrecht, v. 116/117, p. 449-452, 1984.
- BOALCH, G. T.; HARBOUR, D. S. Unusual diatom off the coast of south-west England and its effects on fishing. **Nature**, London, v. 269, p. 687-688, 1977.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, Orlando, v. 72, p. 248-254, 1976.
- BRANDINI, F. P.; LOPES, R. M.; GUTSEIT, K. S.; SPACH, H. L.; SASSI, R. Planctonologia na Plataforma Continental do Brasil. **Ministério do Meio Ambiente e da Amazônia Legal – IBAMA/CIRM/FEMAR**, 196p.
- BROUWER, J. F. C.; STAL, L. J. Daily fluctuations of exopolymers in culture of the benthic diatoms *Cylindrotheca closterium* and *Nitzschia* sp. (BACILLARIOPHYCEAE). **Journal of Phycology**, Washington, v. 38, p. 464-472, 2002.
- BROWN, M. R.; JEFFREY, S. W.; VOLKMAN, J. K.; DUNSTAN, G. A. Nutritional properties of microalgae for mariculture. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 151, p. 315-331, 1997.
- CARBONERO, E. R., SASSAKI, G. L.; STUELP, P.; GORIN, P. A. J.; WORANOVICZ-BARREIRA, S. M.; IACOMINI, M. Comparative studies of the polysaccharides isolated from lichenized fungi of the genus *Cladonia*: significance as chemotypes. **FEMS Microbiology Letters**, Netherlands, v. 194, p. 65-69, 2001.

CHIOVITTI, A.; BACIC, A.; CRAIK, D. J.; KRAFT, G. T.; LIAO, M. L.; FALSHAW, R.; FURNEAUX, R.H. A pyruvated carragenan from Australian specimens of the red algae *Saonema filiforme*. **Carbohydrate Research**, Kidlington, v. 310, p. 77-83, 1998.

CHIOVITTI, A.; BACIC, A.; CRAIK, D. J.; MUNRO, S. L. A.; KRAFT, G. T.; LIAO, M.L. Cell-wall polysaccharides from red algae of the family Solieriaceae (Gigartinales, Rhodophyta): Novel, highly pyruvated carrageenans from the genus *Callophycus*. **Carbohydrate Research**, Kidlington, v. 299, p. 229-243, 1997.

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

COOMBS, J.; VOLCANI, B. E. Studies on the biochemistry and fine structure of silica shell formation in diatoms. Silicon-induced metabolic transients in *Navicula pelliculosa*. **Planta**, Berlin, v. 80, p 264-279, 1968a.

COOMBS, J.; VOLCANI, B. E. Studies on the biochemistry and fine structure of silica shell formation in diatoms. Chemical changes in the wall of *Navicula pelliculosa* during its formation. **Planta**, Berlin, v. 82, p 280-292, 1968b.

CORPE, W. A. An acid polysaccharide produced by a primary film forming marine bacterium. **Developments in Industrial Microbiology**, Amsterdam, v. 2, p. 402-412, 1970.

DANIEL, G. F; CHAMBERLAIN; JONES E. B. G. Cytochemical and microscopical observations on the adhesive materials of marine fouling diatoms. **British Phycological Journal**, London, v. 22, p. 101-118, 1987.

DARLEY, W. M. Biochemical composition. In: Werner. D. The Biology of Diatoms. **Blackwell Scientific Publications**, p 198-223, 1977.

DE PHILIPIS, R.; MARGUERI, M. C.; PELOSI, E.; VENTOSA, S. Exopolysaccharide production by a unicellular cyanobacterium isolated from a hypersaline habitat. **Journal of Applied Phycology**, Dordrecht, v. 5, p. 387-394, 1993.

DECHO, A. W. Microbial exopolimer secretions in ocean environments: their role(s) in food webs and marine processes. **Oceanografic and Marine Biology an Annual Review**, London, v. 28, p. 73-153, 1990.

DELGOBO, C. L.; GORIN, P. A. J.; JONES, C.; IACOMINI, M. Gum heteropolysaccharide and free reducing mono- and oligosaccharides of *Anadenanthera colubrina*. **Phytochemistry**, Oxford, v. 47, n.7, p. 1207-1214, 1998.

DODGSON, K. S. Determinaton of inorganic sulphate in studies on the enzymic and non-enzymic hydrolysis of carbohydrate and other sulfate esters. **Biochemical Journal**, London, v. 78, p. 312-319, 1961.

DONG, Q.; FANG, J. Structural elucidation of a new arabinogalactan from the leaves of *Nerium indicum*. **Carbohydrate Research**, Kidlington, v. 332, p. 109-114, 2001.

DUARTE, M. E. R. ; NOSEDA, M. D. CARDOSO, M. A.; TÚLIO, S.; CEREZO, A. S. The structure of a galactan sulfate from the red seaweed *Bostrychia montagnei*. **Carbohydrate Research**, Kidlington, v. 337, p. 1137-1144, 2002.

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

EPA, U. S. Algal assay procedure bottle test. National Eutrophication Research Program. Pacific Northwest Water Laboratory, Corvallis, Oregon, 1971.

FERNANDES, L. F. **Variação sazonal do fitoplâncton e parâmetros hidrográficos em uma estação costeira de Paranaguá, Paraná, Brasil**. Curitiba, 1992. 93f. Dissertação (Mestrado em Botânica) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

FERNANDES, L. F.; ZEHNDER-ALVES, L.; BASSFELD, J. C. The recently established daitom *Coscinodiscus wailesii* (Coscinodiscales, Bacillariophyta) in Brazilian waters. I: Remarks on morphology and distribution. **Phycological Research**, Carlton South, v. 49, p. 89-96, 2001.

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

FLETCHER, M.; FLOODGATE, G. D. An electron microscopic demonstration of an acid polysaccharide involved in adhesion of a marine bacterium to solid surfaces. **Journal General Microbiology**, Reading, v. 74, p. 325-334, 1973.

FOGG, G. E. The ecological significance of extracellular products of phytoplankton photosynthesis. **Botanica Marina**, Berlin, v. 26, p. 3-14, 1983.

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

FRANSEN, C. T. M.; HASELEY, S. R.; HUISMAN, M. M. H.; SCHOLS, H. A.; VORAGEN, A. G. J.; KAMERLING, J. P.; VLIEGENTHART, J. F. G. Studies on the structure of a lithium-treated soybean pectin: characteristics of the fragments and determination of the carbohydrate substituents of galacturonic acid. **Carbohydrate Research**, Kidlington, v. 328, p. 539-547, 2000.

GAREGG, P. J.; JANSSON, P. E.; LINDBERG, B.; LINDH, F.; LONNGREN, J. Configuration of the acetal carbon atom of pyruvic acid acetals in some bacterial polysaccharides. **Carbohydrate Research**, Kidlington, v. 78, p. 127-132, 1980.

GAREGG, P. J.; LINDBERG, B.; KVARNSTROM, I. Preparation and N.M.R. studies of pyruvic acid and related acetals of pyranosides: configuration at the acetal carbon atoms. **Carbohydrate Research**, Kidlington, v. 77, p. 71-78, 1979.

GORIN, P. A. J. BARON, M.; IACOMINI, M. Storage products of lichens. In: GALUN, M. **CRC Handbook of lichenology**,. Florida: CRC Press, v. 3, p. 9-23, 1988.

GORIN, P. A. J. MAZUREK, M.; DUARTE, H. S. IACOMINI, M.; DUARTE, J. H. Properties of  $^{13}\text{C}$ -N.M.R. spectra of O-(1-carboxyethylidene) derivatives of methyl  $\beta$ -D-galactopyranoside: models for determination of pyruvic acid acetal structures in polysaccharides. **Carbohydrate Research**, Kidlington, v. 100, p. 1-15, 1982.

GORIN, P. A. J.; MAZUREK, M. Further studies on the assignment of signals in  $^{13}\text{C}$  magnetic resonance spectra of aldoses and derived methyl glycosides. **Canadian Journal of Chemistry**, Ottawa, v. 53, p. 1212-1222, 1975.

GUILLARD, R. R. L. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrate in "Culture of Marine Invertebrate Animals" (Eds: Smith W. L. And Chanley M. H.). **Plenum Press**, New York, p. 26-60, 1975.

GUILLARD, R. R. L; RYTHER, J .H. Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. **Canadian Journal Microbiology**, Ottawa, v. 8, p. 229 - 239, 1962.

HALLEGRAEF, G. M. A review of harmful algal blooms and their apparent global increase. **Phycologia**, Lawrence, v. 32, p.79-99, 1993.

HALLEGRAEFF, G. M. Harmful algal blooms: A global overview. In Hallegraeff, G. M., Anderson D. M. and Cembella A. D. (Eds) **Manual on Harmful Marine Microalgae**. Intergovernmental Oceanographic Commission UNESCO, Paris, p. 1-22, 1995.

HANDA, N. carbohydrate metabolism in the marine diatom *Skeletonema costatum*. **Marine Biology**, Berlin, v. 4, p. 208-214, 1969.

HASLE, G. R.; FRYXELL, G. A. Taxonomy of diatoms. In Hallegraeff, G. M., Anderson D. M. and Cembella A. D. (Eds) **Manual on Harmful Marine Microalgae**. Intergovernmental Oceanographic Commission UNESCO, Paris, p. 339-364, 1995.

HAUG, A.; MYKLESTAD, S. Polysaccharides of marine diatoms with special reference to *Chaetoceros* species. **Marine Biology**, Berlin, v. 34, p. 217-222, 1976.

HECKY, R. E.; MOPPER, K.; KILHAM, P.; DEGENS, E. T. The amino acid and sugar composition of diatom cells-walls. **Marine Biology**, Berlin, v. 34, p. 217-222, 1976.

HOAGLAND, K. S.; ROSOWSKI, J. R.; GETZ, M.R.; ROEMER, S.C. Diatom extracellular polymeric substances: function, fine structure, chemistry and physiology. **Journal of Phycology**, Lawrence, v. 29, p. 537-566, 1993.

HOEK, C. V. D.; MANN, D. G.; JAHNS, H. M. In: **Algae: An introduction to phycology.**, p. 133-152, 1995.

<http://earthguide.ucsd.edu/diatom/d1.html> Acesso em maio de 2003.

IACOMINI, M., ZANIN, S. M. W.; FONTANA, J. D.; HOGGE, L.; GORIN, P. A. J. Isolation and characterization of  $\beta$ -D-glucan, heteropolysaccharide, and trehalose components of the basidiomycetous lichen *Cora pavonia*. **Carbohydrate Research**, Kidlington, v. 168, p. 55-65, 1987.

JAKOVLJEVIC, D.; MILJKOVIC-STOJANOVIC, J.; RADULOVIC, M.; HRANISAVLJEVIC-JAKOVLJEVIC, M. On the mannogalactan from the fruit bodies of *Pleurotus ostreatus* (Fr.) Quél. **J. Serb. Chem. Soc.** v. 63(2), p. 137-142, 1998.

KUCKEY, R. M.; BROWN, M. R.; BARRET, S. M.; HALLEGRAEFF, G. M. Isolation of new nanoplanktonic diatoms strains and their evaluation as diets for juvenile Pacific oysters (*Crassostrea gigas*). **Aquaculture**, Netherlands, v. 211, p. 253-274, 2002.

LANGE, C. B.; HASLE, G. R.; SYVERTSEN, E. E. Seasonal cycle of diatoms in the Skagerrak, North Atlantic, with emphasis on the period 1980-1990. **Sarsia**, Bergen, v. 77, p. 173-187, 1992.

LEANDRO, S. M.; GIL, M. C.; DELGADILLO, I. Partial characterisation of exopolysaccharides exuded by planktonic diatoms maintained in batch cultures **Acta Oecologica**, Paris, v.24, p. S49-S55, 2003.

LEE, R. E. **Phycology**. 2. ed. Cambridge University Press: Cambridge, 1989. 645p.

LEGENDRE, L. The significance of microalgal blooms for fisheries and for the export of particulate organic carbon in oceans. **Journal of Plankton Research**, Oxford, v. 12(4), p. 681-699, 1990.

LESLEY, G.; SHARPLES, J. L.; STEPHEN, G. W.; Structure of the O-specific polysaccharide for *Acinetobacter baumannii* serogroup-O1. **Carbohydrate Research**, Kidlington, v. 319, p. 204-208, 1999.

LEWIN, J. C.; LEWIN, R. A.; PHILPOTT, D. E. Observations on *Phaeodactylum tricorutum*. **Journal of General Microbiology**, Reading, v. 18, p 418-426, 1958. London, v. 8, p. 1-71, 1976.

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

MALEJ, A.; HARRIS, R. P. Inhibition of copepod grazing by diatom exudates: a factor in the development of mucus aggregates? **Marine Ecology Progress Series**, Oldendorf, v 96, p. 33-42, 1993.

MANZINI, G.; CEESARO, A.; DELBIN, F.; PAOLETII, S.; REISENHORFER, W. Cooper (II) binding by natural ionic polysaccharides. Part I. Potentiometric spectroscopic data. **Bioelectrochemistry and Bioenergetics**, Shannon, v. 12, p. 443-454, 1984.

MCLACHLAN, J. Growth media-marine. **In: Handbook of phycological methods, culture methods and growth measurements**. p. 25-52, 1973.

MEDCALF, D. G.; BRANNON, J. H.; SCOTT, J.R.; LEWIN, J.; ALLAN, G. G.; NORRIS, G. E. Polysaccharides from microscopic red algae and diatoms. **Proceedings of the International Seaweed Symposium**, Princeton, v 8 , 1974

MENESTRINA, J. M.; IACOMINI, J.; JONES, C.; GORIN, P. A. J. Similarity of monosaccharide, oligosaccharide and polysaccharide structures in gum exudate of *Anacardium occidentale*. **Phytochemistry**, Oxford, v. 47, n.5, p. 715-721, 1998.

MILLER, I. J.; FURNEAUX, R. H. The structural analysis of the polysaccharide from *Kallymenia berggrenii*. **Botanica Marina**, Berlin, v. 39, p141-147, 1996.

MOREIRA FILHO, H.; VALENTE-MOREIRA, I. M.; SOUZA-MOSIMANN, R. M.; CUNHA, J. A. Avaliação florística e ecológica das diatomáceas (Chrysophyta, Bacillariophyceae) marinha e estuarinas nos estados do Paraná e Santa Catarina. **Estudos de Biologia**, Pontifícia Univ. Católica do Paraná, v. 25, p. 5-48, 1990.

MYKLESTAD, S. Phytoplankton extracellular production and leackage with considerations on the polysaccharide accumulation. **Annali dell'Istituto Superiore di Sanita**, Rome, v.3, p. 401-404, 1999.

MYKLESTAD, S. Production, chemical structure, metabolism, and biological function of the (1→3)-linked, β-D-glucans in diatoms. **Biological Oceanography**, London, v. 6, p. 313-326, 1989.

MYKLESTAD, S. Production of carbohydrate by marine planktonic diatoms. II. Influence of the N/P ratio in the growth medium on the assimilation ratio, growth rate, and production of cellular and extracellular carbohydrate by *Chaetoceros affinis* Var. *Willei* and *Skeletonema costatum*. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, Amsterdam, v. 29, p. 161-179, 1977.

MYKLESTAD, S. Production of carbohydrate by marine planktonic diatoms. I. Comparison of nine different species in culture. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, Amsterdam, v 15, p. 261-274, 1974.

MYKLESTAD, S. Release of Extracellular Products by Phytoplankton with Special Emphasis on Polysaccharides. **The Science of the Total Environment**, Shannon, v. 165, p. 155-164, 1995

MYKLESTAD, S.; HAUG, A. Production of carbohydrates by the marine diatom *Chaetoceros affinis* var. *willei* (Gran) Hustedt. I. Effects of the concentration of nutrients in the culture medium. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, Amsterdam, v 9, p. 125-136, 1972.

MYKLESTAD, S.; HAUG, A.; SMESTAD, B. Structural studies of the extracellular polysaccharide produced by the diatom *Chaetoceros curvisetus* Clev. **Acta Chemica Scandinavica**, Copenhagen, v. 29, p. 337-340, 1975.

MYKLESTAD, S.; LARSEN, B. Production of carbohydrates by the marine diatom *Chaetoceros affinis* var. *willei* (Gran) Hustedt. II. Preliminary investigation of the extracellular polysaccharide. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, Amsterdam, v 9, p. 137-144, 1972.

NAGAI, S.; HORI, Y.; MANABE, T.; IMAI, I. Morphology and rejuvenation of *Coscinosiscus wailesii* Gran (Bacillariophyceae) resting cells found in bottom sediments of Harina-Nada, Seto Island Sea, Japan. **Nippon Suisan Gakkaishi**, Tokyo, v. 61(2), p. 179-185, 1995a.

NAGAI, S.; HORI, Y.; MANABE, T.; IMAI, I. Restoration of cell size by vegetative cell enlargement in *Coscinodiscus wailesii* (Bacillariophyceae). **Phycologia**, Lawrence, v. 34(6), p.533-535, 1995b.

NAGAI, S.; IMAI, I.; MANABE, T. A simple and quick technique for establishing axenic cultures of the centric diatom *Coscinodiscus wailesii* Gran, **Journal of Plankton Research**, Oxford, v. 20, n. 7, p. 1417-1420, 1998.

NAGARKAR, S. New Records of Marine Cyanobacteria from Rocky Shores of Hong Kong. **Botanica Marina**, Berlin, v. 41, p. 527-542, 1998.

NOSEDA, M. D.; CAUDURO, J. P.; DUCATTI, D. R. B.; DUARTE, M. E. R. Chemical structure of the sulfated polysaccharides extracted from the red seaweed *Acanthophora spicifera*. **Proceedings of Third International Symposium on Nature Polymers**. p. 176-180, 2000.

PAINTER, T. J. Algal Polysaccharides. In: ASPINALL, G. **The Polysaccharides**, v. 2, p. 195-285, 1982.

PARMINTIER, J. Marine Diatoms. Disponível em <http://www.microscopy-uk.org.uk/mag/art9/b/diatom/hym1> Acesso em dezembro de 2001.

PELCZAR, M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. In: **Microbiologia: Conceitos e aplicações**. v. 1, p180-181, 1997.

PELEGRIN, Y. F. Algas em la "botica". **Avance y Perspectiva**. v. 20, p. 283-292, 2001.

PERCIVAL, E. E.; McDOWELL, R. H. Chemistry and enzymology of marine algal polysaccharides. **Publications Academic Press**, London, 1967.

- PERCIVAL, E.; RAHMASN, M. A.; WEIGEL, H. Chemistry of the polysaccharides of the diatom *Coscinodiscus nobilis*. **Phytochemistry**, Oxford, v. 19, p. 809-811,
- PINTO, L. G.; MARTINEZ, M.; BOLANO, L. M., RIVAS, C. OCANDO, E. The polysaccharide gum from *Acacia tortuosa*. **Phytochemistry**, Oxford, v. 47, p. 53-56, 1998.
- PONCE, N. M. A.; PUJOL, C. A.; DAMONTE, M. L. F.; STORTZ, C. A. Fucoidans from the Brown seaweed *Adenocystis utricularis*: extraction methods, antiviral activity and strictural studies. **Carbohydrate Reserch**, Kidlington, v. 338, p. 153-165, 2003.
- PRADO , S. R. T. ; GORIN, P. A. J.; STUELP, P. M.; HONDA, N. K.; IACOMINI, M. An unusual juxtaposition of polysaccharides components of *Collema leptosporum*. **Carbohydrate Polymers**, Shannon, v. 40, p. 271-276, 1999.
- RAMUS, J. The production of extracellular polysaccharide by the unicellular red alga *Porphyridium aerugineum*. **Journal of Phycology**, Washibgton, v. 8, p. 97-111, 1972.
- RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal** 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. p. 261.
- RAVENSCROFT, N.; LESLEY-PAROLIS, A. S.; PAROLIS, H. Bacteriophage degradation of *Klebsiella* K30 capsular polysaccharide. An NMR investigation of the 3,4-pyruvated galactose-containing repeating oligosaccharide. **Carbohydrate Reserch**, Kidlington, v. 254, p. 333-340, 1994.
- READ, R. R.; COSTERTON, J. W. Purificaion and characterization of adhesive exopolysaccharides from *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas fluorescense*. **Canandian Journal Microbiology**, Ottawa, v. 33, p. 1080-1090, 1987.
- REIS, A. R.; TISCHER, C. A.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI. M. A new pullulan and a branched (1→3)-,(1→6)-linked  $\beta$ -glucan from the lichenised ascomycete *Teloschistes flavicans*. **FEMS Microbiology Letters**, Netherlands, v. 210, p. 1-5, 2002.
- RENARD, C. M. G. C.; LAHAYE, M.; MUTTER, M.; VORAGEN, F. G. J.; THIBAUT, J. F. Isolation and structural characterisation of rhamnogalacturonan oligomers generated by controlled acid hydrolises of sugar-beet pulp. **Carbohydrate Research**, Kidlington, v. 305, p. 271- 280, 1980.
- RENAUD, S. M. Effects of temperature on growth, chemical composition and fatty acid composition of tropical Austrillian microalgal grown in bath cultures. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 211,-p. 195-214, 2002.
- RICK, H. J.; DÜRSELEN, C. D. Importance and abundance of the recently established species *Coscinodiscus wailesii* Gran & Angst in the German Bight. **Helgolaender Meeresuntersuchungen**, Hamburg, v. 49, p. 355-374, 1995.

RINCÉ, H. J.; PAULMIER, G. données nouvelles sur la distribution de la diatomée marine *Coscinodiscus wailesii* Gran & Angst (Bacillariophyceae). **Phycologia**. Lawrence, v. 25, p. 73- 79, 1986.

RODRIGUES, C.; BHOSLE, N.B. Exopolysaccharide production by *Vibrio fischeri*, a fouling marine bacterium. **Biofouling**, v. 4, p. 301-308, 1991.

ROITMAN, I. ; TRAVASSOS, L.R.; AZEVEDO. J.L. **Tratado de Microbiologia**, v.1, p105-119, 1991.

ROUND, F. E.; CRAWFORD, R. M.; MANN, D. G. **In: The Diatoms.**, p. 1-125, 1990.

SHAPIRO, L. Microbial growth. In: Perry, J.J., Stanley, J. T. **Microbiology: dynamics e diversity**. Saunders College Publising, 1997.

SIERAKOWSKI, M. R.; GORIN, P.A.; REICHER, F.; CORREA, J. B. C. Some structural feactures of an heteropolysaccharide from the *Pereskia aculeata*, Mill. **Phytochemistry**, Oxford, v. 26, p. 1709-1713, 1987.

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

SMAYDA, T. J. Harmful algal blooms: their ecophysiology and general relevance to phytoplankton blooms in the sea. **Limnology and Oceanography**, Waco, v.42 (5), p. 1137-1153, 1997.

SMESTAD, B. ; HAUG, A. ; MYKLESTAD, S. Production of carbohydrate by the marine diatom *Chaetoceros affinis* var. *willei* (Gran) Hustedt. III. Structural studies of the extracellular polysaccharide. **Acta Chemica Scandinavica**, Copenhagen, v.(B) 29, p. 662-666, 1974.

SOUTH, G.R.; WHITTICK, A. **Introduction to Phycology**. Oxford: Blackwell Scientific, 1987. 341p.

SOUZA-MOSIMANN, R. M.; FELÍCIO-FERNANDES, G.; SILVA, R. L.; FERNANDES, L. F. Diatomáceas no trato digestivo de três espécies de camarão da pesca artesanal marinha - Santa Catarina, Brasil. **Insula**, Florianópolis, v. 22, p. 83- 106, 1993.

STAATS, N.; STAL, L. J.; MUR, L.R. Exopolysaccharide production by the epipellic diatom *Cylindrotheca closterium*: Effects of nutriente conditions. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, Amsterdam, v. 249, p. 13-27, 2000.

STEVENSON, T. T.; FURNEAUX, R. H. Chemical methods for the analysis of sulphated galactans from red algae. **Carbohydrate Research**, Kidlington, v. 210, p. 277-298, 1991.

STORSETH, T. R.; HANSEN, K.; SKJERMO, J.; DRANE, J. Characterization of a  $\beta$ -D-(1 $\rightarrow$ 3)-glucan from the marine diatom *Chaetoceros mülleri* by High-resolution

- magic-angle spinning NMR spectroscopy on whole algal cells. **Carbohydrate Research**, Kidlington, v. 339, p. 421-424, 2004.
- sugar composition of diatom cell-walls. **Marine Biology**, Berlin, v. 19, p. 323-331, 1973.
- TISCHER, C. A.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. The free reducing oligosaccharides of gum arabic: aids for structural assignments in the polysaccharide. **Carbohydrate Polymers**, Shannon, v. 47, p. 151-158, 2002.
- TOMAS, C. R. **Identifying Marine Phytoplankton**. St. Petersburg: Academic Press, 1997. 859 p.
- USUI, T.; IWASAKI, Y.; MIZUNO, T. Isolation and characterization of two kinds of heterogalactan from the fruit bodies of *Ganoderma applanatum* by employing a column of concanavalin A-Sepharose 4B. **Carbohydrate Research**, Kidlington, v. 92, p. 103-114, 1981.
- VALENTE-MOREIRA, I. M. A flórmula diatomológica marinha e estuarina nos balneários de Canoas e Ipanema, Estado do Paraná, Brasil. **Estudos de Biologia**. Pontifícia Univ. Católica do Paraná, v. 17, p. 26-48, 1987.
- VAN DEN HOEK, C.; MANN, D. G.; JAHNS, H. M. **ALGAE An Introduction to Phycology**. Cambridge: Cambridge University Press, 1989. 627 p.
- VOLKMAN, J. K.; EGLINTON, G.; CORNER, E. D. S Sterols and fatty acids of the marine diatom *Biddulphia sinensis*. **Phytochemistry**, Oxford, v. 19, p. 1809-1812, 1979.
- VOLKMAN, J. K.; HALLEGRAEFF, G. M. Lipids in marine diatoms of genus *Thalassiosira*: predominance of 24-methylenecholesterol. **Phytochemistry**, Oxford, v. 37 (5), p. 1389-1394, 1988.
- WANG, Y.; LU, J.; MOLLET, J. C.; GRETZ, M. R.; HOAGLAND, K. D. Extracellular matrix assembly in diatoms (Bacillariophyceae) (II. 2,6-dichlorobenzonitrile inhibition of motility and stalk production in the marine diatom *Achnanthes longipes*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 113, p. 1071-1080, 1997.
- YOSHIDA, M. Function of the carbohydrates in contact site a glycoprotein of *Dictyostelium discoideum* affected by tunicamycin. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Oxford, v. 98B, p. 563-568, 1991.
- ZIBETTI, R. G. M. **Determinação da estrutura química de galactanas híbridas-D/L isoladas da alga vermelha *Cryptonemia crenulata* (CRYPTONEMIALES, RHODOPHYTA)**. Curitiba, 2001. 68 f. Dissertação (Mestrado em Ciências-Bioquímica e Biologia Molecular) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.