

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ESTER MAZEPA

**FRACIONAMENTO E CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DE COMPOSTOS
PRESENTES NO EXTRATO AQUOSO DA MICROALGA *Scenedesmus
subspicatus* E SUA POTENCIAL ATIVIDADE BIOESTIMULANTE VEGETAL**

CURITIBA

2013

ESTER MAZEPA

**FRACIONAMENTO E CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DE COMPOSTOS
PRESENTES NO EXTRATO AQUOSO DA MICROALGA *Scenedesmus
subspicatus* E SUA POTENCIAL ATIVIDADE BIOESTIMULANTE VEGETAL**

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

Orientador: Prof. Dr. Miguel Daniel Nosedá

Co-orientadores: Prof. Dr. Diogo Ricardo Bazan Ducatti
Prof. Dr. Átila Francisco Mógor

CURITIBA

2013

Termo de aprovação

Ester Mazepa

**FRACIONAMENTO E CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DE COMPOSTOS
PRESENTES NO EXTRATO AQUOSO DA MICROALGA *Scenedesmus
subspicatus* E SUA POTENCIAL ATIVIDADE BIOESTIMULANTE VEGETAL**

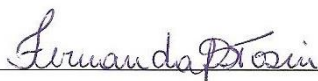
Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Ciências-Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:



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



Profª Drª Patrícia Maria Stuelp Campelo
Pontifícia Universidade Católica do Paraná



Drª Fernanda Fogagnoli Simas Tosin
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR

Curitiba, 30 de setembro de 2013

Orientador: Prof. Dr. Miguel Daniel Nosedá

Co-orientadores: Prof. Dr. Diogo Ricardo Bazan Ducatti

Prof. Dr. Átila Francisco Mógor

À Deus, por me permitir chegar até aqui;
e aos meus pais, Antonio e Nilza,
pelo amor e dedicação sempre infinitos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus primeiramente, por ter me dado o privilégio da vida. Por ser fiel em todos os momentos, mostrando-me qual decisão tomar, principalmente nas horas mais difíceis desta trajetória que termina aqui, ou melhor, que está apenas começando. Pelo seu cuidado com todos os detalhes. Agradeço a Ele por dar a nós, simples humanos, uma minúscula parte da sua infinita sabedoria, a qual aos olhos humanos sempre parece não poder mais evoluir, e que usamos para explorar esta natureza maravilhosa para o bem comum.

Ao meu orientador, professor Miguel, pelo apoio e incentivo desde a iniciação científica, pelo interesse em tornar este trabalho o melhor possível. Pelos ensinamentos, conselhos, dicas e chamadas de atenção quando necessário. Também pela amizade que vem sendo construída desde então.

Ao meu co-orientador professor Diogo, pelo apoio, torcida, incentivo, pelos conhecimentos transmitidos, pelas dicas, e pela amizade.

Ao meu co-orientador professor Átila, e à Gilda, que nesta parceria de trabalho com o professor Miguel proporcionaram a continuação desta linha de pesquisa com os bioestimulantes. Pela torcida e apoio, e pelos conhecimentos passados.

Não poderia deixar de agradecer a professora Maria Eugênia, na qual eu me ancorava quando meus orientadores estavam ausentes por algum motivo. Pelos conselhos, ensino, e pelos puxões de orelha quando eu queria dar passos maiores do que podia...

À professora Patrícia Campelo, que tive o prazer de conhecer durante a graduação, pelos conhecimentos passados nesse período durante as fascinantes aulas de bioquímica. Por ter apostado em mim e me encaminhado à UFPR para fazer iniciação científica; foi aí que percebi que eu gostava mesmo do que estava fazendo. E obrigada também pela torcida e pelo apoio!

À mamãe e papai, meus queridos e amados... sem vocês eu não teria conseguido! Sempre presentes na minha vida acadêmica, mesmo sem entender nada da pesquisa vocês sofreram comigo as mesmas dores, viveram as mesmas alegrias, participaram das minhas decisões, corremos de um lado para outro juntos, e agora estamos comemorando juntos mais este passo concluído! Obrigada pela presença marcante, seja com conselhos, dicas, carinho ou atenção quando eu mais precisava. Saibam que acima de tudo, se não fosse pela educação e pelo ensino que vocês me deram desde sempre, eu não teria chegado até aqui. Amo vocês infinitamente! E agradeço também minha tia e meu tio, que estiveram sempre presentes, torcendo e me incentivando a continuar firme! Também amo vocês!

Aos meus colegas e amigos de laboratório, 248 e E3: Jeni, Tati Winkler, Tati Milani, Djuna, Fran, Andressa, Jacque, Pauline, Luciana, Cassi, Sili, Mari, Diego, pelos momentos agradáveis, pela companhia, pelas risadas, pelas conversas, pelas ajudas e dicas, pelos momentos de descontração, enfim, gosto muito de vocês!

Aos meus colegas dos outros laboratórios, que são muitos, por isso vou citar os nomes dos laboratórios para evitar esquecer alguém: E1, E2, 247, 250, 252, 259, 269, oxidações, e demais laboratórios do andar de cima, pela convivência agradável que tivemos durante este período! Sintam-se todos abraçados!!!

Não posso deixar de citar a patota de todos os momentos: Tati Milani, Sasa, Shay e Dju. Vocês são demais! Obrigada pelas risadas, pelos estudos juntas, pelas saídas, pelas conversas, pela ajuda, conselhos, dicas, pela torcida para que tudo dê certo, por esse vínculo que criamos nesse período, que só com um olhar já sabemos o que a outra está pensando. Obrigada pelo ombro amigo nos momentos de desespero e vontade de chorar, saibam que até nesses momentos vocês conseguiram me fazer rir. Só o fato de tê-las por perto já me alegra, e com certeza tudo teria sido bem mais difícil e diferente sem vocês aqui. Só lembrando que vou sentir muita falta das nossas idas à cantina todo dia depois do almoço. Ainda quero por muito tempo incomodar vocês, hehehe. Amo demais! 😊

A todos os meus colegas da turma de mestrado 2012, pela agradável companhia sempre, pelas festas juntos e também pelos vários fins de semana de estudos. Um viva por sermos uma das turmas mais animadas dessa Pós!

Às minhas amigas ninjas, que tenho desde a iniciação científica: Nadi, Stephanie, Vanessinha e Aline, por todos os momentos de descontração e risadas! Obrigada pela torcida, pelo apoio moral e ajuda durante todo esse tempo. Mesmo longe, estamos sempre juntas.

Um agradecimento especial à Célula 72: vocês me trouxeram para mais perto de Deus durante esse tempo. Obrigada pelos momentos nos quais esqueci totalmente do trabalho, onde buscamos a Deus juntos, através de orações, cantoria e leitura. Com certeza as orações de vocês foram muito fortes, afinal, aqui estamos agradecendo. Agradeço pela amizade de vocês desde que nos conhecemos!

Ao GIA-UFPR, pelo cultivo das microalgas.

Ao professor Guilherme, Arquimedes e Popó, pelas análises de RMN.

À Rosane, pelas análises de CG-EM.

Ao Thiago, do Departamento de Química, pelas análises de ESI-MS.

À Elis, Roberto, Larry e Pauline, pelas análises de HPSEC-MALLS-RID.

À minha banca examinadora, pela avaliação e correção do trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências – Bioquímica, representado atualmente pela professora Silvia Maria Suter Correia Cadena e pelo professor Emanuel Maltempi de Souza.

Ao CNPq e PRONEX-Carboidratos pelo auxílio financeiro.

MUITO OBRIGADA!

“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos.”

Isaac Newton

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo a caracterização química de compostos bioativos extraídos da microalga verde *Scenedesmus subspicatus* Chodat, assim como a determinação da atividade bioestimulante vegetal dessas moléculas. A microalga foi cultivada em meio Guillard f/2 modificado durante 10 dias, e uma alíquota de cultivo foi coletada em dias alternados para determinação do perfil de produção de carboidratos ao longo do crescimento celular. Observou-se que o maior acúmulo se deu na fase estacionária de crescimento, sendo esta a fase ideal para que o cultivo seja interrompido. A biomassa seca foi obtida após separação do meio de cultivo por centrifugação e liofilização. O material foi submetido a três extrações sequenciais, sendo a primeira aquosa em temperatura ambiente (10%, 1 h), a segunda aquosa em temperatura de 80°C (10%, 2 h), e a terceira alcalina (NaOH 0,5 M, 2 h) em temperatura de 80°C. O extrato aquoso obtido em temperatura ambiente foi dialisado em membrana de 1 kDa, e gerou as frações E (eluída) e R (retida). O extrato aquoso obtido a 80°C foi submetido a precipitação com etanol, centrifugação e liofilização, gerando as frações solúvel (SEwh) e insolúvel (Pwh) em etanol. O extrato alcalino foi neutralizado e dialisado, e também foi submetido a precipitação com etanol, gerando as frações solúvel (SEak) e insolúvel (Pak). Com estas 6 frações, foram realizadas dosagens colorimétricas de carboidratos e proteínas, além de análise da composição monossacarídica. A atividade bioestimulante vegetal em sementes de tomate (*Solanum lycopersicum*) foi avaliada para as frações E bruta e Pak, em concentrações de 0,5, 1,0, 1,5 e 2,0 g/L para cada uma das amostras, tendo como controle a água e como padrão de comparação o produto comercial ACADIAN™ Seaweed Extract (*Ascophyllum nodosum*). A fração Pak mostrou-se estatisticamente igual ao controle, portanto, esta não apresenta atividade bioestimulante. A fração E foi capaz de estimular o aumento do comprimento e do volume dos hipocótilos de forma estatisticamente igual ao produto comercial, mostrando-se como possível substituto. As análises químicas e espectroscópicas, assim como os processos de purificação, foram aprofundados com as frações E e Pak. A fração E foi submetida a fracionamento por cromatografia de exclusão (Bio-Gel P-2), gerando 6 subfrações nomeadas E1 a E6. Destas, E2, E3, E4, E5 e E6 foram caracterizadas por RMN de ¹H, ¹³C, ¹³C-DEPT, COSY, TOCSY, HSQC e HMBC, e correspondem aos glicosídeos 6-sulfo- α -D-quinovopiranosose-(1 \rightarrow 1)-glicerol (E2 e E3), α -D-galactopiranosose-(1 \rightarrow 6)- β -D-galactopiranosose-(1 \rightarrow 1)-glicerol (E4), β -D-galactopiranosose-(1 \rightarrow 1)-glicerol (E5), e aos monossacarídeos D-manose e D-glucose (E6). As estruturas de E2, E4 e E5 foram confirmadas por ESI-MS, e o isolamento dos glicosídeos E4 e E5 na sua forma deacilada ainda não havia sido descrito para microalgas. As análises da fração Pak indicaram a presença de uma α -glucana-(1 \rightarrow 4) ligada (amilose), comum às microalgas verdes e vermelhas. Acredita-se que o efeito promotor do crescimento vegetal apresentado pela fração E seja influenciado, em parte, pelos glicosídeos e monossacarídeos isolados deste extrato.

Palavras-chave: Microalgas. Glicosídeos. Polissacarídeos. Bioestimulante vegetal.

ABSTRACT

The present study was performed on chemical characterization of bioactive compounds extracted from green microalgae *Scenedesmus subspicatus* Chodat, as well as its biostimulant activity in plants. Microalgae was cultured in Guillard f/2 modified media for 10 days, and an aliquot of culture was collected on alternate days to determine the carbohydrate production profile during cell growth. It was observed that the greatest concentration occurred in stationary phase, and this was the best phase for culture discontinuance. Dried biomass was obtained after separation of culture media by centrifugation and freeze-drying. Material was then submitted to three sequential extractions, the first was aqueous at room temperature (10%, 1 h), the second was aqueous at temperature of 80°C (10%, 2 h), and third was alkaline (NaOH 0,5 M, 2 h) at temperature of 80°C. Aqueous extract (room temperature) was dialyzed in a membrane of 1 kDa cut off, and yielded fraction E (eluted) and R (retained). Aqueous extract (80°C) was submitted to ethanol precipitation, centrifugation and freeze-drying, yielding soluble fraction (SEwh) and insoluble (Pwh) in ethanol. Alkaline extract was neutralized and dialyzed, and also submitted to ethanol precipitation, centrifugation and freeze-drying, yielding soluble fraction (SEak) and insoluble (Pak) in ethanol. With these 6 fractions, colorimetric measurements of carbohydrates and proteins, as well as monosaccharide composition analysis were performed. Plant biostimulant activity in tomato seeds (*Solanum lycopersicum*) were performed for crude fraction E and Pak, at concentrations of 0,5, 1,0, 1,5 e 2,0 g/L for each sample, having water as control and ACADIAN™ Seaweed Extract (*Ascophyllum nodosum*) as commercial product for comparisons. Pak fraction showed statistically equal to control, therefore, it does not present biostimulant activity. Fraction E was capable to stimulate higher length and volume of hypocotyls, statistically equal to commercial product, showing up as a possible substitute. Chemical and spectroscopy analysis, as well as purification processes were deepened with E and Pak fractions. Fraction E was submitted to exclusion chromatography fractionation (Bio-Gel P-2), yielding 6 subfractions named E1 to E6. Of these, E2, E3, E4 and E5 were characterized by ¹H, ¹³C, ¹³C-DEPT, COSY, TOCSY, HSQC and HMBC NMR, and correspond to glycosides 6-sulfo- α -D-quinovopyranose-(1 \rightarrow 1)-glycerol (E2 and E3), α -D-galactopyranose-(1 \rightarrow 6)- β -D-galactopyranose-(1 \rightarrow 1)-glycerol (E4), β -D-galactopyranose-(1 \rightarrow 1)-glycerol (E5), and the monosaccharides D-mannose and D-glucose (E6). E2, E4 and E5 structures were confirmed by ESI-MS, and isolation of E4 and E5 glycosides in deacylated form had not yet been described for microalgae. Analysis of Pak fraction indicated the presence of an α -glucan-(1 \rightarrow 4) linked (amylose), common to green and red microalgae. It is believed that the plant growth stimulus presented by fraction E is influenced, in part, by glycosides and monosaccharides isolated from this extract.

Key-words: Microalgae. Glycosides. Polysaccharides. Plant biostimulant.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|-----------|---|
| FIGURA 1 | - FOTO DE <i>Scenedesmus subspicatus</i>6 |
| FIGURA 2 | - FOTO DE <i>Scenedesmus arcuatus</i> (A), <i>Scenedesmus dimorphus</i> (B), <i>Scenedesmus serratus</i> (C), <i>Scenedesmus apiculatus</i> (D), <i>Scenedesmus acuminatus</i> (E), <i>Scenedesmus ellipticus</i> (F) FONTE: ALGAEBASE (2013).7 |
| FIGURA 3 | - FLUXOGRAMA DE EXTRAÇÃO DOS COMPONENTES DA BIOMASSA DE <i>Scenedesmus subspicatus</i>20 |
| FIGURA 4 | - FOTOS TIRADAS DURANTE A REALIZAÇÃO DOS ENSAIOS. (A) CAIXAS GERBOX COM SEMENTES DE TOMATE, (B) CAIXAS DISPOSTAS EM B.O.D., (C) WIN RHIZO27 |
| FIGURA 5 | - ESQUEMA REPRESENTATIVO DA ESTRATÉGIA DE AÇÃO PARA DETERMINAÇÃO DA CURVA DE CRESCIMENTO E DOSAGEM DE CARBOIDRATOS NA BIOMASSA DE <i>Scenedesmus subspicatus</i>28 |
| FIGURA 6 | - CURVA DE CRESCIMENTO DA MICROALGA <i>Scenedesmus subspicatus</i>29 |
| FIGURA 7 | - PERFIL DE PRODUÇÃO DE CARBOIDRATOS NA BIOMASSA DE <i>Scenedesmus subspicatus</i>29 |
| FIGURA 8 | - ESPECTRO DE RMN DE ¹³ C DA FRAÇÃO E. TEMPERATURA: 50°C. SOLVENTE: D ₂ O. * SINAL REFERENTE AO PADRÃO INTERNO: ACETONA.35 |
| FIGURA 9 | - PERFIL DE ELUIÇÃO DA FRAÇÃO E POR CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO EM BIO-GEL P-235 |
| FIGURA 10 | - CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA FRAÇÃO E, E DAS SUBFRAÇÕES E1 A E6. FASE MÓVEL: ACETATO DE ETILA : ETANOL : ÁGUA (3:2:1). REVELADOR: ORCINOL36 |
| FIGURA 11 | - REGIÃO ANOMÉRICA DOS ESPECTROS DE ¹ H DA FRAÇÃO E, E SUBFRAÇÕES E2 A E6. TEMPERATURA: 50°C. SOLVENTE: D ₂ O37 |

| | | |
|-----------|---|----|
| FIGURA 12 | - ESPECTRO DE HSQC DA SUBFRAÇÃO E2, COM DESTAQUE PARA A REGIÃO ANOMÉRICA. TEMPERATURA: 50°C. SOLVENTE: D ₂ O | 38 |
| FIGURA 13 | - ESPECTRO DE COSY DA SUBFRAÇÃO E2. TEMPERATURA: 50°C. SOLVENTE: D ₂ O | 38 |
| FIGURA 14 | - REGIÃO ANOMÉRICA DO ESPECTRO DE TOCSY DA SUBFRAÇÃO E2. TEMPERATURA: 50°C. SOLVENTE: D ₂ O..... | 39 |
| FIGURA 15 | - ESPECTRO DE RMN DE ¹³ C DA SUBFRAÇÃO E2. TEMPERATURA: 50°C. SOLVENTE: D ₂ O | 40 |
| FIGURA 16 | - REGIÃO (78 a 45 ppm) DO ESPECTRO DE RMN DE ¹³ C-DEPT DA SUBFRAÇÃO E2. TEMPERATURA: 50°C. SOLVENTE: D ₂ O. | 40 |
| FIGURA 17 | - ESPECTRO DE HSQC DA SUBFRAÇÃO E2. TEMPERATURA: 50°C. SOLVENTE: D ₂ O | 41 |
| FIGURA 18 | - ESPECTRO DE HMBC DA SUBFRAÇÃO E2, COM DESTAQUE PARA A CORRELAÇÃO C ₁ '/H ₁ . TEMPERATURA: 50°C. SOLVENTE: D ₂ O | 42 |
| FIGURA 19 | - ESPECTROS DE ESI-MS EM MODO NEGATIVO DO ÍON PRINCIPAL SULFOQUINOVOSIL-GLICEROL (A) E DO ÍON FILHO CORRESPONDENTE AO FRAGMENTO DE SULFOQUINOVOSE (B) | 43 |
| FIGURA 20 | - ESTRUTURA PROPOSTA PARA A SUBFRAÇÃO E2: 6-SULFO- α -D-QUINOVOPIRANOSE-(1 \rightarrow 1)-GLICEROL..... | 44 |
| FIGURA 21 | - ESPECTROS DE ¹ H DAS SUBFRAÇÕES E2 (A) E E3 (B). TEMPERATURA: 50°C. SOLVENTE: D ₂ O | 45 |
| FIGURA 22 | - ESPECTRO DE HSQC DA SUBFRAÇÃO E4, COM DESTAQUE PARA A REGIÃO ANOMÉRICA. TEMPERATURA: 50°C. SOLVENTE: D ₂ O | 46 |
| FIGURA 23 | - REGIÃO ANOMÉRICA DO ESPECTRO DE TOCSY DA SUBFRAÇÃO E4. TEMPERATURA: 50°C. SOLVENTE: D ₂ O..... | 47 |
| FIGURA 24 | - ESPECTRO DE RMN DE ¹³ C DA SUBFRAÇÃO E4. TEMPERATURA: 50°C. SOLVENTE: D ₂ O | 47 |

| | | |
|-----------|--|----|
| FIGURA 25 | - ESPECTRO DE RMN DE ¹³ C-DEPT DA SUBFRAÇÃO E4. TEMPERATURA: 50°C. SOLVENTE: D ₂ O | 48 |
| FIGURA 26 | - ESPECTRO DE HSQC DA SUBFRAÇÃO E4. TEMPERATURA: 50°C. SOLVENTE: D ₂ O | 48 |
| FIGURA 27 | - ESPECTRO DE ESI-MS EM MODO POSITIVO DO ÍON PRINCIPAL DIGALACTOSIL-GLICEROL..... | 50 |
| FIGURA 28 | - ESTRUTURA PROPOSTA PARA SUBFRAÇÃO E4: α-D-GALACTOPIRANOSE-(1→6)-β-D-GALACTOPIRANOSE-(1→1)-GLICEROL..... | 50 |
| FIGURA 29 | - ESPECTRO DE HSQC DA SUBFRAÇÃO E5, COM DESTAQUE PARA A REGIÃO ANOMÉRICA. TEMPERATURA: 50°C. SOLVENTE: D ₂ O | 51 |
| FIGURA 30 | - REGIÃO ANOMÉRICA DO ESPECTRO DE TOCSY DA SUBFRAÇÃO E5. TEMPERATURA: 50°C. SOLVENTE: D ₂ O..... | 52 |
| FIGURA 31 | - ESPECTRO DE RMN DE ¹³ C DA SUBFRAÇÃO E5. TEMPERATURA: 50°C. SOLVENTE: D ₂ O | 53 |
| FIGURA 32 | - ESPECTRO DE RMN DE ¹³ C-DEPT DA SUBFRAÇÃO E5. TEMPERATURA: 50°C. SOLVENTE: D ₂ O | 53 |
| FIGURA 33 | - ESPECTRO DE HSQC DA SUBFRAÇÃO E5. TEMPERATURA: 50°C. SOLVENTE: D ₂ O | 54 |
| FIGURA 34 | - ESPECTRO DE HMBC DA SUBFRAÇÃO E5, COM DESTAQUE PARA A CORRELAÇÃO C ₁ '/H ₁ . TEMPERATURA: 50°C. SOLVENTE: D ₂ O | 55 |
| FIGURA 35 | - ESPECTROS DE ESI-MS EM MODO NEGATIVO DO ÍON PRINCIPAL MONOGALACTOSIL-GLICEROL | 56 |
| FIGURA 36 | - ESTRUTURA PROPOSTA PARA SUBFRAÇÃO E5: β-D-GALACTOPIRANOSE-(1→1)-GLICEROL..... | 57 |
| FIGURA 37 | - ESPECTRO DE RMN DE ¹ H DA SUBFRAÇÃO E6. TEMPERATURA: 50°C. SOLVENTE: D ₂ O | 58 |
| FIGURA 38 | - CCD DE PADRÕES DOS MONOSSACARÍDEOS L-RAMNOSE, D-MANOSE, D-GALACTOSE E D-GLUCOSE COM A SUBFRAÇÃO | |

E6. T: TODOS OS PADRÕES (L-RAMNOSE, D-MANOSE, D-GALACTOSE E D-GLUCOSE). FASE MÓVEL: ACETATO DE ETILA : ETANOL : ÁGUA (3:2:1). REVELADOR: ORCINOL.....58

- FIGURA 39 - ESPECTRO DE HSQC DA SUBFRAÇÃO E6. A: α -D-GLUCOSE, B: β -D-GLUCOSE, C: α -D-MANOSE, D: β -D-MANOSE. TEMPERATURA: 50°C. SOLVENTE: D₂O59
- FIGURA 40 - ESTRUTURA DOS MONOSSACARÍDEOS α -D-GLUCOSE (A), β -D-GLUCOSE (B), α -D-MANOSE (C) e β -D-MANOSE (D)59
- FIGURA 41 - PERFIL DE ELUIÇÃO POR HPSEC-MALLS-RID DA FRAÇÃO Pak61
- FIGURA 42 - ESPECTRO DE RMN DE ¹³C DA FRAÇÃO Pak. TEMPERATURA: 50°C. SOLVENTE: D₂O62
- FIGURA 43 - ESTRUTURA PROPOSTA PARA FRAÇÃO Pak: α -GLUCANA (1→4) LIGADA.....63
- FIGURA 44 - PERFIL DE ELUIÇÃO POR HPSEC-MALLS-RID DAS FRAÇÕES Pwh (A), Pwh-E30 (B) e Pwh-R30 (C)64
- FIGURA 45 - ESPECTRO DE RMN DE ¹³C DA FRAÇÃO Pwh. TEMPERATURA: 50°C. SOLVENTE: D₂O65

LISTA DE TABELAS

| | | | |
|----------|---|--|----|
| TABELA 1 | - | ESPÉCIES DE MICROALGAS, COMPOSTOS BIOATIVOS E ATIVIDADE BIOLÓGICA | 11 |
| TABELA 2 | - | COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTIVO GUILLARD f/2 MODIFICADO | 18 |
| TABELA 3 | - | RENDIMENTOS, DOSAGENS E COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES OBTIDAS DA BIOMASSA | 31 |
| TABELA 4 | - | NÚMERO DE SEMENTES GERMINADAS, COMPRIMENTO E VOLUME DOS HIPOCÓTILOS, A PARTIR DE TRATAMENTO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DA FRAÇÃO Pak | 32 |
| TABELA 5 | - | NÚMERO DE SEMENTES GERMINADAS, COMPRIMENTO E VOLUME DOS HIPOCÓTILOS, A PARTIR DE TRATAMENTO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DA FRAÇÃO E | 33 |
| TABELA 6 | - | DESLOCAMENTOS QUÍMICOS (ppm) DE ^1H E ^{13}C DAS SUBUNIDADES CONSTITUINTES DA SUBFRAÇÃO E2..... | 41 |
| TABELA 7 | - | DESLOCAMENTOS QUÍMICOS (ppm) DE ^1H E ^{13}C DA SUBFRAÇÃO E4 | 49 |
| TABELA 8 | - | DESLOCAMENTOS QUÍMICOS (ppm) DE ^1H E ^{13}C DA SUBFRAÇÃO E5 | 56 |
| TABELA 9 | - | DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DE ^{13}C (ppm) DA FRAÇÃO Pak | 62 |

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS, TERMOS E ABREVIATURAS

Símbolos e termos:

| | |
|----------------------|---|
| B.O.D. | - Biochemical Oxygen Demand |
| CV | - Coeficiente de Variação |
| Da | - Dalton |
| FAO | - Food and Agriculture Organization of the United Nations |
| ha | - Hectares |
| HIV-1 | - Vírus da imunodeficiência humana do tipo 1 |
| HSV-1 | - Vírus <i>Herpes simplex</i> tipo 1 |
| HSV-2 | - Vírus <i>Herpes simplex</i> tipo 2 |
| Hz | - Hertz |
| <i>J</i> | - Constante de acoplamento |
| <i>m/z</i> | - Relação massa/carga |
| PGR | - Plant Growth Regulators |
| ppm | - Partes por milhão |
| PUFA's | - Poly unsaturated fatty acids |
| UV | - Ultra violeta |
| <i>V_o</i> | - Volume morto |
| <i>V_t</i> | - Volume total |
| α | - Configuração anomérica alfa |
| β | - Configuração anomérica beta |
| θ_z | - Ângulo de transferência de polarização |

Reagentes e compostos:

| | |
|-----------------------------|--------------------------------------|
| BSA | - Soroalbumina Bovina |
| CD ₃ OD | - Metanol deuterado |
| CDCl ₃ | - Clorofórmio deuterado |
| D ₂ O | - Água deuterada |
| <i>d</i> ₆ -DMSO | - Hexadeutério Dimetil Sulfóxido |
| DEAE | - Dietilaminoetil |
| EDTA | - Ácido etilenodiamino tetra acético |
| Fuc | - Fucose |
| Gal | - Galactose |
| Glc | - Glucose |
| Man | - Manose |
| NaOH _(d) | - Hidróxido de sódio deuterado |
| NaOH | - Hidróxido de sódio |
| qsp | - quantidade suficiente para |
| Rha | - Ramnose |
| Rib | - Ribose |
| TFA | - Ácido trifluoracético |
| TRIS | - Tris-hidroximetilaminometano |
| Xyl | - Xilose |

Frações:

| | |
|---------|--|
| E | - Fração obtida por extração aquosa em temperatura ambiente eluída em membrana de 1 kDa |
| E1 | - Primeira subfração de E, eluída por cromatografia de exclusão |
| E2 | - Segunda subfração de E, eluída por cromatografia de exclusão |
| E3 | - Terceira subfração de E, eluída por cromatografia de exclusão |
| E4 | - Quarta subfração de E, eluída por cromatografia de exclusão |
| E5 | - Quinta subfração de E, eluída por cromatografia de exclusão |
| E6 | - Sexta subfração de E, eluída por cromatografia de exclusão |
| Pak | - Polissacarídeo obtido por extração alcalina a 80°C com NaOH 0,5 M |
| Pwh | - Polissacarídeo obtido por extração aquosa a 80°C |
| Pwh-E30 | - Polissacarídeo obtido por extração aquosa a 80°C eluído em membrana de 30 kDa |
| Pwh-R30 | - Polissacarídeo obtido por extração aquosa a 80°C retido em membrana de 30 kDa |
| R | - Fração obtida por extração aquosa em temperatura ambiente, retida em membrana de 1 kDa |
| SEak | - Fração obtida por extração alcalina solúvel no sobrenadante etanólico |
| SEwh | - Fração obtida por extração aquosa a 80°C solúvel no sobrenadante etanólico |
| E0,1 | - Fração eluída com 0,1 M de carbonato de amônio |

Métodos:

| | |
|------------------------|---|
| CCD | - Cromatografia em Camada Delgada |
| CG-EM | - Cromatografia Gasosa - Espectrometria de Massa |
| CID | - Collision Induced Dissociation |
| COSY | - Correlation Spectroscopy |
| DEPT | - Distortionless Enhancement by Polarization Transfer |
| ESI-MS | - Electrospray Ionization – Mass Spectrometry |
| HMBC | - Heteronuclear Multiple Bond Coherence |
| HPSEC-MALLS-RID | - Cromatografia de Exclusão Estérica de Alta Performance acoplada a Espalhamento de Luz Laser Multiângulos e Detector de Índice de Refração |
| HSQC | - Heteronuclear Single Quantum Coherence |
| MALDI-MS | - Ionização por Dessorção a Laser Assistida Por Matriz acoplada a Espectrometria de Massa |
| RMN de ¹³ C | - Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13 |
| RMN de ¹ H | - Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio-1 |
| TOCSY | - Total Correlation Spectroscopy |

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 1 |
| 1.1 OBJETIVO GERAL | 2 |
| 1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 2 |
| 2 REVISÃO DE LITERATURA | 4 |
| 2.1 MICROALGAS | 4 |
| 2.2 DIVISÃO CHLOROPHYTA..... | 5 |
| 2.3 GÊNERO <i>Scenedesmus</i> sp. | 6 |
| 2.4 COMPOSIÇÃO BIOQUÍMICA DE MICROALGAS, APLICAÇÕES E ATIVIDADES BIOLÓGICAS | 9 |
| 2.5 ATIVIDADE BIOESTIMULANTE VEGETAL | 12 |
| 3 MATERIAIS E MÉTODOS | 17 |
| 3.1 CONDIÇÕES DE CULTIVO E DETERMINAÇÃO DA CURVA DE CRESCIMENTO..... | 17 |
| 3.2 SEPARAÇÃO DA BIOMASSA..... | 18 |
| 3.3 DOSAGEM DE CARBOIDRATOS NA BIOMASSA | 18 |
| 3.4 EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS E COMPOSTOS DE BAIXA MASSA MOLECULAR DA BIOMASSA | 19 |
| 3.5 MÉTODOS ANALÍTICOS GERAIS PARA DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO E ESTRUTURA QUÍMICA DOS POLISSACARÍDEOS E COMPOSTOS DE BAIXA MASSA MOLECULAR OBTIDOS | 21 |
| 3.5.1 Métodos Químicos..... | 21 |
| 3.5.1.1 Dosagem de Carboidratos | 21 |
| 3.5.1.2 Dosagem de Proteínas..... | 21 |
| 3.5.1.3 Hidrólise Ácida Total, Redução e Acetilação | 22 |
| 3.5.2 Métodos Cromatográficos e Espectrométricos | 22 |
| 3.5.2.1 Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM)..... | 22 |
| 3.5.2.2 Ionização por Spray de Elétrons Acoplada a Espectrometria de Massas (ESI-MS – Electrospray Ionization – Mass Spectrometry)..... | 23 |
| 3.5.2.3 Cromatografia de Exclusão Estérica de Alta Performance (HPSEC) Acoplada a Espalhamento De Luz Laser Multiângulos (MALLS) e Detector de Índice de Refração (RID)..... | 23 |
| 3.5.2.4. Cromatografia de Exclusão..... | 24 |
| 3.5.2.5. Cromatografia em Camada Delgada (CCD) | 24 |

| | |
|---|-----------|
| 3.5.3 Ressonância Magnética Nuclear (RMN) | 25 |
| 3.6 PURIFICAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS POR ULTRAFILTRAÇÃO | 25 |
| 3.7 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE BIOESTIMULANTE VEGETAL | 26 |
| 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 28 |
| 4.1 DETERMINAÇÃO DA CURVA DE CRESCIMENTO E DOSAGENS NA BIOMASSA..... | 28 |
| 4.2 RENDIMENTOS E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS POLISSACARÍDEOS E COMPOSTOS DE BAIXA MASSA MOLECULAR OBTIDOS DA BIOMASSA | 31 |
| 4.3 ENSAIOS DE ATIVIDADE BIOESTIMULANTE VEGETAL | 32 |
| 4.4 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA FINA DAS FRAÇÕES OBTIDAS | 34 |
| 4.4.1 Caracterização Química da Fração E | 34 |
| 4.4.1.1 Subfração E2 | 37 |
| 4.4.1.2 Subfração E4 | 45 |
| 4.4.1.3 Subfração E5 | 51 |
| 4.4.1.4 Subfração E6 | 57 |
| 4.4.2 Caracterização Química da Fração Pak | 60 |
| 4.4.3 Caracterização Química da Fração Pwh..... | 63 |
| 5 CONCLUSÕES | 66 |
| REFERÊNCIAS | 67 |

1 INTRODUÇÃO

As microalgas são organismos unicelulares e fotossintéticos, que habitam ambientes marinhos ou dulciaquícolas. O termo microalga não possui valor taxonômico, e a classificação é dada de acordo com o tipo de pigmento, a natureza química dos produtos de reserva ou constituintes da parede celular, ou outros aspectos morfológicos (DERNER *et al.*, 2006). A divisão Chlorophyta compreende todas as algas verdes, cuja maioria é composta por microalgas, e é considerada a divisão que possui o maior número de gêneros e espécies de algas já identificadas (CANTER-LUND e LUND, 1995; LOURENÇO, 2006).

Estes micro-organismos são capazes de se adaptar rapidamente a diversas condições ambientais, e conseqüentemente, produzem uma variedade de compostos biologicamente ativos que têm sido explorados quanto ao seu potencial biotecnológico. Esta variabilidade de composição, aliada ao cultivo em larga escala e ao melhoramento genético, gera grande interesse para aplicações nas indústrias de alimentos, cosméticos, farmacêutica e biocombustíveis. Fibras, minerais, substâncias antioxidantes, ácidos graxos e polissacarídeos são alguns exemplos de compostos produzidos por microalgas (OLAIZOLA, 2003; PULZ e GROSS, 2004; DERNER *et al.*, 2006; SPOLAORE *et al.*, 2006; CARDOZO *et al.*, 2007; OHSE *et al.*, 2008; PLAZA, CIFUENTES e IBÁÑEZ, 2008; STENGEL, CONNAN e POPPER, 2011).

Já são descritas na literatura atividades hipocolesterolêmica, antibiótica, antioxidante, imunoestimulatória, antitumoral, antiviral e promotora do crescimento vegetal, as quais são provenientes do tratamento ou aplicação da própria biomassa seca de algas, ou de seus extratos ou compostos isolados (GUSTAFSON *et al.*, 1989; DVIR *et al.*, 2000; TANAKA *et al.*, 2001; HUHEIEL *et al.*, 2002; STIRK *et al.*, 2002; BANSAL e JASWAL, 2009; SUN *et al.*, 2009; SHAABAN, EI-SAADY e EI-SAYED, 2010; HOA *et al.*, 2011).

O aumento expressivo da produtividade e rentabilidade agrícola dos últimos anos tem sido realizado de maneira insustentável, prejudicando a saúde dos produtores rurais, dos consumidores dos produtos e afetando negativamente o meio ambiente próximo. Sabendo disto, torna-se de grande relevância a busca por produtos naturais que sejam capazes de manter a qualidade do ambiente, aumentar

a qualidade e a quantidade da produção e preservar a saúde dos produtores e consumidores.

As algas constituem um grande arsenal de moléculas bioativas, que atuam sinergicamente, estimulando diretamente o crescimento de plantas devido à grande concentração de hormônios do crescimento, ou indiretamente através da produção de outras moléculas que atuem como elicitores de vias de sinalização celular, as quais resultam em maior resistência da planta aos estresses bióticos e abióticos (MERCIER *et al.*, 2001; KLARZINSKY *et al.*, 2000, 2003; TARAKHOVSKAYA, MASLOV e SHISHOVA, 2007; CHANDÍA e MATSUHIRO, 2008; KHAN *et al.*, 2009; CRAIGIE, 2011; SHARMA *et al.*, 2013).

Desta forma, a utilização de extratos de algas em cultivos de plantas visa aumentar a produtividade de forma sustentável, rentável, e segura tanto à preservação do ambiente como à saúde dos produtores e consumidores. Paralelamente, a caracterização das moléculas responsáveis por essas atividades biológicas torna-se de grande importância, já que poucos são os estudos sobre a caracterização química e estrutural destas.

1.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral do presente trabalho foi avaliar a atividade bioestimulante vegetal do extrato aquoso isolado da microalga verde *Scenedesmus subspicatus* Chodat (Chlorophyta), e caracterizar estruturalmente os compostos presentes nesse extrato.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Foram estabelecidos os seguintes objetivos específicos:

- Extrair compostos de baixa e alta massa molecular a partir de tratamentos aquoso e alcalino na biomassa de microalga;

- Avaliar a capacidade dos extratos em promover o crescimento vegetal.
- Purificar e fracionar os extratos, por métodos cromatográficos;
- Determinar a estrutura química fina das frações obtidas, por métodos químicos, espectroscópicos e espectrométricos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 MICROALGAS

As microalgas são organismos microscópicos, unicelulares, fotossintéticos, de vida predominantemente aquática, podendo habitar ambientes marinhos ou dulciaquícolas (OLAIZOLA, 2003; DERNER *et al.*, 2006; OHSE *et al.*, 2008; PLAZA, CIFUENTES e IBAÑEZ, 2008; MATA, MARTINS e CAETANO, 2010). A capacidade fotossintética das microalgas as torna responsáveis por cerca de 60% da produção primária (matéria orgânica) nos ambientes onde vivem, e por isso podem ser consideradas a base da cadeia alimentar desses ecossistemas (LEE, 2008).

O termo microalga não possui valor taxonômico, e estes micro-organismos tem sido classificados de acordo com o tipo de pigmento, a natureza química dos produtos de reserva, os constituintes da parede celular, ou aspectos citológicos ou morfológicos tais como presença e estrutura dos flagelos, processo de formação do núcleo celular e constituição do envoltório dos cloroplastos (DERNER *et al.*, 2006).

O crescimento das microalgas depende de vários fatores, que podem ser bióticos ou abióticos. Os primeiros estão relacionados à própria taxa metabólica da espécie, com a influência de outros organismos no seu desenvolvimento (competição com outras algas), ou com a influência de patógenos (bactérias, fungos e vírus). Os segundos estão relacionados a fatores ambientais, tais como qualidade e intensidade da luz, temperatura, salinidade, disponibilidade de nutrientes, concentração de oxigênio e gás carbônico, pH do meio, entre outros (DERNER *et al.*, 2006; OHSE *et al.*, 2008, MATA, MARTINS e CAETANO, 2010). O cultivo para fins comerciais pode ser realizado em sistema aberto (tanque), sob condições naturais de iluminação e temperatura; ou em sistema fechado (fotobiorreatores), com todas as condições de cultivo passíveis de serem controladas, visando maior produtividade ou direcionamento para produção de produtos de interesse (DERNER *et al.*, 2006).

Segundo OHSE *et al.* (2008), o cultivo de microalgas apresenta a vantagem de ser considerado um sistema eficiente para armazenar energia solar na forma de compostos orgânicos obtidos pela fotossíntese. Esse armazenamento é muitas

vezes maior do que o obtido pelas plantas terrestres, e o rendimento em biomassa é também maior. Além disto, as microalgas apresentam rápido crescimento e são capazes de sobreviver em condições adversas, devido a sua estrutura unicelular (PLAZA, CIFUENTES e IBAÑEZ, 2008; MATA, MARTINS e CAETANO, 2010). O fato de serem unicelulares assegura uma biomassa com a mesma composição bioquímica, o que não ocorre em plantas, as quais apresentam compostos localizados em partes específicas como fruto, folhas, raízes, sementes (DERNER *et al.*, 2006).

Segundo DERNER *et al.* (2006), as microalgas podem apresentar dois tipos de estrutura celular: procariótica, representada pelas divisões Cyanophyta e Prochlorophyta; e eucariótica, representada pelas divisões Chlorophyta, Euglenophyta, Rhodophyta, Haptophyta, Heterokontophyta, Cryptophyta e Dinophyta. Tal diversidade se reflete na composição bioquímica das microalgas, que contém variedade ilimitada de produtos, os quais têm sido explorados em inúmeras pesquisas, e as torna potentes fontes de produtos químicos com aplicações nas indústrias de alimentos, cosmética, farmacêutica e de biocombustíveis (OLAIZOLA, 2003; OHSE *et al.*, 2008).

2.2 DIVISÃO CHLOROPHYTA

A divisão Chlorophyta compreende as algas verdes, e envolve formas unicelulares (maioria das espécies) e formas multicelulares, sendo considerada a divisão com maior número de gêneros e espécies de algas já descritas (CANTERLUND e LUND, 1995; LOURENÇO, 2006). Estas algas podem habitar ambientes marinhos, salobros ou de água doce, sendo este último o mais comum (cerca de 90% das espécies). Entre as microalgas desta divisão, a morfologia é bastante variada, compreendendo formas cocóides, monadais e pequenas colônias de células. Apresentam majoritariamente clorofilas *a* e *b*, e o principal produto de reserva é o amido. Além das clorofilas, os plastos também apresentam, em menor concentração, β -caroteno, luteína, violaxantina, zeaxantina, astaxantina, entre outros pigmentos (LOURENÇO, 2006).

As paredes celulares das clorófitas são constituídas de uma estrutura fibrilar de celulose inserida em uma matriz não fibrilar de hemicelulose, exceto nas espécies flageladas. Algumas espécies de macroalgas pertencentes à divisão Chlorophyta apresentam diferentes polímeros constituintes da parede celular, tais como xilanas (*Bryopsis* sp. e *Caulerpa* sp.) ou mananas (*Acetabularia* sp.) (LOURENÇO, 2006)

Várias clorófitas, tais como *Chlorella* sp., *Scenedesmus* sp. e *Tetraselmis* sp. são produzidas em larga escala para alimentação de organismos aquáticos, uma vez que apresentam rápido crescimento e alta tolerância a diferentes condições de cultivo. Outras, tais como *Dunaliella* sp. e *Haematococcus* sp., tem sido cultivadas a fim de extrair carotenoides, que são utilizados como corantes naturais (LOURENÇO, 2006).

As 5 principais classes de algas pertencentes à divisão Chlorophyta são Prasinophyceae, Ulvophyceae, Trebouxiophyceae, Chlorophyceae e Charophyceae (LOURENÇO, 2006).

2.3 GÊNERO *Scenedesmus* sp.

A espécie estudada neste trabalho (FIGURA 1), *Scenedesmus subspicatus*, pertence à classe Chlorophyceae, ordem Sphaeropleales e família Scenedesmaceae (ALGAE BASE, 2013).

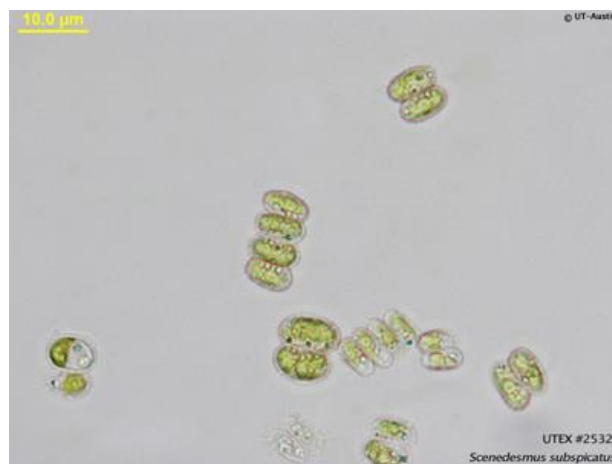


FIGURA 1 - FOTO DE *Scenedesmus subspicatus*
FONTE: UTEX (2013)

Segundo CANTER-LUND e LUND (1995), o gênero *Scenedesmus* compreende o maior número de espécies e é o mais comum entre as microalgas de água doce. Entretanto, BICUDO e MENEZES (2005) afirmam que todas as espécies de *Scenedesmus* que possuem espinhos nas células das extremidades das colônias deixaram de ter esta classificação e passaram a pertencer a um novo gênero, chamado *Desmodesmus*. Salvo estas contradições quanto à classificação, os gêneros *Scenedesmus* e *Desmodesmus* compreendem juntos, o maior número de espécies entre as microalgas de água doce, devendo exceder a 100 (BICUDO e MENEZES, 2005). Abaixo (FIGURA 2) são mostradas fotos de algumas espécies do gênero *Scenedesmus*.

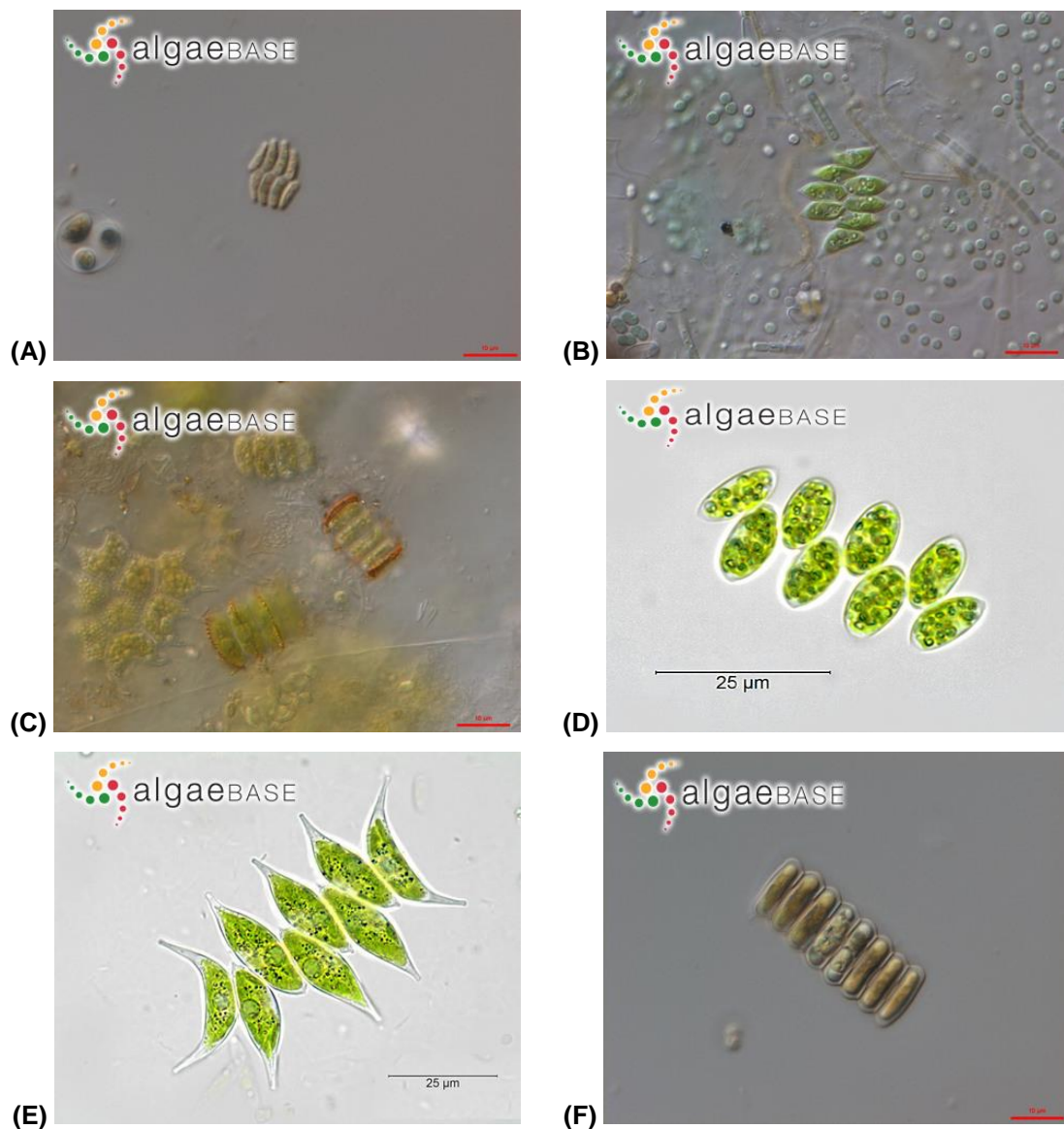


FIGURA 2 - FOTO DE *Scenedesmus arcuatus* (A), *Scenedesmus dimorphus* (B), *Scenedesmus serratus* (C), *Scenedesmus apiculatus* (D), *Scenedesmus acuminatus* (E), *Scenedesmus ellipticus* (F)
 FONTE: ALGAEBASE (2013).

As microalgas do gênero *Scenedesmus* são bastante utilizadas para fins de aquicultura, e também como suplementos alimentares em rações de animais terrestres (porcos e aves) devido ao seu alto teor de proteínas, que é comparável ao valor proteico do farelo de soja e da farinha de peixe, por exemplo (PULZ e GROSS, 2004; DERNER *et al.*, 2006; GOUVEIA *et al.*, 2008). Além disso, um estudo realizado com a microalga *Scenedesmus almeriensis* compara o alto teor dos carotenoides luteína e zeaxantina aos teores presentes em alimentos funcionais, sugerindo que a biomassa pode ser utilizada com fins nutracêuticos na indústria de alimentos (GRANADO-LORENCIO *et al.*, 2009).

Outros estudos mostram que os compostos de baixa e alta massa molecular liberados pelas células microalgais no meio de cultivo são capazes de ligar-se a metais, e sugere-se que essa capacidade deva-se principalmente à presença de ácidos urônicos na composição de exopolissacarídeos (LOMBARDI, HIDALGO e VIEIRA, 2005). Portanto, a biomassa microalgal pode ser utilizada para a detoxificação e tratamento de águas residuais, já que removem o excesso de nutrientes e outros contaminantes responsáveis pela eutrofização e poluição dos cursos de água. Sugere-se que essa capacidade de ligar-se a metais pesados é devido à presença de moléculas negativamente carregadas presentes na superfície das células (VOLTOLINA *et al.*, 1998).

Modificações nas condições de cultivo das microalgas podem direcionar um aumento da produção de lipídeos, conferindo à biomassa de *Scenedesmus* sp. a possibilidade de ser utilizada para produção de bioetanol e biodiesel (HO, CHEN, CHANG, 2011).

Recentemente, estudos realizados com a biomassa e os extratos de *Scenedesmus* sp. revelaram que estes apresentam efeito promotor do crescimento vegetal (MÓGOR *et al.*, 2011). Existem evidências de que as microalgas apresentam fito hormônios, amplamente descritos em plantas superiores, tais como as citocininas, auxinas, giberelinas e brassinosteróides, entretanto suas funções e modo de ação nas microalgas ainda não é bem descrito (MAZUR, KONOP e SYNAK, 2001; STIRK *et al.*, 2002, 2013; ÖRDÖG *et al.*, 2004).

2.4 COMPOSIÇÃO BIOQUÍMICA DE MICROALGAS, APLICAÇÕES E ATIVIDADES BIOLÓGICAS

As microalgas habitam ambientes complexos, com condições variadas e extremas de salinidade, temperatura e concentração de nutrientes, portanto, são capazes de adaptar-se rapidamente às condições ambientais, produzindo uma grande variedade de compostos biologicamente ativos (PLAZA, CIFUENTES e IBAÑEZ, 2008). De acordo com CARDOZO *et al.* (2007), as microalgas contêm fibras, minerais e substâncias antioxidantes, as quais são muito utilizadas na indústria alimentícia. Além disso, as microalgas contêm uma grande diversidade de metabólitos como: polissacarídeos, ácidos graxos poliinsaturados (AGPI) (exemplos: ômega-3, como ácido linolênico, araquidônico e docosahexanóico; e ômega 6, como o ácido linoleico), carotenoides e ficobilinas. Tais compostos são de interesse para as indústrias cosmética, alimentícia, química e farmacêutica (OLAIZOLA, 2003; PULZ e GROSS, 2004; SPOLAORE *et al.*, 2006; CARDOZO *et al.*, 2007; STENGEL, CONNAN e POPPER, 2011).

As pesquisas utilizando microalgas têm crescido ultimamente devido à biodiversidade e variabilidade da composição bioquímica destes seres vivos. Estas características podem ser aliadas ao melhoramento genético e ao cultivo em grande escala, possibilitando o comércio da biomassa de algumas espécies para uso na produção de suplementos alimentares ou para obtenção de produtos naturais (PULZ e GROSS, 2004; DERNER *et al.*, 2006).

Na área da saúde, as atividades biológicas específicas das microalgas podem variar dependendo da composição e estrutura química das moléculas constituintes. Já são descritas na literatura propriedades antibiótica, anti-inflamatória, antiviral e hipocolesterolêmica (BOROWITZKA, 1995; DERNER *et al.*, 2006). Estudos utilizando extratos da biomassa de diferentes espécies também são descritos, e algumas das atividades relatadas são antimicrobiana, antitumoral, e hemaglutinante (CHU *et al.*, 2004; ÖRDÖG *et al.*, 2004b; GHASEMI *et al.*, 2007; HOA *et al.*, 2011).

Microalgas vermelhas produzem polissacarídeos sulfatados de parede celular cujos principais monossacarídeos presentes são xilose, glucose e galactose (DVIR *et al.*, 2000; ARAD e LEVY-ONTMAN, 2010). Um estudo realizado por DVIR

et al. (2000) descreve a diminuição dos níveis séricos de colesteroquinina e colesterol em ratos, quando polissacarídeos sulfatados extraídos da microalga vermelha *Porphyridium cruentum* foram adicionados à ração dos animais. Além disto, o polissacarídeo também estimulou o aumento do comprimento do intestino delgado e cólon e a área do jejuno, assim como houve aumento do peso de massa fecal dos animais. A excreção de ácidos biliares também foi aumentada.

Uma glicoproteína com atividade antitumoral foi isolada da microalga verde *Chlorella vulgaris* por NODA *et al.* (1996). Através da metodologia MALDI-MS (dessorção/ionização por laser de matriz assistida acoplada a espectrometria de massas), foi determinado o peso molecular de 63100 Da. Este composto apresentava 66,9% de carboidratos e 35,2% de proteínas. A estrutura da porção glicídica formada por β -(1 \rightarrow 6)-galactopiranosose foi confirmada por metilação e ressonância magnética nuclear de ^{13}C . Os autores citam que uma sequência de 15 aminoácidos essenciais na região N-terminal era necessária para a atividade antitumoral.

Polissacarídeos sulfatados isolados da cianobactéria *Spirulina platensis* inibiram a replicação do vírus *Herpes simplex* (XUE *et al.*, 2002). GUSTAFSON *et al.* (1989) reportou uma nova classe de glicolipídeos contendo ácido sulfônico, com atividade antiviral contra HIV-1, os quais também foram isolados e purificados da *S. platensis*.

Além das propriedades biológicas, na indústria a maioria dos polissacarídeos utilizados como geleificantes e espessantes (ágar, alginatos, carragenanas) é obtida de macroalgas. Entretanto, algumas microalgas produzem polissacarídeos que também podem ter aplicações comerciais. Um exemplo é a microalga vermelha *Porphyridium cruentum*, que produz um exopolissacarídeo composto por galactanas sulfatadas, o qual pode substituir as carragenanas em muitas aplicações. Pensando neste aspecto, uma das vantagens do cultivo de microalgas sobre o de macroalgas é o rápido crescimento e a possibilidade de controlar as condições do cultivo (GOUVEIA *et al.*, 2008).

Outra vertente de estudo é a aplicação da biomassa microalgal na aquicultura, como alimentação direta ou indireta de peixes, crustáceos e moluscos. A biomassa de microalgas é composta por diversas moléculas consideradas nutracêuticas, tais como proteínas e ácidos graxos, as quais apresentam efeitos benéficos à saúde humana (ação hipocolesterolêmica, prevenção da hipertensão,

proteção contra falência renal, entre outros). A biomassa de microalga é comercializada com fins de nutrição humana na forma de tabletes, cápsulas, pós, ou extratos, e também pode ser incorporada em massas, chocolates e bebidas (PULZ e GROSS, 2004; SPOLAORE *et al.*, 2006). Outras aplicações das microalgas envolvem tratamento de águas residuais de processos industriais, detoxificação biológica, remoção de metais pesados, biorremediação do solo e produção de biocombustíveis (DERNER *et al.*, 2006; CARDOZO *et al.*, 2007; EL GAMAL, 2010).

A TABELA 1 resume algumas das atividades biológicas que os compostos isolados de microalgas, a própria biomassa ou diferentes extratos da mesma apresentam.

TABELA 1 - ESPÉCIES DE MICROALGAS, COMPOSTOS BIOATIVOS E ATIVIDADE BIOLÓGICA

| Espécie | Extrato/composto | Atividade | Referência |
|---|--|---|---|
| <i>Isochrysis galbana</i> <i>Thalassiosira fluviatilis</i> | Polissacarídeos | Imunoestimulatória | RIZZI, 2010 |
| <i>Scenedesmus sp.</i> | Biomassa Extrato aquoso | Bioestimulante vegetal | MÓGOR <i>et al.</i> , 2011 |
| <i>Chlorella pyrenoidosa</i> | Polissacarídeos Biomassa seca | Antitumoral Hipocolesterolêmico Imunoestimulatória | SHENG <i>et al.</i> , 2007 CHERNG e SHIH, 2005 SUÁREZ <i>et al.</i> , 2005 SUÁREZ <i>et al.</i> , 2006 |
| <i>Dunaliella salina</i> | Biomassa seca | Prevenção de hipercolesterolemia | BANSAL e JASWAL, 2009 |
| <i>Phaeodactylum tricornutum</i> | Galactolipídeos | Indução de apoptose em células cancerosas | ANDRIANASOLO <i>et al.</i> , 2008 |
| <i>Isochrysis galbana</i> | Extrato c/ acetona | Antibacteriano | BRUCE, DUFF e ANTIA, 1967 |
| <i>Spirulina platensis</i> | Lipídios | Antioxidante | RAMADAN, ASKER e IBRAHIM, 2008 |
| <i>Tolypothrix tjipanasenses</i> | Alcalóides | Antifúngico | BONJOUKLIAN <i>et al.</i> , 1991 |
| <i>Scenedesmus sp.</i> | Extrato aquoso | Promotor do crescimento e balanço nutricional vegetal | SHAABAN, EI-SAADY e EI-SAYED, 2010. |
| <i>Synechocystis sp.</i> | Extratos hexânico, etanólico e aquoso | Antimicrobiana e antioxidante | PLAZA <i>et al.</i> , 2010 |
| <i>Nostoc commune</i> | Diterpenóides | Antibacteriana | JAKI, ORJALA e STICHER, 1999 |
| <i>Porphyridium cruentum</i> | Polissacarídeos | Antioxidante | SUN <i>et al.</i> , 2009 |

(continua)

(conclusão)

| Espécie | Extrato/composto | Atividade | Referência |
|--|-------------------------------------|---|---|
| <i>Porphyridium</i> sp. | Polissacarídeos | Antiviral (HSV-1 e -2) Hipocolesterolêmica | HUHEIEL <i>et al.</i> , 2002 DVIR <i>et al.</i> , 2000 |
| <i>Porphyridium cruentum</i> <i>Phaeodactylum tricornutum</i> <i>Chlorella vulgaris</i> | Extratos etanólicos | Antioxidante | GARCIA e GUERRERO, 2008 |
| <i>Scenedesmus quadricauda</i> <i>Chlorella</i> sp. <i>Coenochloris</i> sp. <i>Chlorosarcina</i> sp. <i>Tetracystis</i> sp. <i>Chlamydomonas</i> sp. <i>Calothrix</i> sp. <i>Phormidium animale</i> | Extratos aquosos e etanólicos | Bioestimulante vegetal | STIRK <i>et al.</i> , 2002 |
| <i>Lyngbya lagerheimii</i> <i>Phormidium ténue</i> | Sulfoglicolipídeos | Antiviral | GUSTAFSON <i>et al.</i> , 1989 |
| <i>Desmococcus</i> sp. <i>Chlorella</i> sp. <i>Scenedesmus</i> sp. | Extratos aquosos | Antimicrobiana e antitumoral | ÖRDÖG <i>et al.</i> , 2004b |
| <i>Scytonema</i> sp. <i>Oscillatoria raoi</i> <i>Oscillatoria trichoides</i> <i>Oscillatoria limnetica</i> | Glicolipídeos Sulfoglicolipídeos | Antiviral | RESHEF <i>et al.</i> , 1997 |
| <i>Nostoc muscorum</i> <i>Anabaena floussaquae</i> <i>Chlorella vulgaris</i> <i>Oscillatoria</i> sp. <i>Spirulina platensis</i> <i>Anabaena oryzae</i> <i>Wollea saccata</i> <i>Nostoc humifusum</i> <i>Phormidium fragile</i> | Extratos aquosos | Antioxidante e antitumoral | SHANAB <i>et al.</i> , 2012 |
| <i>Ankistrodesmus gracilis</i> | Extrato com metanol/clorofórmio | Antitumoral | HOA <i>et al.</i> , 2011 |
| <i>Chlorella vulgaris</i> | Glicoproteínas | Imunoestimulatória | TANAKA <i>et al.</i> , 2001 |

2.5 ATIVIDADE BIOESTIMULANTE VEGETAL

A agricultura mundial expandiu consideravelmente na última década, como consequência do crescimento populacional e necessidade de suprimento de alimentos, e tem sido aprimorada com novas tecnologias que visam o aumento expressivo da produtividade (BARDIVIESSO *et al.*, 2011; FAO, 2013). Entretanto, a

agricultura convencional apresenta algumas características de insustentabilidade, tais como o uso abusivo de agrotóxicos, pesticidas, fertilizantes químicos e corretivos, resultando no transporte de vários compostos (xenobióticos) para áreas de drenagem e conseqüentemente levando à contaminação química e biológica dos mananciais hídricos (poluição química e eutrofização), e destruição da camada fértil do solo. Além de ser um potencial risco para o meio ambiente, a saúde dos trabalhadores rurais e dos consumidores desses produtos é também afetada (TANAKA *et al.*, 2003; SPINELLI *et al.*, 2009; BARDIVIESSO *et al.*, 2011).

Por outro lado, a agricultura orgânica também está crescendo ao redor do mundo, incluindo uma gama de procedimentos de manuseamento de terra, plantas e animais, nos quais pesticidas, fertilizantes minerais, preservantes sintéticos, produtos farmacêuticos, organismos geneticamente modificados, lodo de esgoto e irradiação são proibidos em todos os padrões orgânicos (FAO, 2013). É estimado que hoje existem 1,8 milhões de produtores orgânicos em 162 países. Em 2011 a área de terra sob manejo orgânico alcançou 37,2 milhões de ha, mais do que 11 milhões ha em 1999, e o valor total de alimentos e bebidas orgânicos vendidos foi de quase US\$ 63 bilhões (FAO, 2013).

O interesse na agricultura orgânica se deve à conservação dos recursos naturais, através da redução dos impactos negativos no ambiente, garantindo a produção de qualidade e quantidade adequadas, ao mesmo tempo em que proporciona uma melhor qualidade de vida aos agricultores e consumidores (MÓGOR *et al.*, 2008; RATHORE *et al.*, 2009; SPINELLI *et al.*, 2009; FAO, 2013). Desta forma, torna-se necessário desenvolver técnicas que permitam a melhora da produção orgânica, tais como o uso de bioestimulantes (TANAKA *et al.*, 2003; MÓGOR *et al.*, 2008; RATHORE *et al.*, 2009).

Bioestimulantes são definidos como substâncias naturais capazes de promover o crescimento e desenvolvimento vegetal, através de estímulos na divisão celular, diferenciação ou alongamento das células. Como consequência desses estímulos, observa-se maior crescimento das raízes e brotos, aumento da captação de nutrientes minerais e melhora da tolerância aos estresses bióticos e abióticos, o que conseqüentemente aumenta o rendimento das plantações e reduz a necessidade do uso de fertilizantes químicos (RUSSO e BERLYN, 1990; VIEIRA e CASTRO, 2001; FERRINI e NICESE, 2002; SPINELLI *et al.*, 2009; BARDIVIESSO *et al.*, 2011; CRAIGIE, 2011). Além disso, os bioestimulantes são biodegradáveis, não

tóxicos, não poluentes e não trazem riscos para humanos e animais (DHARGALKAR e PEREIRA, 2005; RATHORE *et al.*, 2009).

O bioestimulante que mais tem se destacado mundialmente é proveniente de macroalgas. Os extratos de algas são bioativos em baixas concentrações (1:1000 ou mais diluídos), e a sua eficácia é resultado de muitas observações feitas em campo, inicialmente nos anos de 1960 na Escócia, utilizando Maxicrop (extrato alcalino hidrolisado de *Ascophyllum nodosum* - Fucaceae) através de pulverização foliar. A partir dessa data, muitas outras pesquisas foram realizadas comprovando sua atividade bioestimulante (MÓGOR *et al.*, 2008; KHAN *et al.*, 2009; CRAIGIE, 2011).

CRAIGIE (2011) revisou muitos aspectos do uso das macroalgas na agricultura, e os extratos comerciais são provenientes principalmente dos gêneros de algas marrons como *Ascophyllum* spp., *Ecklonia* spp., *Turbinaria* spp., *Laminaria* spp., *Sargassum* spp., *Fucus* spp., da macroalga verde *Ulva lactuca*, e da macroalga vermelha *Kappaphycus alvarezii*. O ACADIAN™ Seaweed Extract, obtido da macroalga *Ascophyllum nodosum* (Canadá) e o Kelpak 66, obtido da macroalga *Ecklonia máxima* (África do Sul) são exemplos de produtos largamente utilizados (DHARGALKAR e PEREIRA, 2005). Para a obtenção dos extratos, podem ser realizados tratamentos aquosos, alcalinos ou ácidos, além de tratamento com alta pressão para rompimento das células e liberação das substâncias, ou crioprocessamento (KHAN *et al.*, 2009; CRAIGIE, 2011; SHARMA *et al.*, 2013). A técnica de aplicação mais usada é a pulverização foliar, e os nutrientes são absorvidos pelas folhas através das lenticelas, hidatódios e estômatos em 10 ou 15 minutos após a aplicação (DHARGALKAR e PEREIRA, 2005).

Estudos realizados sugerem que o principal efeito bioestimulante causado é devido à presença, nesses organismos, dos hormônios de crescimento vegetal, amplamente descritos para as plantas superiores. Os hormônios vegetais são encontrados principalmente em macroalgas marrons, como as dos gêneros *Sargassum*, *Macrocystis*, *Fucus*, *Ascophyllum* e *Laminaria*, embora já tenha sido isolado em algas vermelhas do gênero *Porphyra*. Estes compostos são conhecidos por afetar o metabolismo celular em plantas tratadas, controlando a divisão celular, o desenvolvimento de brotos, folhas, raízes, e o retardamento da senescência. Além dos hormônios vegetais, existem outros compostos chamados de elicitores, pois estimulam vias de transdução de sinal levando à produção de diversas substâncias

relacionadas com a resposta da planta à ação de patógenos, ou então que regulam os estresses ambientais como estresse hídrico, de salinidade e de temperatura. São representados principalmente pelos polissacarídeos, oligossacarídeos, peptídeos, lipídeos, e betaínas (MERCIER *et al.*, 2001; KLARZINSKY *et al.*, 2000, 2003; TARAKHOVSKAYA, MASLOV e SHISHOVA, 2007; CHANDÍA e MATSUHIRO, 2008; KHAN *et al.*, 2009; CRAIGIE, 2011; SHARMA *et al.*, 2013). Provavelmente os compostos presentes nos extratos atuam sinergicamente, entretanto seu modo de ação não é bem descrito (KHAN *et al.*, 2009; RATHORE *et al.*, 2009).

Oligossacarídeos e polissacarídeos, tais como glucanas (1→3)-(1→6)-ligadas, laminaranas, fucanas sulfatadas, carragenanas, xiloglucanas, oligogalacturonídeos e derivados de quitina obtidos de algas atuam como elicitores de uma variedade de vias de transdução de sinal nas plantas. A presença destes compostos pode levar à biossíntese de moléculas antimicrobianas (ácido salicílico e ácido jasmônico), fitoalexinas, expressão de enzimas como quitinases e glucanases, entre outras, as quais reforçam os sistemas de defesa da planta contra os estresses bióticos (KLARZYNSKI *et al.*, 2000, 2003; MERCIER *et al.*, 2001; AZIZ *et al.*, 2003; CLUZET *et al.*, 2004; CHANDÍA e MATSUHIRO, 2008; PAULERT *et al.*, 2009).

Além dos hormônios e dos compostos elicitores, os extratos de algas contém grande quantidade de elementos como potássio (K), fósforo (P), enxofre (S), ferro (Fe), nitrogênio (N), magnésio (Mg), zinco (Zn), cálcio (Ca), cobre (Cu), manganês (Mn), e aminoácidos e vitaminas, os quais são essenciais para o crescimento e desenvolvimento das plantas (RUSSO e BERLYN, 1990; VIEIRA e CASTRO, 2001; FERRINI e NICESE, 2002; RATHORE *et al.*, 2009; SPINELLI *et al.*, 2009; CRAIGIE, 2011; KOYAMA *et al.*, 2012).

O grande desafio da indústria bioestimulante é manter a disponibilidade de fonte de material, no caso, as macroalgas, que deveriam ser renováveis e sustentáveis (CRAIGIE, 2011). Nesse contexto, as microalgas surgem como uma boa alternativa, já que tem inúmeras vantagens como cultivo em larga escala (sistemas fechados – fotobiorreatores, sistemas semi-abertos ou sistemas abertos), rápido crescimento e condições controladas de pH, temperatura, conteúdo de nutrientes e iluminação (CHEN, 1996; FUENTES *et al.*, 1999; HARUN *et al.*, 2010).

STIRK *et al.* (2002) detectaram atividades de citocininas e auxinas (hormônios vegetais que promovem a diferenciação e crescimento celular, e retardam a senescência) em microalgas dos filos Chlorophyta e Cyanophyta. Em

outro trabalho do mesmo grupo (STIRK *et al.*, 2013) foram detectados giberelinas e brassinosteróides em 24 gêneros de microalgas das classes Chlorophyceae, Trebouxiophyceae, Ulvophyceae e Charophyceae. ÖRDÖG *et al.* (2004a) identificaram e quantificaram conteúdo de citocininas em nove microalgas dos gêneros *Protococcus*, *Chlorella* e *Scenedesmus*. MOLNÁR e ÖRDÖG (2005) avaliaram os efeitos benéficos de compostos extracelulares extraídos de microalgas e cianobactérias em tecidos de ervilha, tabaco e beterraba. Sugere-se que estes compostos, ainda não identificados pelos autores, tenham sido liberados no meio de cultivo em alguma etapa do desenvolvimento microalgal.

SHAABAN (2001) avaliou o efeito do extrato aquoso celular da microalga verde *Chlorella vulgaris* como pulverizante foliar, em termos de status de nutrientes, crescimento e rendimento de plantas de trigo. Foi observado aumento do peso seco das plantas. Resultados semelhantes foram obtidos tratando o trigo com biomassa de *Scenedesmus* sp. (SHAABAN, EL-SAADY e EL-SAYED, 2010).

Em 2010, foi iniciado um trabalho pelos integrantes do laboratório de carboidratos de microalgas (Departamento de Bioquímica – UFPR), com o objetivo de identificar a atividade bioestimulante vegetal de extratos de microalgas. Foi feito um screening com várias espécies utilizadas em larga escala para fins de aquicultura (alimentação de organismos marinhos tais como mariscos e moluscos). Dentre as espécies estudadas estavam as microalgas marinhas *Isochrysis* sp., *Nannochloropsis* sp., *Pavlova* sp. e *Tetraselmis* sp., e as dulciaquícolas *Chlorella* sp., *Spirulina* sp. e *Scenedesmus* sp. Destas, a biomassa ressuspendida e o extrato aquoso bruto da espécie *Scenedesmus* sp. apresentaram potencial atividade bioestimulante vegetal. Os resultados obtidos com este trabalho resultaram no depósito de uma patente (MÓGOR *et al.*, 2011).

Entretanto, existem poucos estudos na literatura detalhando a estrutura química dos compostos bioativos obtidos de microalgas.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 CONDIÇÕES DE CULTIVO E DETERMINAÇÃO DA CURVA DE CRESCIMENTO

A espécie *Scenedesmus subspicatus* Chodat foi cultivada pelo Grupo Integrado de Aquicultura e Meio Ambiente, da Universidade Federal do Paraná (GIA-UFPR), localizado no Campus de Ciências Agrárias. A cepa foi mantida no Setor de Microalgas do Laboratório de Pesquisa em Organismos Aquáticos (LAPOA), em sala com temperatura de 17°C, e iluminação constante (potência 5500 LUX). Conforme o procedimento padrão do laboratório, as microalgas foram cultivadas em meio Guillard f/2 modificado (TABELA 2), e o repique das células foi realizado em meio estéril para Erlenmeyers de 250 mL, sendo, após dois dias transferidas para Erlenmeyers de 2 L. Nesta condição, receberam luz e aeração constantes, permanecendo em crescimento por dez dias.

O crescimento microalgal foi avaliado através da contagem de células em hematocítmetro de Neubauer de 0,1 mm de profundidade, conforme protocolo estabelecido por VEGA e VOLTOLINA (2007), adaptado.

TABELA 2 - COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTIVO GUILLARD f/2 MODIFICADO

| Composição de 1 L de solução estoque | Composição de cada solução | Para 1,8 L de meio de cultura autoclavável |
|--|--|--|
| - | 75 g NaNO ₃ 5 g Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O H ₂ O qsp 1 L | 1,8 mL solução de nitrato e fosfato |
| 50 g tiamina (vitamina B1) 0,5 g biotina (vitamina H) 0,5 g cianocobalamina (vit. B12) H ₂ O qsp 1 L | 2 mL solução estoque de vitaminas H ₂ O qsp 1 L | 1,8 mL solução de vitaminas |
| 1 g CuSO ₄ .5H ₂ O 2,2 g ZnSO ₄ .7H ₂ O 1 g CoCl ₂ .6H ₂ O 0,63 g Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O H ₂ O qsp 1 L | 5,5 g EDTA 4 g FeCl ₃ .6H ₂ O 0,18 g MnCl ₂ .4H ₂ O 10 mL solução estoque de metais H ₂ O qsp 1 L | 1,8 mL solução de metais |
| - | 90 g TRIS 60 mL HCl H ₂ O qsp 1 L | 9 mL solução de TRIS |

3.2 SEPARAÇÃO DA BIOMASSA

O cultivo foi submetido a centrifugação (centrífuga HIMAC CR 21E - HITACHI) a 12000 x g, por 20 minutos a 15°C. O pellet celular foi recuperado, congelado e liofilizado. A biomassa seca foi pesada e armazenada à temperatura de -20°C até a realização das análises.

3.3 DOSAGEM DE CARBOIDRATOS NA BIOMASSA

A fim de obter um perfil da produção de carboidratos pela biomassa, foram coletadas alíquotas de cultivo em diferentes dias durante o crescimento. Devido à baixa concentração de células nos primeiros dias de cultivo, foi utilizado o método de

ultrafiltração em membrana de 0,45 µm para separar a biomassa do meio de cultivo. Nos demais dias, a biomassa foi separada por centrifugação.

Para a dosagem de açúcares totais na biomassa seca, 10 a 20 mg de biomassa seca foram submetidos a hidrólise ácida com 1 mL de ácido sulfúrico 80% (v/v) durante 20 h. Durante a adição do ácido e nas 4 h seguintes, os frascos de amostra foram mantidos em contato com gelo para evitar a carbonização das amostras, permanecendo após esse período em temperatura ambiente. Após hidrólise, foram adicionados 10 mL de água deionizada à amostra, e o material diluído contendo os carboidratos foi utilizado para quantificação através da metodologia de DUBOIS *et al.* (1956) (LOURENÇO, 2006).

3.4 EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS E COMPOSTOS DE BAIXA MASSA MOLECULAR DA BIOMASSA

A partir de 6,88 g de biomassa seca de *Scenedesmus subspicatus*, foi realizada uma extração aquosa na concentração 10% (p/v), sob agitação mecânica e temperatura ambiente, por 1 hora. A amostra foi centrifugada (centrífuga HIMAC CR 21E - HITACHI) a 18800 x g, por 15 minutos, a 10°C. A partir da biomassa residual, este processo foi repetido, e os dois extratos foram reunidos e submetidos a diálise em sistema fechado (membrana *cut off* de 1 kDa) contra água ultrapura (MilliQ), com 4 trocas de água a cada 2 horas, gerando as frações E (eluída) e R (retida).

O resíduo aquoso foi submetido à nova extração aquosa, na concentração 10% (p/v), sob agitação mecânica e temperatura de 80°C, por 2 horas. Em seguida o material foi centrifugado a 18800 x g, por 15 minutos, a 10°C. O extrato foi tratado com 3 volumes de etanol, seguido de centrifugação, diálise do sobrenadante etanólico e do precipitado contra água destilada (membrana *cut off* de 6 a 8 kDa) e liofilização. O precipitado etanólico foi denominado de Pwh, e o sobrenadante etanólico denominado SEwh.

O segundo resíduo aquoso foi submetido a uma extração alcalina, com NaOH 0,5 M, a 80°C, por 2 horas. Após extração, o material foi centrifugado a 18800 x g, por 15 minutos, a 10°C. O resíduo final de biomassa foi neutralizado e liofilizado.

O extrato alcalino foi neutralizado com solução de HCl a 10%, e dialisado contra água destilada (membrana *cut off* de 6 a 8 kDa), sendo em seguida precipitado com 3 volumes de etanol. O material foi centrifugado e ambas as frações etanólicas foram liofilizadas, gerando um precipitado denominado Pak, e um sobrenadante etanólico denominado SEak.

Uma estratégia pode ser observada na FIGURA 3.

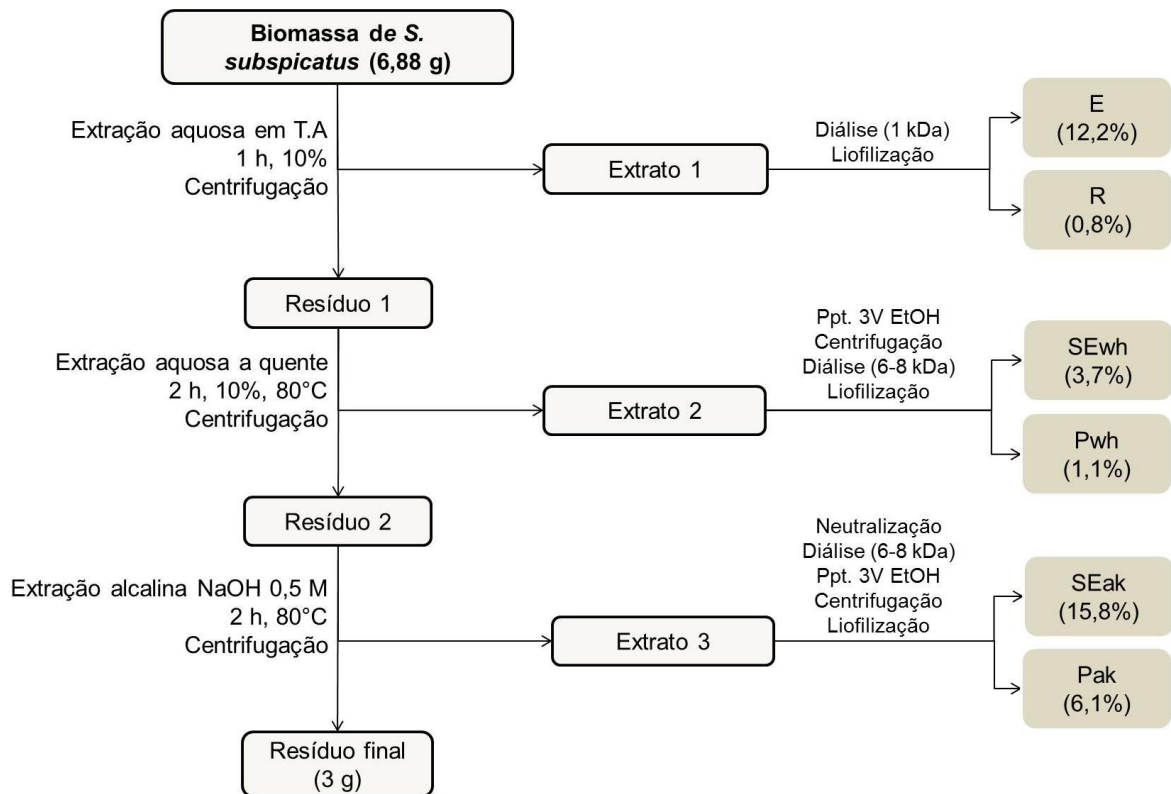


FIGURA 3 - FLUXOGRAMA DE EXTRAÇÃO DOS COMPONENTES DA BIOMASSA DE *Scenedesmus subspicatus*

3.5 MÉTODOS ANALÍTICOS GERAIS PARA DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO E ESTRUTURA QUÍMICA DOS POLISSACARÍDEOS E COMPOSTOS DE BAIXA MASSA MOLECULAR OBTIDOS

Para determinação da composição e estrutura química das frações isoladas da biomassa microalgal, foram utilizados métodos químicos, cromatográficos, espectrométricos e espectroscópicos, os quais são detalhados a seguir.

3.5.1 Métodos Químicos

3.5.1.1 Dosagem de Carboidratos

A dosagem de carboidratos totais foi realizada pelo método do fenol-sulfúrico (DUBOIS *et al.*, 1956), utilizando padrão de glucose de concentração inicial 1 mg/mL, a partir do qual foram realizadas diluições para realização da curva de calibração. A leitura de absorvância foi realizada a 490 nm.

3.5.1.2 Dosagem de Proteínas

A dosagem de proteínas totais foi realizada de acordo com o método de LOWRY *et al.* (1951), utilizando padrão de soro albumina bovina (BSA) na concentração inicial de 1 mg/mL, a partir da qual foram realizadas diluições para realização da curva de calibração. A leitura da absorvância foi realizada a 660 nm.

3.5.1.3 Hidrólise Ácida Total, Redução e Acetilação

Para determinação da composição monossacarídica, as frações foram submetidas à hidrólise ácida total. Primeiramente, aproximadamente 1,5 mg de amostra foi solubilizado em 500 uL de TFA 2 M, e mantida em estufa a 100°C por 2 horas (RIZZI, 2010). Após hidrólise, o TFA foi evaporado totalmente em atmosfera de nitrogênio ou ar comprimido, os monossacarídeos resultantes foram ressolubilizados em 500 uL de água destilada, e posteriormente reduzidos com boroidreto de sódio (NaBH_4), onde permaneceram por 14 horas em temperatura ambiente. Na sequência, o pH foi neutralizado com ácido acético diluído. O material foi seco em atmosfera de nitrogênio ou ar comprimido, e submetido a co-destilação com metanol (3 vezes), a fim de retirar o sal formado durante a neutralização. Em seguida, a amostra seca foi acetilada com 500 uL de anidrido acético, por 1 hora a 120°C em estufa. A reação de acetilação foi interrompida com 0,5 mL de água destilada, e cada amostra foi transferida para um tubo de ensaio contendo 1 mL de clorofórmio. A mistura foi agitada e a fase aquosa descartada. Em seguida 1 mL de bicarbonato de sódio saturado foi adicionado aos tubos, a fim de neutralizar o anidrido acético. A mistura foi agitada e a fase aquosa foi descartada, sendo esse procedimento repetido até alcançar $\text{pH} \geq 7$. Para retirar o sal formado na neutralização, 1 mL de água foi adicionado aos tubos. A mistura foi agitada e a fase aquosa foi descartada. Esse procedimento foi repetido até alcançar pH entre 5 e 7. A fase clorofórmica (que contém os acetatos de alditóis) foi evaporada. Os acetatos de alditóis produzidos nesta etapa foram analisados por CG-EM.

3.5.2 Métodos Cromatográficos e Espectrométricos

3.5.2.1 Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM)

Para essas análises foi utilizado cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massa Saturn, modelo 4000, equipado com uma coluna capilar de

sílica fundida (30 m X 0,25 mm d.i.) modelo DB-225. A temperatura inicial foi de 50°C, aumentando gradativamente (fluxo de 40°C por minuto) até atingir 220°C, temperatura de análise dos acetatos de alditóis. A temperatura permaneceu constante durante o tempo de análise (25 minutos). O gás de arraste utilizado foi o hélio, com fluxo de 1 mL/min. As áreas dos picos de interesse foram determinadas por integração com o software Varian WS, e os fragmentos de massa foram obtidos por impacto de elétrons a 70 meV, cujos valores podem ser visualizados no espectro de massas. A análise foi feita por meio da comparação entre os tempos de retenção e perfis de fragmentação das amostras e dos padrões.

3.5.2.2 Ionização por Spray de Elétrons Acoplada a Espectrometria de Massas (ESI-MS – Electrospray Ionization – Mass Spectrometry)

Os experimentos de ionização por spray de elétrons (ESI) foram realizados em espectrômetro LTQ XL Linear Ion Trap Mass Spectrometer (Thermo Fischer Scientific Inc.). A aquisição e processamento de dados foram feitos utilizando o programa XCalibur 2.1. Para realização das análises, as amostras foram diluídas em metanol (10 µg/mL) e injetadas no espectrômetro através de seringa acoplada a bomba, em um fluxo de aproximadamente 5 µL/min. O gás de nebulização utilizado foi o nitrogênio (N₂).

3.5.2.3 Cromatografia de Exclusão Estérica de Alta Performance (HPSEC) Acoplada a Espalhamento De Luz Laser Multiângulos (MALLS) e Detector de Índice de Refração (RID)

As análises de homogeneidade dos polissacarídeos obtidos foram realizadas utilizando o cromatógrafo de exclusão estérica de alta performance (HPSEC) WATERS, equipado com um detector de índice de refração (RID) WATERS modelo 2410, e com detector de espalhamento de luz laser em multiângulos (MALLS) WAYTT TECHNOLOGY, modelo DAWN DSP com 18 canais, acoplados em série.

Foram utilizadas quatro colunas de gel permeação WATERS em série, com limites de exclusão de 7×10^6 , 4×10^5 , 8×10^4 e 5×10^3 g.mol⁻¹. Para a análise, utilizou-se 1 mg de amostra diluída em 1 mL de eluente, o qual é composto por nitrito de sódio (NaNO₂ 0,1 M) e azida de sódio (NaN₃ 200 ppm) dissolvidos em água MilliQ. Esta mistura foi filtrada em membranas Millipore (acetato de celulose) de 0,22 µm antes da realização das análises. A análise foi realizada utilizando-se injeções de 100 µL de solução com fluxo de 0,6 mL/min. Os dados foram analisados através do programa ASTRA.

3.5.2.4. Cromatografia de Exclusão

A cromatografia de exclusão foi utilizada com o objetivo de fracionar o extrato E para facilitar a caracterização química dos seus componentes. O fracionamento foi realizado em coluna de Bio-Gel P-2 (105 cm x 1,5 cm d.i., limite de exclusão de 100-1800 Da), volume morto (V_0) 40,8 mL e volume total (V_t) 170 mL, fluxo de 0,3 mL/min, sendo a água utilizada como eluente. Os eluatos foram coletados em tubos de ensaio utilizando coletor de frações (Pharmacia Biotech) programado por volume (3 mL por tubo). A detecção de carboidratos foi feita pelo método de DUBOIS *et al.* (1956), e a detecção de proteínas foi realizada em leitor de microplacas (Epoch – Biotech) a 280 nm. Os eluatos também foram monitorados por cromatografia em camada delgada (CCD), a fim de unir as subfrações semelhantes.

3.5.2.5. Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

A cromatografia em camada delgada foi realizada em cromatoplaça revestida com sílica gel (Merck), sendo utilizadas duas fases móveis. Uma mistura característica para separação de carboidratos formada por acetato de etila, ácido acético, propanol e água (4:2:2:1), e outra formada por acetato de etila, etanol e água (3:2:1). Foi utilizada uma solução de ácido sulfúrico (H₂SO₄ concentrado/etanol

1:9) como revelador universal e uma solução de orcinol (0,4%) em ácido sulfúrico e etanol (1:19) como revelador para carboidratos (LEWIS e SMITH, 1969).

3.5.3 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

As análises de ressonância magnética nuclear 1D e 2D foram realizadas em espectrômetro de modelo Bruker Avance DRX400 (Bruker Germany), em frequências base de 400 MHz (^1H) e 100 MHz (^{13}C), e em espectrômetro de modelo Bruker Avance III 600 (Bruker Germany), com frequências base de 150 MHz (^{13}C) e 600 MHz (^1H). As temperaturas de análise variaram de 30 a 50°C. As amostras foram solubilizadas em D_2O 99%, a uma concentração de 80 mg/mL para as análises de ^{13}C e 20 mg/mL para as análises de ^1H , e colocadas em tubos de 5 mm de diâmetro externo. Os deslocamentos químicos, expressos em ppm, foram determinados utilizando acetona como padrão interno, tanto para as análises de ^{13}C (30,20 ppm) como para ^1H (2,224 ppm).

Os experimentos de ^{13}C -DEPT (*Distortionless Enhancement by Polarization Transfer*) apresentados neste trabalho foram realizados em um ângulo de transferência de polarização θ_z de 135°C, o qual permite a visualização de carbonos metilênicos (CH_2) na forma de sinais em fase negativa em relação à linha de base, enquanto os sinais referentes aos CH e CH_3 permanecem em fase positiva (BREITMAIER e VOELTER, 1990).

Para as análises de ^1H , COSY (*Correlation Spectroscopy*), HSQC (*Heteronuclear Single Quantum Coherence*), TOCSY (*Total Correlation Spectroscopy*) e HMBC (*Heteronuclear Multiple Bond Coherence*) as amostras foram previamente submetidas a um processo de solubilização em D_2O 99%, congelamento e liofilização, por 3 vezes, para troca dos hidrogênios das hidroxilas por deutério e conseqüente diminuição da intensidade do sinal relativo ao hidrogênio ligado ao oxigênio, que prejudicaria a qualidade do espectro obtido.

3.6 PURIFICAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS POR ULTRAFILTRAÇÃO

Para purificação dos polissacarídeos bruto presentes na fração Pwh, foi realizada uma ultrafiltração em membrana de celulose, com limite de exclusão de 30 kDa. O sistema de filtração utilizado foi o cilindro SARTORIUS (modelo 16249), acoplado com cilindro de nitrogênio. A amostra Pwh foi solubilizada em água (1 mg/mL), e as frações geradas após a separação foram liofilizadas e analisadas por HPSEC-MALLS-RID.

3.7 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE BIOESTIMULANTE VEGETAL

Os bioensaios foram realizados no Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo da UFPR – Setor de Ciências Agrárias. Sementes de tomate (*Solanum lycopersicum*) cultivar Santa Clara foram distribuídas em caixas GERBOX (FIGURA 4), forradas com papel filtro. Os filtros foram previamente embebidos em soluções aquosas de amostra E ou Pak nas concentrações 0,5; 1; 1,5 e 2 g/L, produto comercial na concentração 1 g/L (*Ascophyllum nodosum* – ACADIAN™ Seaweed Extract, Nova Scotia, Canadá), ou controle (água). No total foram 6 tipos de tratamentos, e cada tratamento foi feito em quadruplicata. Após 10 dias em câmara vertical B.O.D., com temperatura média de 25°C e desprovidos de luz, foram avaliados o número de sementes germinadas, o comprimento (cm) e o volume (cm³) dos hipocótilos, através do programa computacional Win Rhizo[®] acoplado a Scanner LA1600 (Regent Instruments Inc., Canadá).

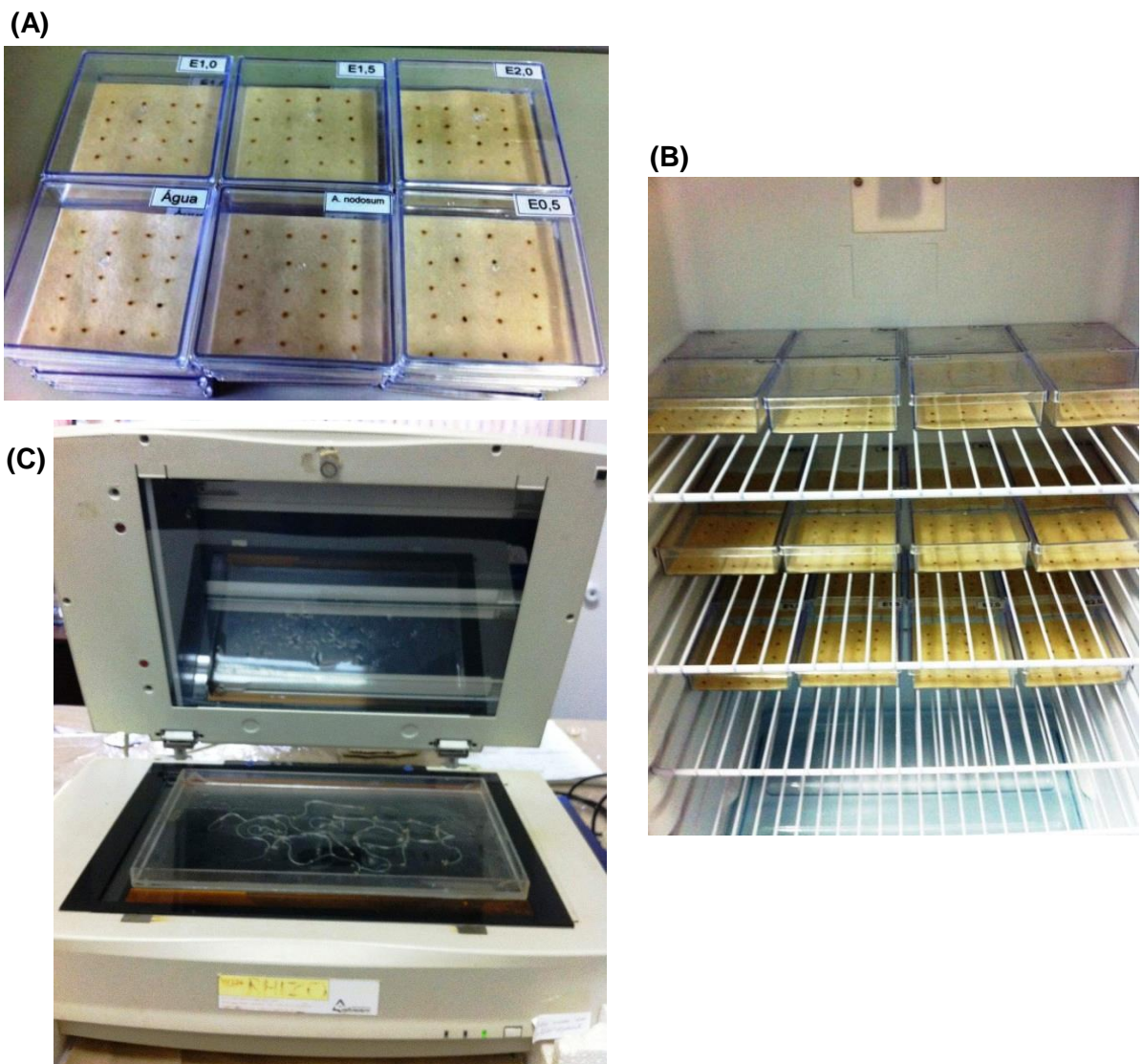


FIGURA 4 - FOTOS TIRADAS DURANTE A REALIZAÇÃO DOS ENSAIOS. (A) CAIXAS GERBOX COM SEMENTES DE TOMATE, (B) CAIXAS DISPOSTAS EM B.O.D., (C) WIN RHIZO

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 DETERMINAÇÃO DA CURVA DE CRESCIMENTO E DOSAGENS NA BIOMASSA

A partir da descrição dos itens 3.1 a 3.3, foi apresentada uma estratégia de ação (FIGURA 5), no qual foram cultivados 5 Erlenmeyers de 2 L, sendo o primeiro reservado para a determinação da curva de crescimento, e os demais submetidos à centrifugação e liofilização da biomassa de diferentes dias de cultivo, a fim de avaliar a produção de carboidratos pela microalga durante o crescimento.

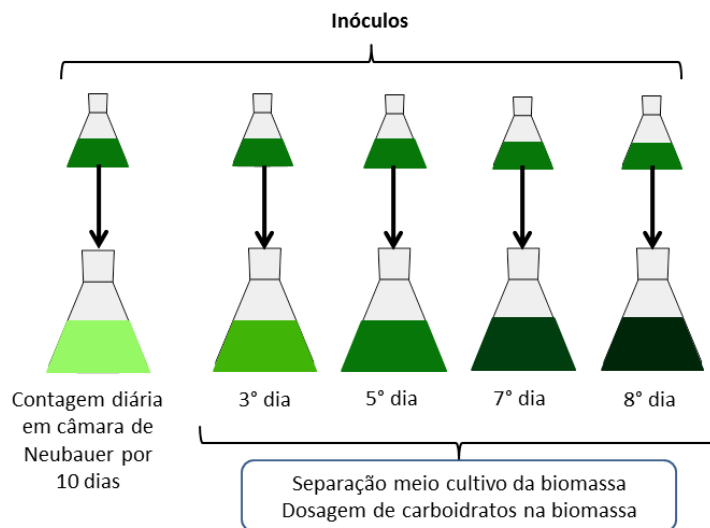


FIGURA 5 - ESQUEMA REPRESENTATIVO DA ESTRATÉGIA DE AÇÃO PARA DETERMINAÇÃO DA CURVA DE CRESCIMENTO E DOSAGEM DE CARBOIDRATOS NA BIOMASSA DE *Scenedesmus subspicatus*

De acordo com VEGA e VOLTOLINA (2007), as microalgas se reproduzem da mesma forma que bactérias e leveduras, majoritariamente por divisão binária, apresentando uma curva de crescimento com 6 fases: fase lag ou de adaptação, fase de aceleração, fase exponencial ou logarítmica, fase de desaceleração, fase estacionária e fase de morte celular. A curva de crescimento é apresentada na FIGURA 6, onde pode-se observar claramente a fase lag, logarítmica e estacionária.

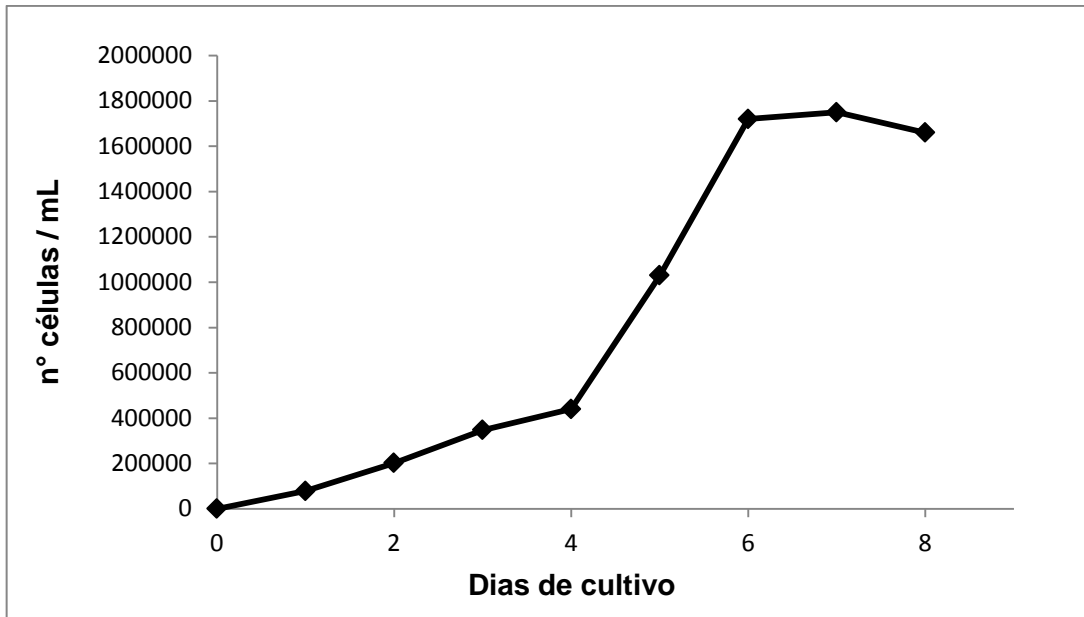


FIGURA 6 - CURVA DE CRESCIMENTO DA MICROALGA *Scenedesmus subspicatus*

A maior porcentagem de carboidratos na biomassa foi encontrada no oitavo dia de cultivo, que corresponde à fase estacionária de crescimento (FIGURA 7). Segundo RIZZI (2010), para a microalga verde *Tetraselmis gracilis*, o teor de carboidratos também foi maior durante a fase estacionária. O conteúdo de carboidratos na biomassa de microalgas é bastante variável, uma vez que depende das condições de cultivo. As concentrações de carboidratos e lipídios geralmente aumentam em relação à de proteínas, quando se avança da fase exponencial para a estacionária (GRANUM, KIRKVOLD e MYKLESTAD, 2002; VEGA, ESQUIVEL e VOLTOLINA, 2007).

Produção de carboidratos pela biomassa

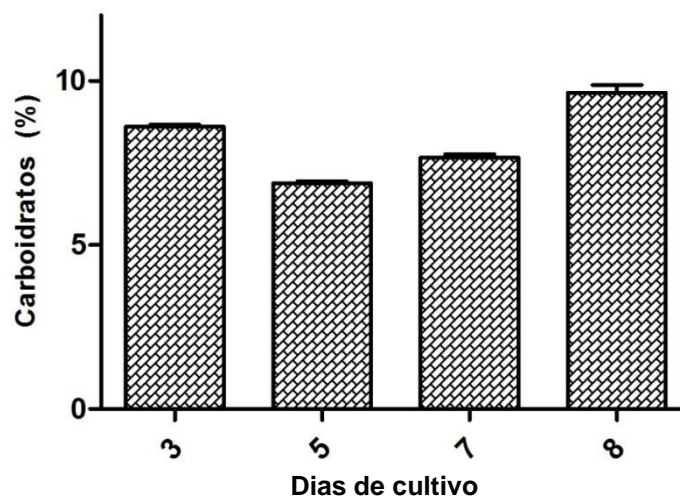


FIGURA 7 - PERFIL DE PRODUÇÃO DE CARBOIDRATOS NA BIOMASSA DE *Scenedesmus subspicatus*

Segundo BERTOLDI, SANT'ANNA e OLIVEIRA (2008), a composição química da biomassa não é determinada somente pela natureza da espécie, mas depende de fatores como intensidade da luz, temperatura, pH do meio, concentração de nutrientes e agitação. A microalga *Chlorella* sp., por exemplo, quando cultivada em temperatura entre 25 e 35°C, produz mais carboidratos do que proteínas (OGBONNA e TANAKA, 1996). Segundo GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ e BALLESTEROS (2012), é possível aumentar a produção de carboidratos utilizando diferentes temperaturas no mesmo cultivo. Por exemplo, manter uma temperatura de 20°C durante a fase exponencial de crescimento até a depleção das fontes de nitrogênio, e em seguida reduzi-la drasticamente para 14°C, aumenta a produção de açúcares. A temperatura utilizada nos cultivos de *Scenedesmus* deste trabalho foi de aproximadamente 17°C. Desta forma, uma das alternativas a ser testada a fim de obter maior teor de carboidratos em *S. subspicatus* seria o aumento da temperatura de cultivo, ou sua variação entre as diferentes fases de crescimento.

Outro fator relacionado ao acúmulo de carboidratos na biomassa é o fornecimento de certos nutrientes no meio de cultivo. Tem sido observado em alguns trabalhos, que a diminuição da concentração de nitrogênio estaria relacionada ao aumento dos teores de lipídeos e carboidratos, observado nas diatomáceas *Achnanthes brevipes* e *Tetraselmis* spp. (GLADUE e MAXEY, 1994; GUERRINI *et al.*, 2000). Segundo GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ e BALLESTEROS (2012), o fornecimento de nitrogênio também influencia na composição química de exopolissacarídeos. Por exemplo, a microalga *Chlorella* sp. pode apresentar diferenças nas proporções de açúcares neutros, ácidos urônicos e ácidos aminados, sob diferentes fontes de nitrogênio (CHENG *et al.*, 2011).

O fornecimento adequado de iluminação também é um fator relevante para a produção de carboidratos. Sabe-se que o excesso de luz pode causar inibição do crescimento dos microrganismos. Nessas condições, foi observado que a síntese de carboidratos diminui devido ao direcionamento das fontes de carbono para a síntese de triglicerídeos (GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ e BALLESTEROS, 2012).

São necessários mais experimentos a fim de determinar se as células de *S. subspicatus* liberam moléculas para o meio de cultivo em alguma etapa do crescimento, o que poderia estar subestimando as dosagens de carboidratos realizadas na biomassa. Também é de grande importância a realização de testes modificando as condições de cultivo, tais como fornecimento de algum nutriente,

temperatura e intensidade luminosa, a fim de obter maior produtividade de carboidratos.

4.2 RENDIMENTOS E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS POLISSACARÍDEOS E COMPOSTOS DE BAIXA MASSA MOLECULAR OBTIDOS DA BIOMASSA

Após o cultivo das microalgas e obtenção da biomassa seca, como descrito nos itens 3.1 e 3.2, foram realizados dois tipos de extrações aquosas e uma extração alcalina (item 3.4). Foram obtidas 6 frações da biomassa microalgal, cujos rendimentos foram calculados a partir da biomassa seca inicial (FIGURA 3), e elas foram submetidas a dosagens colorimétricas de proteínas e carboidratos, além da análise de composição monossacarídica, como mostra a TABELA 3.

TABELA 3 - RENDIMENTOS, DOSAGENS E COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES OBTIDAS DA BIOMASSA

| Frações | Rendimento (%) | Carboidratos ^a (%) | Proteínas ^b (%) | Monossacarídeos (mol %) ^c | | | | | | |
|-------------|----------------|-------------------------------|----------------------------|--------------------------------------|-----|------|-----|------|------|------|
| | | | | Rha | Fuc | Rib | Xyl | Man | Gal | Glc |
| R | 0,8 | 32,6 | 55,1 | 3,7 | 8,5 | 2,9 | 9,9 | 29,3 | 21,2 | 24,2 |
| E | 12,2 | 22,6 | 19,9 | - | - | - | - | 6,0 | 75,5 | 18,4 |
| SEwh | 3,7 | 29,4 | 63,9 | - | - | 10,9 | - | 35,4 | 16,0 | 37,5 |
| Pwh | 1,1 | 50,4 | 49,5 | 2,1 | 2,2 | 6,1 | 2,3 | 21,9 | 5,8 | 59,3 |
| SEak | 15,8 | 8,2 | 94,3 | - | 4,8 | - | 7,1 | 22,1 | 17,3 | 48,4 |
| Pak | 6,1 | 24,4 | 71,9 | 1,3 | Tr | Tr | Tr | 5,1 | 4,0 | 88,0 |

Determinado pelos métodos: DUBOIS *et al.* (1956)^a; LOWRY *et al.* (1951)^b. ^c Monossacarídeos quantificados em mols % na forma de acetato de alditóis, por CG-EM. Tr: traços (menor que 1 mol%).

A extração aquosa em temperatura ambiente visou isolar uma mistura de compostos de baixa massa molecular, os quais apresentam atividade bioestimulante vegetal (MÓGOR *et al.*, 2011). A fração E, eluída após diálise do extrato aquoso em membrana de 1 kDa, apresentou um bom rendimento, e teores de carboidratos e proteínas semelhantes. Galactose é o seu principal monossacarídeo, seguido de glucose e manose. Em relação à fração R, ela apresentou majoritariamente manose, glucose e galactose como componentes monossacarídicos. Dado o baixo rendimento desta fração, a continuidade dos estudos foi priorizada para a fração E.

A fração SEwh (sobrenadante obtido após precipitação etanólica do extrato aquoso) apresentou maior teor de proteínas em relação ao teor de carboidratos, sendo a glucose e a manose seus principais monossacarídeos. Já a fração Pwh apresentou teores muito semelhantes de carboidratos e proteínas, e glucose e manose como monossacarídeos majoritários.

A fração SEak (sobrenadante obtido após precipitação etanólica do extrato alcalino) é majoritariamente proteica, porém nos 8,2 % de carboidratos presentes foi possível observar que apresenta como constituinte majoritário glucose e manose. Já a fração Pak, cujo teor de proteínas também é alto, apresentou na composição monossacarídica principalmente glucose. Pak foi selecionada para posteriores estudos de caracterização estrutural e atividade biológica.

4.3 ENSAIOS DE ATIVIDADE BIOESTIMULANTE VEGETAL

O teste de atividade bioestimulante vegetal foi realizado para as frações E (compostos de baixa massa molecular) e Pak (polissacarídeo), sendo os resultados apresentados na sequência.

A fração Pak (0,5, 1,0, 1,5 e 2,0 g/L) foi avaliada quanto à sua capacidade em estimular o crescimento vegetal, no que diz respeito ao aumento do número de sementes germinadas, o comprimento (cm) e o volume (cm³) dos hipocótilos de tomate. Os resultados são apresentados na TABELA 4.

TABELA 4 - NÚMERO DE SEMENTES GERMINADAS, COMPRIMENTO E VOLUME DOS HIPOCÓTILOS, A PARTIR DE TRATAMENTO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DA FRAÇÃO Pak

| Tratamentos | Concentração (g/L) | Germinação | Comprimento (cm) | Volume (cm ³) |
|--|--------------------|------------|------------------|---------------------------|
| Controle | - | 18,50 a | 320,02 b | 0,67 b |
| Pak | 0,5 | 17,25 a | 294,60 b | 0,61 b |
| Pak | 1,0 | 16,75 a | 280,80 b | 0,59 b |
| Pak | 1,5 | 16,25 a | 306,53 b | 0,66 b |
| Pak | 2,0 | 16,75 a | 295,47 b | 0,63 b |
| Produto comercial (<i>A. nodosum</i>) | 1,0 | 16,25 a | 367,23 a** | 0,79 a** |
| CV (%) | - | 10,65 | 6,07 | 7,39 |

As letras nas colunas indicam diferenças de 1% (**) de probabilidade pelo teste de Tukey.

Como pode ser observado, não houve diferença estatística entre os tratamentos no que diz respeito à germinação das sementes. Quanto ao comprimento e o volume, não houve diferença entre as concentrações de amostra e o controle (água). Portanto, concluiu-se que a fração Pak não apresenta atividade bioestimulante vegetal.

Em relação à fração E, estudos prévios com a biomassa de *S. subspicatus* ressuspensa em água e o extrato aquoso bruto anterior à diálise, mostraram que os extratos possuíam atividade bioestimulante vegetal (MÓGOR, 2011). Devido a isso, foi priorizada a determinação de atividade bioestimulante dessa fração.

Foram avaliados o número de sementes germinadas, o comprimento (cm) e o volume (cm³) dos hipocótilos, como mostra a TABELA 5.

TABELA 5 - NÚMERO DE SEMENTES GERMINADAS, COMPRIMENTO E VOLUME DOS HIPOCÓTILOS, A PARTIR DE TRATAMENTO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DA FRAÇÃO E

| Tratamentos | Concentração (g/L) | Germinação | Comprimento (cm) | Volume (cm ³) |
|--|--------------------|------------|------------------|---------------------------|
| Controle | - | 17,75 a | 274,22 c** | 0,73 b* |
| E | 0,5 | 17,50 a | 319,12 ab | 0,88 ab |
| E | 1,0 | 16,75 a | 326,41 ab | 0,87 ab |
| E | 1,5 | 15,75 a | 311,10 b | 0,97 a |
| E | 2,0 | 16,75 a | 325,42 ab | 0,93 a |
| Produto comercial (<i>A. nodosum</i>) | 1,0 | 16,50 a | 346,64 a | 0,92 ab |
| CV (%) | - | 10,38 | 4,92 | 9,94 |

As letras nas colunas indicam diferenças de 1% (**) e 5% (*) de probabilidade pelo teste de Tukey.

Observa-se que não houve diferença estatística entre as amostras, o controle (água) e o produto comercial em relação ao número de sementes germinadas, indicando que a germinação não é afetada pela aplicação de extratos bioestimulantes.

Já em relação ao comprimento dos hipocótilos, todas as concentrações de E mostraram efeito promotor do crescimento vegetal, e as concentrações 0,5, 1,0 e 2,0 g/L tem efeito estatisticamente igual ao do produto comercial.

Além disto, o efeito da fração E no volume dos hipocótilos foi marcadamente maior, especialmente as concentrações 1,5 e 2,0 g/L, que excederam estatisticamente o efeito do produto comercial.

Uma das possibilidades para o efeito bioestimulante é a presença de reguladores do crescimento vegetal (PGR), tais como moléculas com atividade parecida com a dos hormônios vegetais citocinina e auxina, além de outras substâncias orgânicas não identificadas, como descrito por STIRK *et al.* (2002), ÖRDÖG *et al.* (2004a) e MOLNÁR e ÖRDÖG (2005). É interessante ressaltar que o estímulo do crescimento vegetal ocorreu quando as sementes foram tratadas com moléculas de baixa massa molecular (fração E), enquanto o tratamento com o polissacarídeo (fração Pak) não foi efetivo. Os produtos comerciais à base de macroalgas possuem vários compostos, tais como polissacarídeos (laminarana, alginatos, fucoidanas), minerais, oligoelementos, hormônios de crescimento (citocininas, auxinas, betaínas, giberelinas), esteróis, taninos, proteínas, entre outros. Muitos destes compostos não têm seu modo de ação bem descrito, e por isso acredita-se que atuem em sinergia (KHAN *et al.*, 2009; CRAIGIE, 2011).

As frações E e Pak foram submetidas a técnicas de purificação, análises espectrométricas e espectroscópicas, a fim de determinar a estrutura química fina, com destaque para a fração E que apresentou um bom efeito promotor do crescimento vegetal.

4.4 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA FINA DAS FRAÇÕES OBTIDAS

4.4.1 Caracterização Química da Fração E

De acordo com os resultados de composição monossacarídica, a fração E apresentou galactose (75%), glucose (18%) e manose (6%) como constituintes. O espectro de RMN de ^{13}C da fração bruta E (FIGURA 8) mostra dois sinais principais na região anomérica em 102,9 ppm e 98,2 ppm, sugerindo a presença de açúcares com anomeridade β e α , respectivamente. Os sinais entre 76 ppm e 50 ppm são referentes aos demais carbonos dos monossacarídeos. Em 61,3 ppm sugere-se a presença de C-6 livre de unidades monossacarídicas. Outros sinais de menor intensidade foram observados na região de 29 a 15 ppm, que podem ser referentes a outros componentes do extrato, tais como aminoácidos.

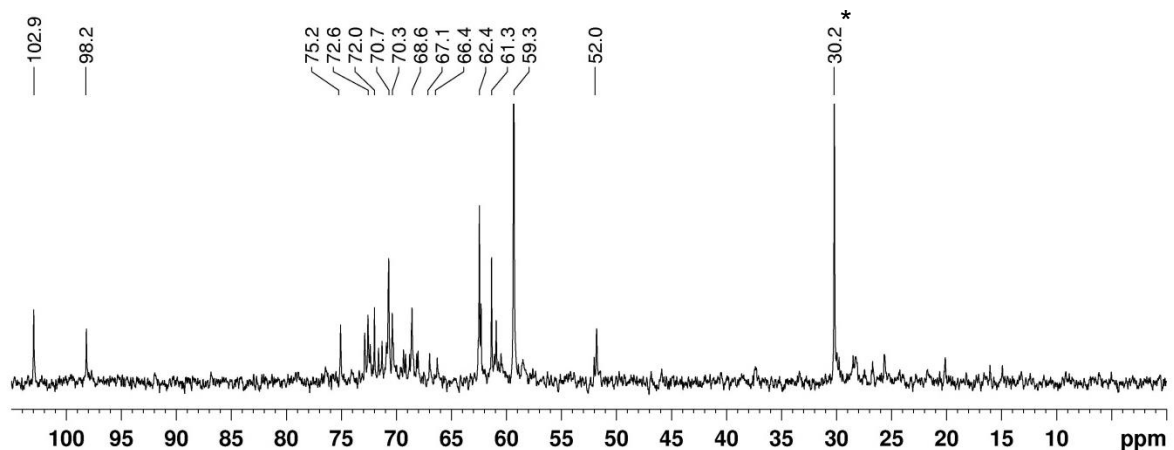


FIGURA 8 - ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DA FRAÇÃO E. TEMPERATURA: 50°C . SOLVENTE: D_2O . * SINAL REFERENTE AO PADRÃO INTERNO: ACETONA.

A fração E foi submetida à cromatografia de exclusão em Bio-Gel P-2 para facilitar a caracterização química de seus componentes. Foi aplicado na coluna 100 mg da fração E dissolvida em 1 mL de água destilada. A separação foi monitorada por dosagem de carboidratos (DUBOIS *et al.*, 1956), proteínas por leitura em espectrofotômetro UV (280 nm), e por CCD (FIGURAS 9 e 10). Foram identificadas 6 subfrações, denominadas E1, E2, E3, E4, E5 e E6.

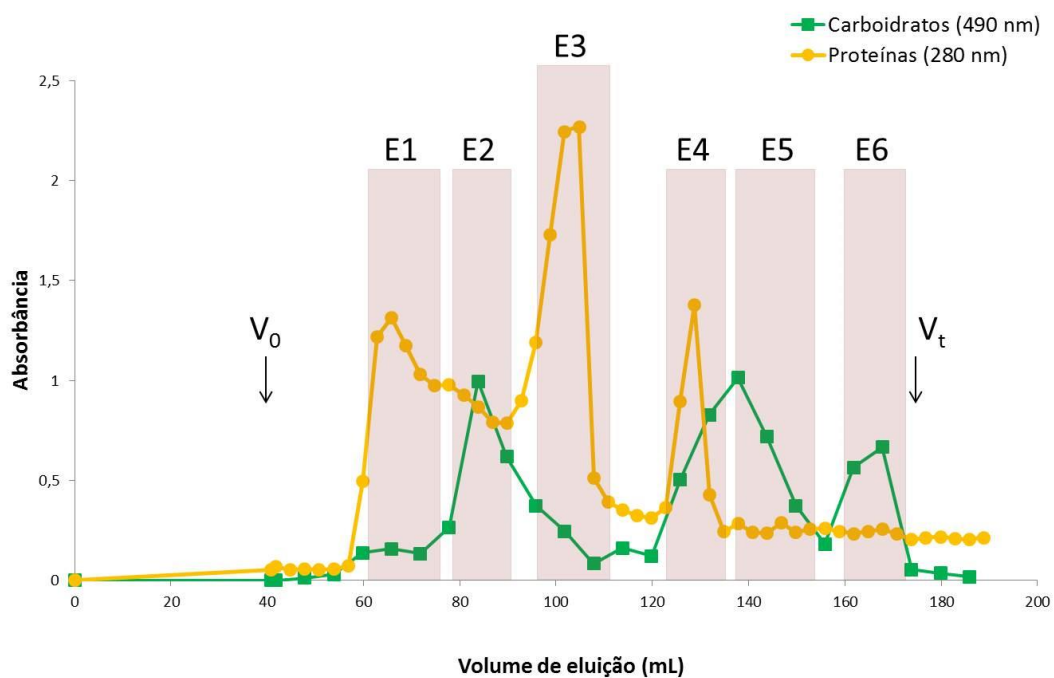


FIGURA 9 - PERFIL DE ELUIÇÃO DA FRAÇÃO E POR CROMATOLOGRAFIA DE EXCLUSÃO EM BIO-GEL P-2

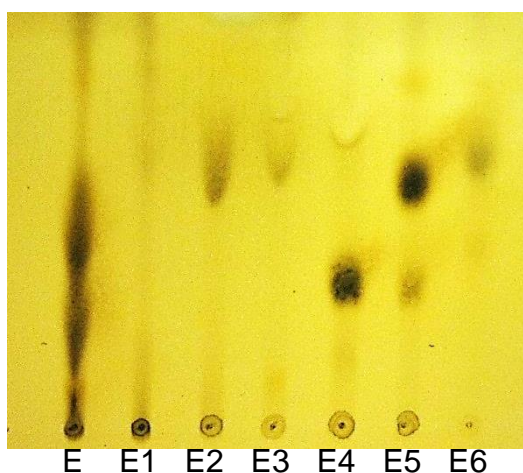


FIGURA 10 - CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA FRAÇÃO E, E DAS SUBFRAÇÕES E1 A E6. FASE MÓVEL: ACETATO DE ETILA : ETANOL : ÁGUA (3:2:1). REVELADOR: ORCINOL

O material recuperado da coluna rendeu aproximadamente 70,1 mg, dentre estes E1 representa 13,8%, E2 25%, E3 21,3%, E4 14,8%, E5 19,8%, e E6 5,1%. A determinação da estrutura química dos compostos E2, E3, E4, E5 e E6 foi realizada através de experimentos de RMN unidimensionais (RMN de ^1H , ^{13}C e ^{13}C -DEPT) e bidimensionais (COSY, TOCSY, HSQC e HMBC).

A FIGURA 11 mostra a região anomérica dos espectros de ^1H das frações E, E2, E3, E4, E5 e E6. Inicialmente pode-se observar que os sinais anoméricos das subfrações estão presentes no extrato E, de acordo com os rendimentos em relação a E. Na subfração E2 é observado apenas um sinal em 4,89 ppm, cuja constante de acoplamento é 3,7 Hz, sugerindo anomericidade α . A subfração E3 é bem semelhante a E2 (4,88 ppm, $J_{1,2} = 3,6$ Hz), sugerindo também anomericidade α . Já a subfração E4 apresentou dois sinais, em 4,42 ppm com $J_{1,2} = 7,9$ Hz e 4,98 ppm com $J_{1,2} = 2,9$ Hz, sugerindo anomericidade β e α . A subfração E5 apresentou apenas um sinal em 4,40 ppm, com constante de acoplamento de 7,7 Hz, sugerindo anomericidade β . A separação por Bio-Gel P-2 foi eficiente, visto que as subfrações E2 e E3 concentraram um pico somente, a subfração E4 apresentou dois picos, E5 apresentou majoritariamente um pico com deslocamento diferente de E4, e a subfração E6 que corresponde a apenas 5% de E, aparece discretamente no espectro do extrato E.

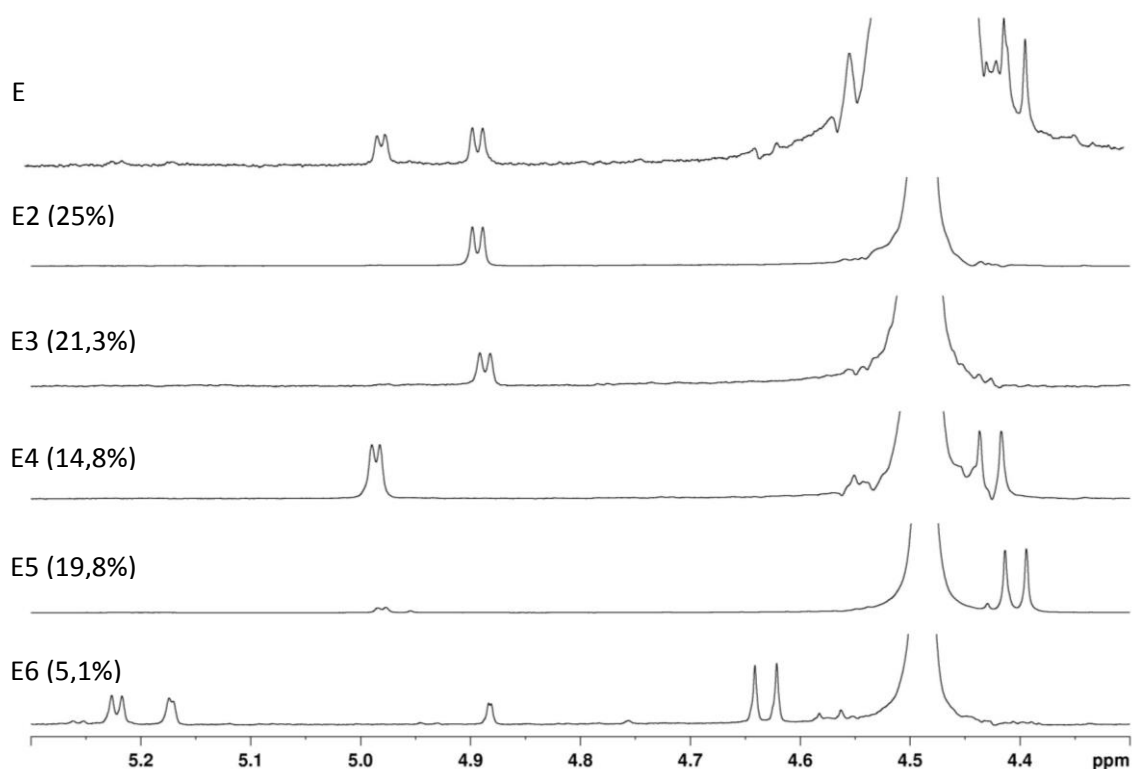


FIGURA 11 – REGIÃO ANOMÉRICA DOS ESPECTROS DE ^1H DA FRAÇÃO E, E SUBFRAÇÕES E2 A E6. TEMPERATURA: 50°C. SOLVENTE: D_2O

4.4.1.1 Subfração E2

O espectro de HSQC da subfração E2 (FIGURA 12), que correlaciona carbonos e hidrogênios em uma molécula, permitiu a identificação do carbono e do hidrogênio anomérico ($\text{C-1}'/\text{H-1}'$), em 98,2 e 4,89 ppm respectivamente. Em seguida foi realizada uma análise de COSY, que mostra as correlações entre os hidrogênios vizinhos da molécula (FIGURA 13). A linha diagonal principal refere-se à sobreposição dos espectros de ^1H , e à sua volta estão as correlações. Partindo do sinal referente ao $\text{H-1}'$ determinado por HSQC, foi possível observar as correlações $\text{H-1}'/\text{H-2}'$ (4,89/3,57 ppm), $\text{H-2}'/\text{H-3}'$ (3,57/3,72 ppm), $\text{H-3}'/\text{H-4}'$ (3,72/3,26 ppm), $\text{H-4}'/\text{H-5}'$ (3,26/4,06 ppm), $\text{H-5}'/\text{H-6a}'$ (4,06/3,37 ppm), e $\text{H-6a}'/\text{H-6b}'$ (3,37/3,06 ppm), sugerindo pelo perfil de correlações, a presença de uma hexose.

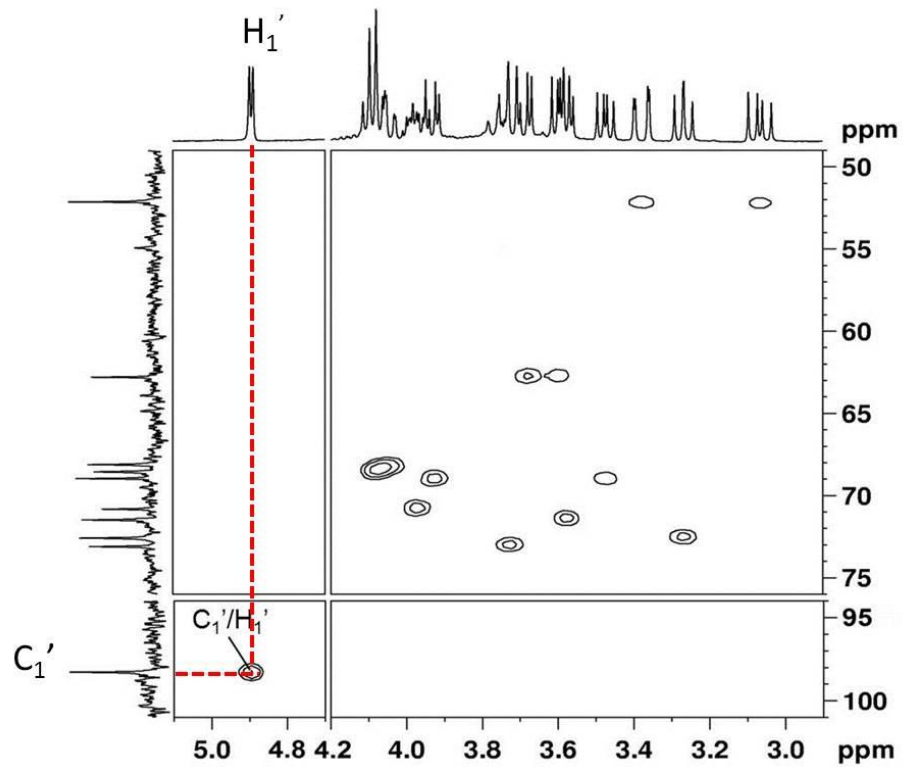


FIGURA 12 - ESPECTRO DE HSQC DA SUBFRAÇÃO E2, COM DESTAQUE PARA A REGIÃO ANOMÉRICA. TEMPERATURA: 50°C. SOLVENTE: D₂O

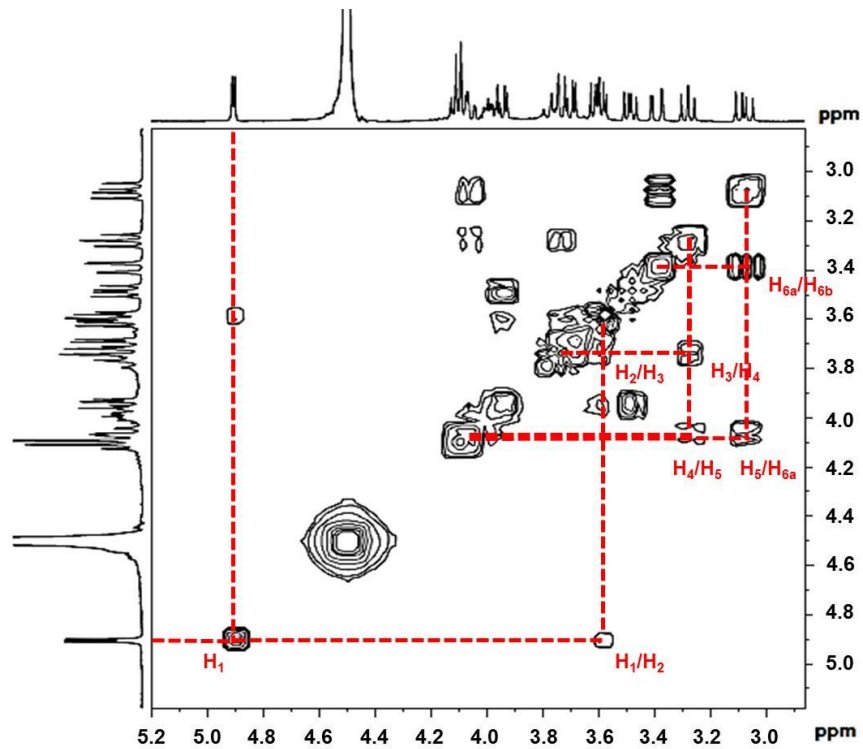


FIGURA 13 - ESPECTRO DE COSY DA SUBFRAÇÃO E2. TEMPERATURA: 50°C. SOLVENTE: D₂O

A partir destes resultados, foi realizado um espectro de TOCSY, que permite a visualização das correlações entre todos os hidrogênios de uma molécula. Em um estudo realizado por GHEYSEN *et al.* (2008) foi proposto que o experimento de TOCSY permite diferenciar três monossacarídeos comuns: glucose, galactose e manose, de acordo com a configuração de cada monossacarídeo. Desta forma, quando observam-se 6 correlações no espectro, sugere-se a presença de uma hexose com configuração do tipo gluco, tal qual foi observado neste trabalho (FIGURA 14). As correlações totais entre os hidrogênios foram determinadas como se segue: H-1'/H-2' (4,89/3,57 ppm), H-1'/H-3' (4,89/3,72 ppm), H-1'/H-4' (4,89/3,26 ppm), H-1'/H-5' (4,89/4,06 ppm), H-1'/H-6a' (4,89/3,37 ppm) e H-1'/H-6b' (4,89/3,06 ppm).

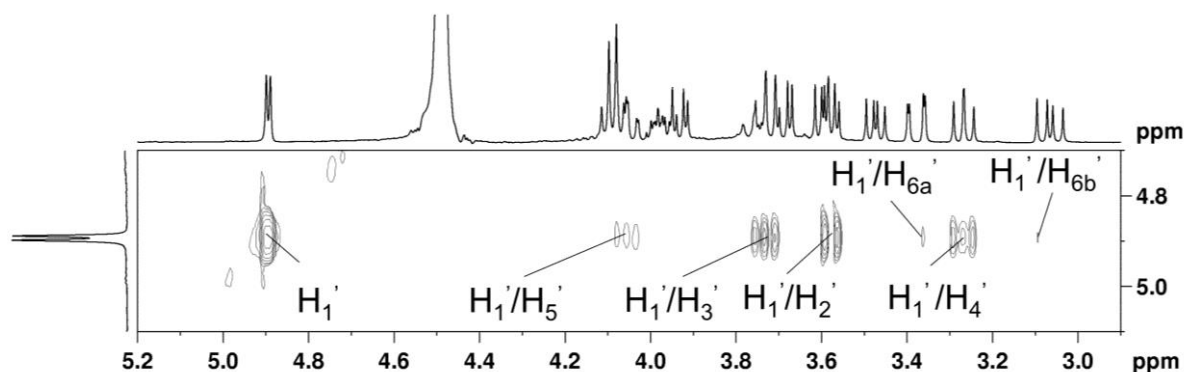


FIGURA 14 – REGIÃO ANOMÉRICA DO ESPECTRO DE TOCSY DA SUBFRAÇÃO E2. TEMPERATURA: 50°C. SOLVENTE: D₂O

A partir dos sinais de hidrogênio identificados nos espectros de COSY e TOCSY, foi possível encontrar os deslocamentos químicos dos carbonos C-2' a C-6' no espectro de HSQC (FIGURA 17). Observando o espectro de ¹³C da subfração E2 (FIGURA 15), foi atribuído o sinal em 98,2 ppm ao C-1', os sinais em 71,4, 73,0, 72,5 e 68,1 ppm referentes ao C-2', C-3', C-4' e C-5', e o sinal em 52 ppm foi atribuído ao C-6' de unidades de sulfoquinovose, um açúcar de configuração idêntica à 6-desoxi-glucose, entretanto possui a hidroxila do C-6' substituída por um grupo sulfonato (ROY e HEWLLINS, 1998; LIPTÁK *et al.*, 2004). Além destes sinais, observam-se outros 3 sinais que foram atribuídos a uma unidade de glicerol.

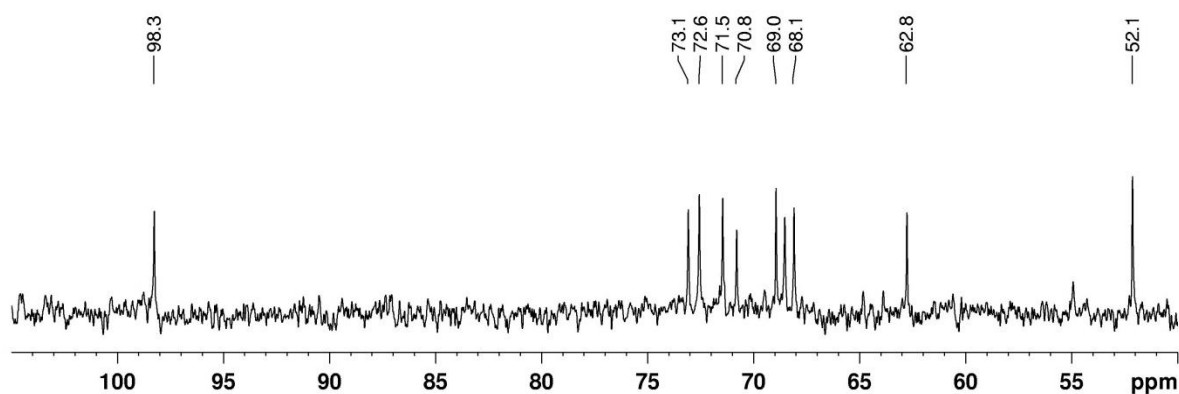


FIGURA 15 - ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DA SUBFRAÇÃO E2. TEMPERATURA: 50°C. SOLVENTE: D_2O

Através das análises de ^{13}C -DEPT, foi possível confirmar a presença de 3 grupos metilênicos (CH_2), sendo um deles referente ao C-6' do resíduo de sulfoquinovose, e os demais referentes ao C-1 e C-3 da unidade de glicerol, em 68,9 e 62,8 ppm respectivamente (FIGURA 16).

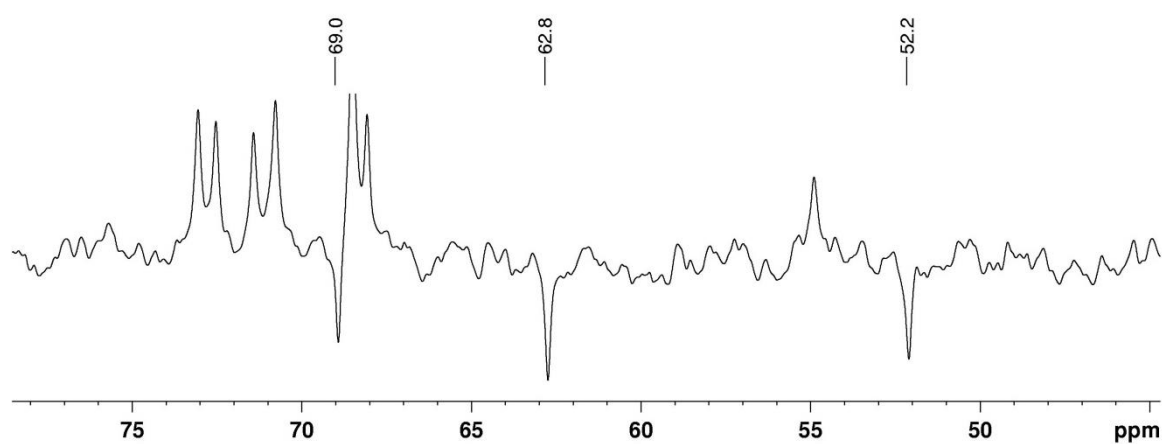


FIGURA 16 – REGIÃO (78 a 45 ppm) DO ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C -DEPT DA SUBFRAÇÃO E2. TEMPERATURA: 50°C. SOLVENTE: D_2O

Estes assinalamentos foram comparados com dados de literatura (ROY e HEWLLINS, 1998) e são mostrados na TABELA 6, sugerindo a presença de um sulfoquinovosil-glicerol.

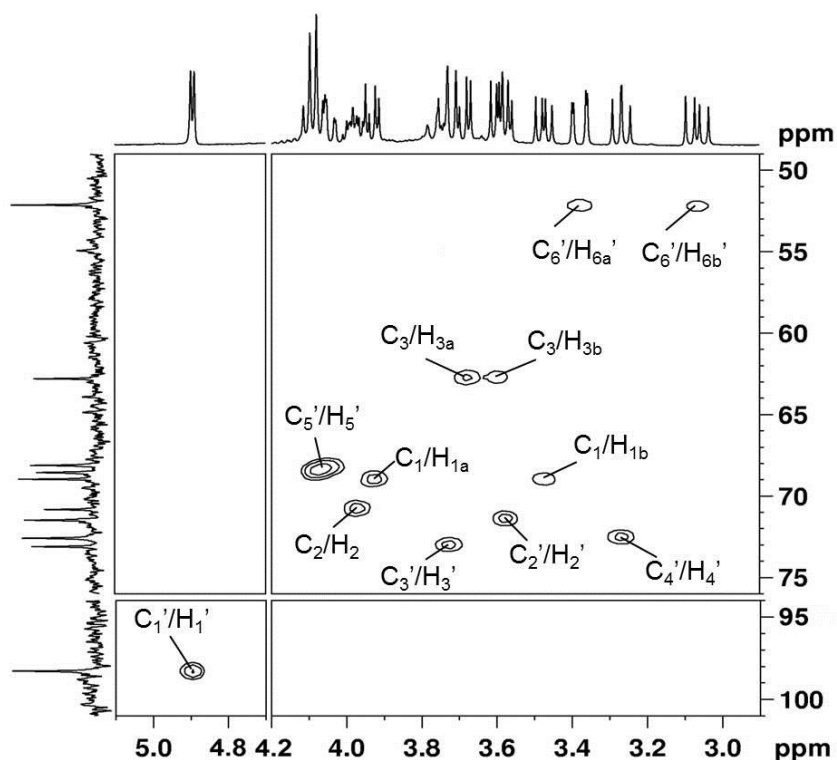


FIGURA 17 - ESPECTRO DE HSQC DA SUBFRAÇÃO E2. TEMPERATURA: 50°C. SOLVENTE: D₂O

TABELA 6 - DESLOCAMENTOS QUÍMICOS (ppm) DE ¹H E ¹³C DAS SUBUNIDADES CONSTITUINTES DA SUBFRAÇÃO E2

| Unidade | Sulfoquinovosil-glicerol ^a | | Constante de acoplamento (<i>J</i> , em Hz) | Sulfoquinovosil-glicerol ^b | | Constante de acoplamento (<i>J</i> , em Hz) ^b |
|------------------------|---------------------------------------|-----------------|---|---------------------------------------|-----------------|---|
| | ¹ H | ¹³ C | | ¹ H | ¹³ C | |
| →1)-glicerol | | | | | | |
| 1a/1b | 3,92/3,47 | 68,9 | <i>J</i> = 6,9 e 10,4 | 3,78/3,27 | 68,8 | <i>J</i> = 10,4 e 10,7 |
| 2 | 3,97 | 70,9 | nd | 3,82 | 70,7 | nd |
| 3a/3b | 3,67/3,59 | 62,8 | nd | 3,53/3,43 | 62,5 | <i>J</i> = 12,4 |
| α-D-sulfoquinovose-(1→ | | | | | | |
| 1' | 4,89 | 98,2 | <i>J</i> _{1,2} = 3,7 | 4,72 | 98,1 | <i>J</i> _{1,2} = 3,8 |
| 2' | 3,57 | 71,4 | nd | 3,42 | 71,3 | nd |
| 3' | 3,72 | 73,0 | nd | 3,57 | 72,8 | <i>J</i> = 9,5 |
| 4' | 3,26 | 72,5 | <i>J</i> = 9,5 | 3,19 | 72,3 | <i>J</i> = 9,4 |
| 5' | 4,06 | 68,1 | nd | 3,89 | 68,0 | <i>J</i> = 9,8 |
| 6a'/6b' | 3,37/3,06 | 52,1 | <i>J</i> _{5,6} = 1,8 e 14,8 <i>J</i> _{6,6} = 9,6 Hz e 14,8 | 3,22/2,90 | 51,9 | <i>J</i> = 14,6 e 9,8 |

^a Presente estudo. Solvente utilizado: D₂O

^b ROY e HEWLINS (1998). Solvente utilizado: D₂O

nd: não determinado.

A fim de confirmar se o glicerol estava ou não ligado à sulfoquinovose, foi realizado um experimento de HMBC, que mostra as correlações entre hidrogênios e carbonos com até 3 ligações de distância. Neste experimento, foi possível observar a correlação entre o H-1 da unidade de glicerol e o carbono anomérico da sulfoquinovose (H-1/C-1'), em 3,47 e 98,2 ppm. Desta forma, a sulfoquinovose deve estar ligada ao C-1 do glicerol, sugerindo uma estrutura conforme a FIGURA 18.

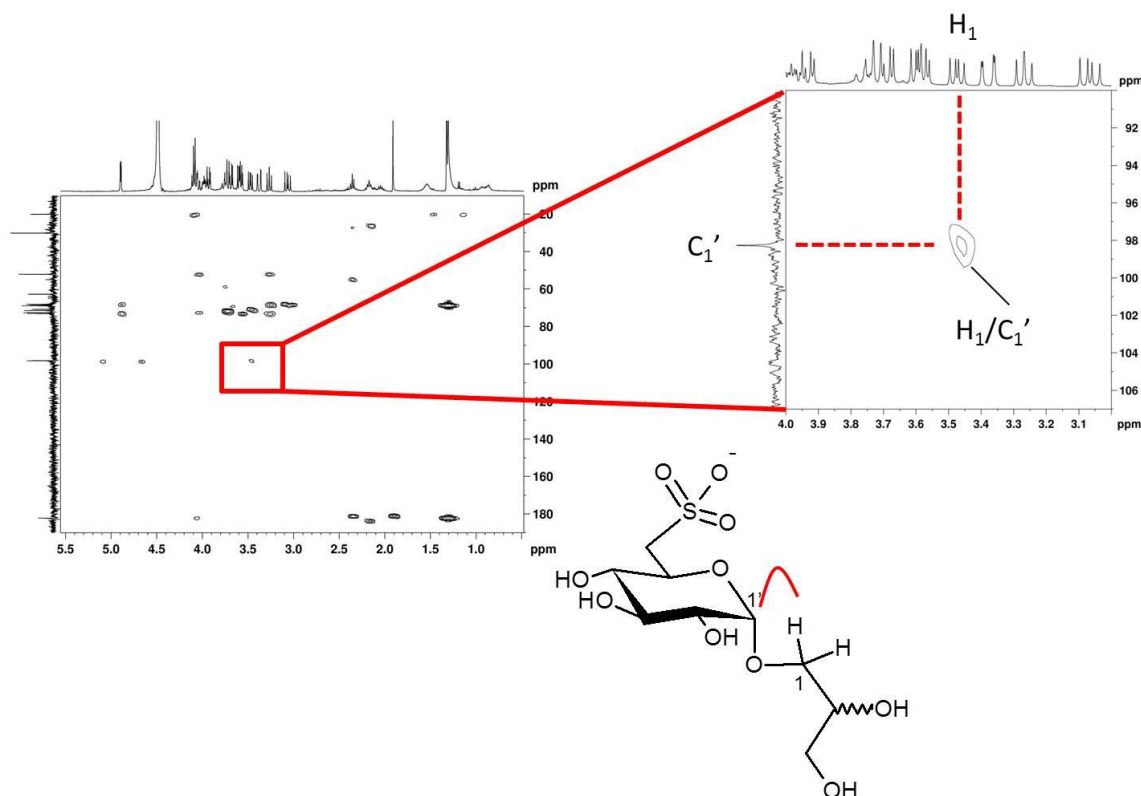


FIGURA 18 - ESPECTRO DE HMBC DA SUBFRAÇÃO E2, COM DESTAQUE PARA A CORRELAÇÃO C₁'/H₁. TEMPERATURA: 50°C. SOLVENTE: D₂O

A análise de espectrometria de massas (ESI-MS), realizada em modo negativo, confirmou a massa desse composto onde o íon molecular de m/z 317 [M-H]⁻ corresponde à massa do sulfoquinovosil-glicerol, e o íon secundário de m/z 225 [M-H]⁻ corresponde à massa do fragmento de sulfoquinovose (FIGURA 19).

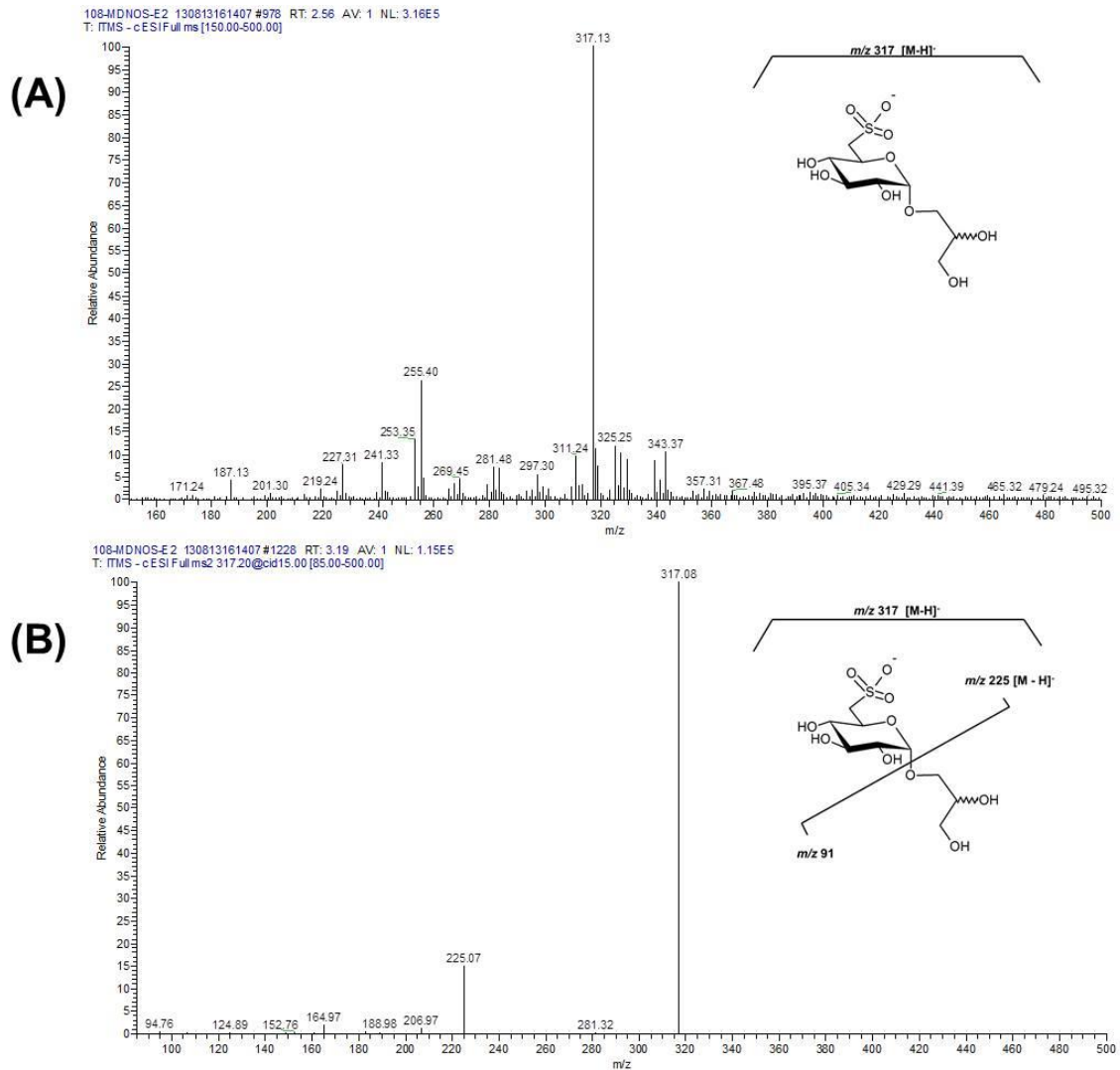


FIGURA 19 - ESPECTROS DE ESI-MS EM MODO NEGATIVO DO ÍON PRINCIPAL SULFOQUINOVOSSIL-GLICEROL (A) E DO ÍON FILHO CORRESPONDENTE AO FRAGMENTO DE SULFOQUINOVOSE (B)

Os dados de RMN e ESI-MS, juntamente com a comparação com os dados de literatura indicam que a subfração E2 corresponde a uma 6-sulfo- α -D-quinovopiranosose-(1 \rightarrow 1)-glicerol (FIGURA 20).

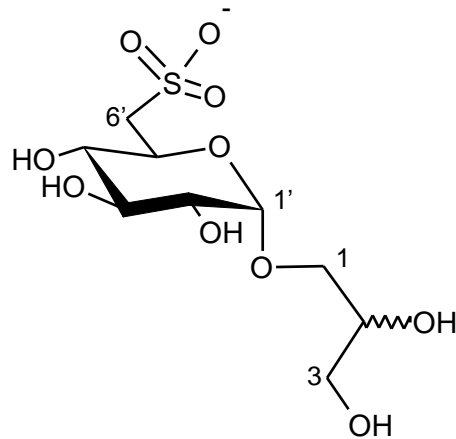


FIGURA 20 - ESTRUTURA PROPOSTA PARA A SUBFRAÇÃO E2: 6-SULFO- α -D-QUINOVOPIRANOSE-(1 \rightarrow 1)-GLICEROL. (Nomenclatura: os carbonos da unidade de açúcar são seguidos de um apóstrofo).

O glicosídeo encontrado neste trabalho faz parte da composição de um dos três principais glicolipídeos encontrados nas membranas dos cloroplastos, o sulfoquinovosildiacilglicerol (SQDG). A descoberta dos sulfolipídeos foi realizada pelo grupo de pesquisa de Benson em meados dos anos 1960, quando estudaram as membranas de cloroplastos das microalgas *Chlorella* sp. e *Scenedesmus* sp (BENSON, DANIEL e WISER, 1959; SHIBUYA e BENSON, 1961; DANIEL *et al.*, 1961; MIYANO e BENSON, 1962a, 1962b). A partir de então, outros estudos foram realizados e os sulfolipídeos já foram descritos em macroalgas e vegetais superiores, e também já foi isolado no micro-organismo não fotossintetizante *Rhizobium* (SON, 1990; RASTRELLI *et al.*, 1997; WANG e HOLLINGSWORTH, 1998). Em todos estes trabalhos, o glicosídeo sulfoquinovosil-glicerol foi obtido a partir de hidrólise alcalina dos sulfolipídeos, exceto o grupo de Benson, que encontrou uma alta concentração dos glicosídeos deacilados, tal como é descrito neste trabalho.

Comparando-se a subfração E3 com E2, observa-se que são muito semelhantes em vários aspectos. O perfil semelhante de corrida na CCD (FIGURA 10) e o espectro de ^1H de ambas as subfrações sugere que E3 apresenta sulfoquinovosil-glicerol em sua composição (FIGURA 21).

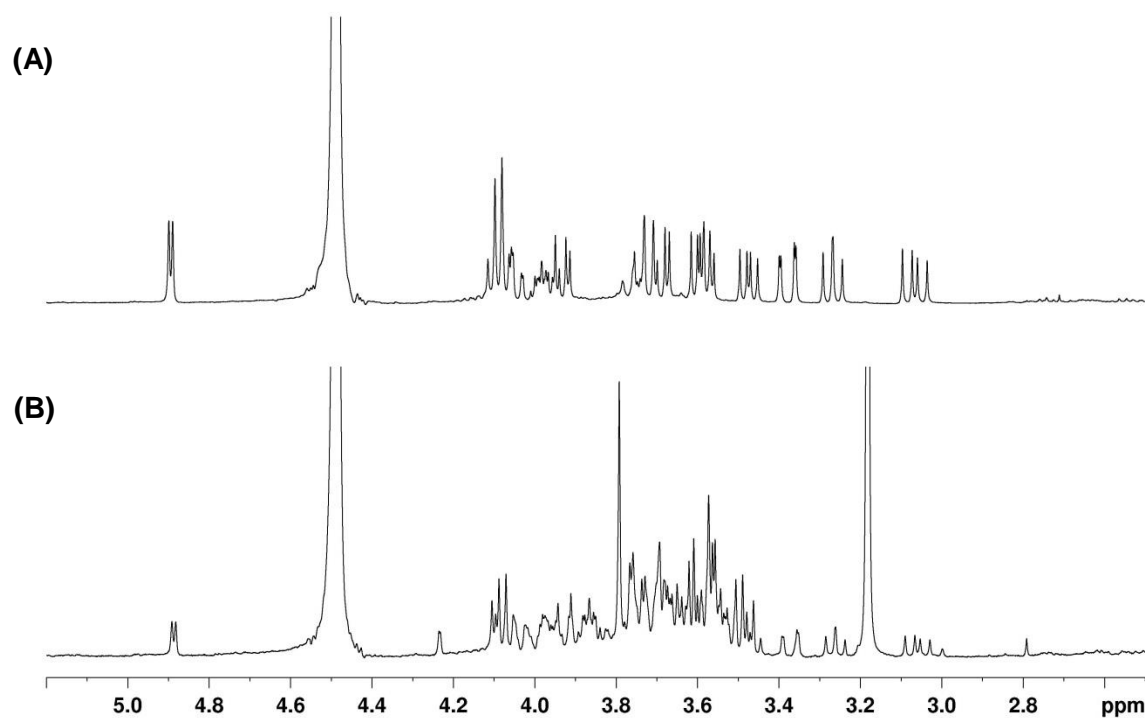


FIGURA 21 - ESPECTROS DE ^1H DAS SUBFRAÇÕES E2 (A) E E3 (B). TEMPERATURA: 50°C. SOLVENTE: D_2O

4.4.1.2 Subfração E4

O espectro de HSQC da subfração E4 (FIGURA 22) permitiu a identificação de duas correlações anoméricas, em 98,3 e 4,98 ppm (C-1''/H-1'') e em 103,0 e 4,42 ppm (C-1'/H-1'), sugerindo de acordo com os valores de constante de acoplamento ($J_{1,2}$) de 2,9 Hz e 7,9 Hz anomericidade α e β , respectivamente.

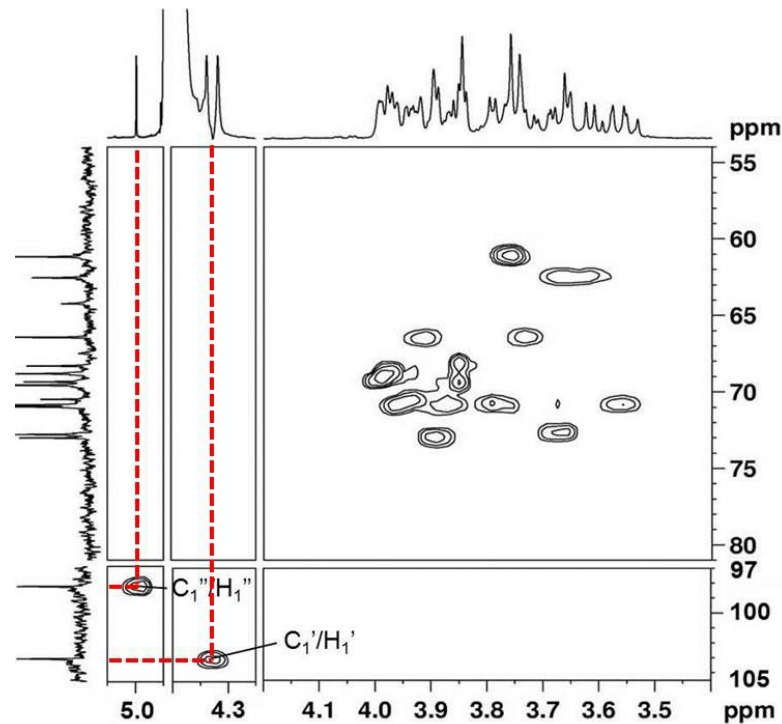


FIGURA 22 - ESPECTRO DE HSQC DA SUBFRAÇÃO E4, COM DESTAQUE PARA A REGIÃO ANOMÉRICA. TEMPERATURA: 50°C. SOLVENTE: D₂O

Partindo dos sinais de hidrogênio anomérico determinados no HSQC, foi realizada a análise de TOCSY (FIGURA 23), que permitiu a identificação de 3 correlações para cada unidade de açúcar, perfil característico de configuração do tipo galacto (GHEYSEN *et al.*, 2008). A unidade de galactose de anomericidade α apresentou as correlações H-1''/H-4'' em 4,98/3,98 ppm, H-1''/H-3'' em 4,98/3,86 ppm, e H-1''/H-2'' em 4,98/3,83 ppm. A unidade de galactose de anomericidade β apresentou as correlações H-1'/H-4' em 4,42/3,98 ppm, H-1'/H-3' em 4,42/3,67 ppm, e H-1'/H-2' em 4,42/3,56 ppm. Além disto, a composição monossacarídica do extrato E mostrou 76% de galactose.

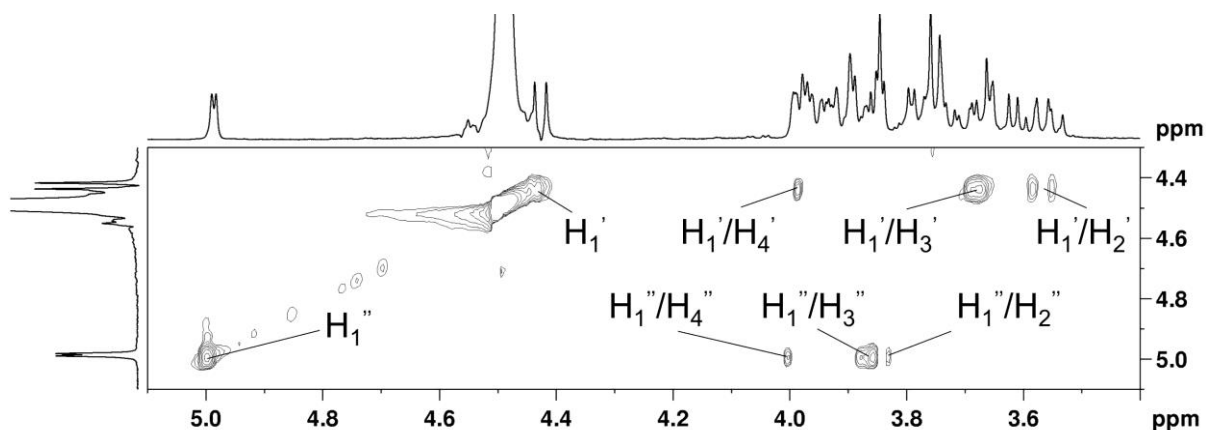


FIGURA 23 – REGIÃO ANOMÉRICA DO ESPECTRO DE TOCSY DA SUBFRAÇÃO E4. TEMPERATURA: 50°C. SOLVENTE: D₂O

Uma vez assinalados os hidrogênios através do espectro de TOCSY, foram determinados os deslocamentos químicos dos demais carbonos a partir do espectro de HSQC. O espectro de DEPT-135 (FIGURA 25) permitiu assinalar os carbonos metilênicos, e desta forma encontrar os respectivos hidrogênios no espectro de HSQC (TABELA 7 e FIGURA 26). O espectro de ¹³C (FIGURA 24) mostrou 2 sinais na região anomérica, previamente atribuídos aos C-1' das unidades de galactose β e α, em 103,0 e 98,3 ppm. Na região entre 75 e 65 ppm foram atribuídos os sinais referentes aos carbonos dos anéis de monossacarídeo C-2 a C-5. Além disso, em 61,2 e 66,5 ppm são observados os sinais referentes aos C-6 livre e ligado das unidades de galactose, respectivamente, sugerindo que estas unidades estejam ligadas. Além destes sinais, observam-se outros 3 sinais em 70,9, 62,5 e 70,8 ppm, referentes aos carbonos de uma unidade de glicerol.

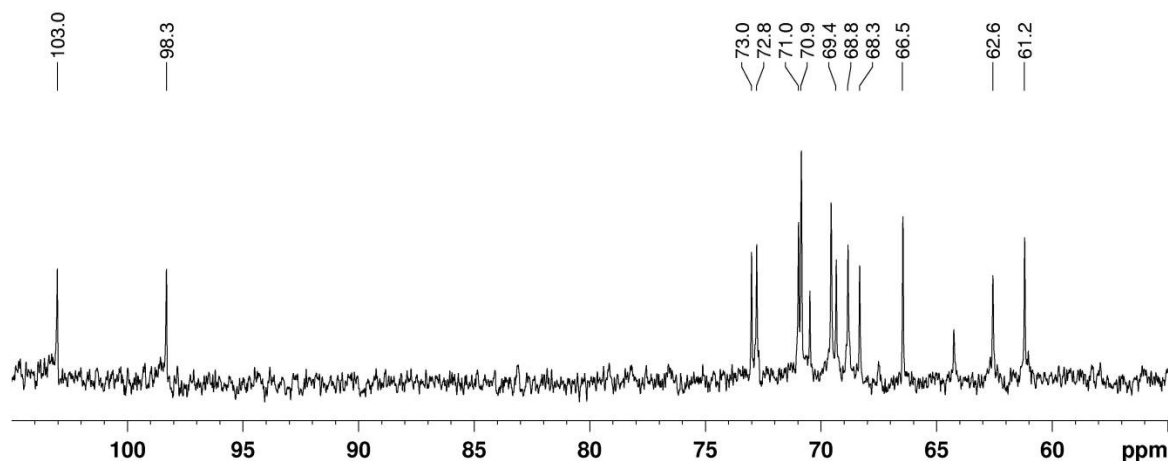


FIGURA 24 - ESPECTRO DE RMN DE ¹³C DA SUBFRAÇÃO E4. TEMPERATURA: 50°C. SOLVENTE: D₂O

Através das análises de ^{13}C -DEPT (FIGURA 25), foi possível confirmar a presença de 4 grupos metilênicos (CH_2), que apresentaram-se em fase negativa. Um deles é referente ao C-6' da unidade de β -galactose (66,5 ppm), um referente ao C-6'' da unidade de α -galactose (61,2 ppm), e outros dois foram atribuídos ao C-1 e C-3 da unidade de glicerol, em 70,9 e 62,5 ppm respectivamente.

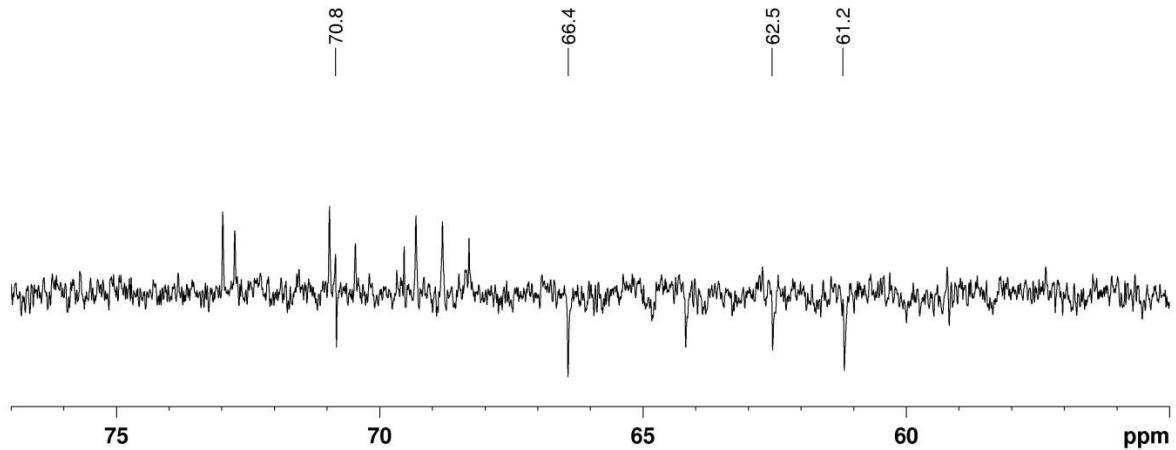


FIGURA 25 - ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C -DEPT DA SUBFRAÇÃO E4. TEMPERATURA: 50°C. SOLVENTE: D_2O

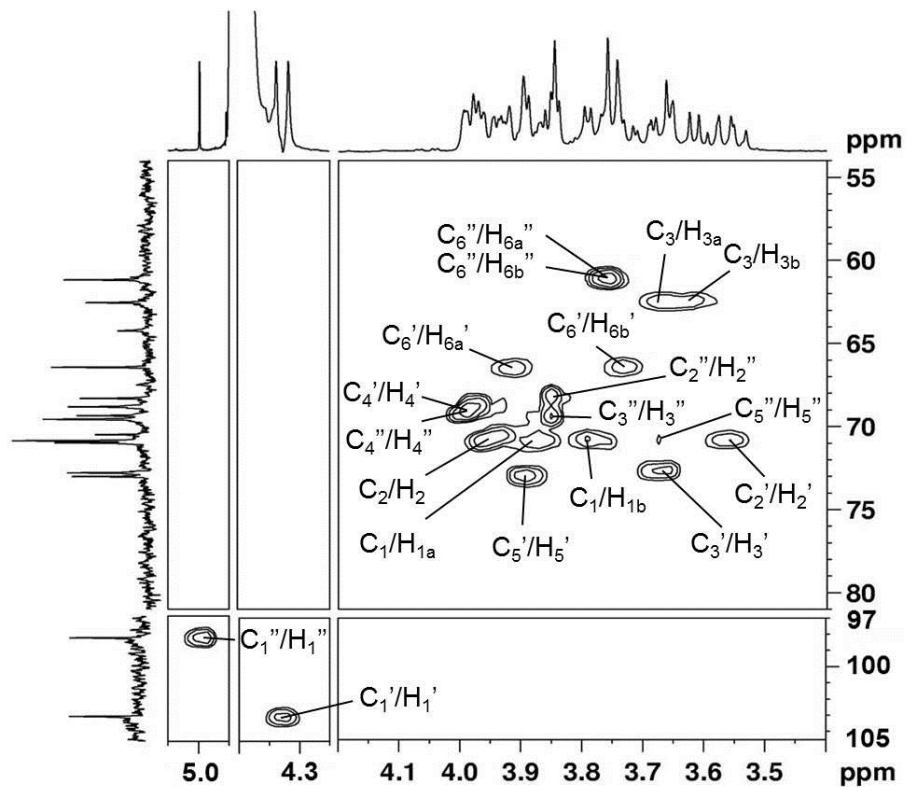


FIGURA 26 - ESPECTRO DE HSQC DA SUBFRAÇÃO E4. TEMPERATURA: 50°C. SOLVENTE: D_2O

Baseado principalmente nas comparações entre os sinais de ^1H obtidos por SASSAKI *et al.* (1999) e os assinalamentos da subfração E4, que são muito semelhantes, sugere-se que esta subfração seja constituída majoritariamente pelo glicosídeo $\alpha\text{-D-galactopiranosse-(1}\rightarrow\text{6)-}\beta\text{-D-galactopiranosse-(1}\rightarrow\text{1)-glicerol}$ (FIGURA 28, TABELA 7). Embora o composto identificado seja majoritário nesta subfração, os espectros de RMN de ^{13}C , DEPT-135 e HSQC (FIGURAS 24, 25 e 26) mostram que esta subfração não está totalmente pura, devido à presença de outros assinalamentos não correspondentes ao composto sugerido.

TABELA 7 - DESLOCAMENTOS QUÍMICOS (ppm) DE ^1H E ^{13}C DA SUBFRAÇÃO E4

| Unidade | Digalactosil-glicerol ^a | | Digalactosil-glicerol ^b | |
|--|------------------------------------|-----------------|------------------------------------|-----------------|
| | ^1H | ^{13}C | ^1H | ^{13}C |
| $\rightarrow\text{1)-glicerol}$ | | | | |
| 1a/1b | 3,87/3,78 | 70,9 | 3,8/3,7 | 72,4 |
| 2 | 3,95 | 70,8 | 3,9 | 71,8 |
| 3a/3b | 3,66/3,61 | 62,5 | 3,6/3,6 | 64,0 |
| $\rightarrow\text{6)-}\beta\text{-D-galactopiranosse-(1}\rightarrow\text{)}$ | | | | |
| 1' | 4,42 | 103,0 | 4,4 | 104,5 |
| 2' | 3,56 | 70,8 | 3,5 | 72,3 |
| 3' | 3,67 | 72,8 | 3,6 | 70,2 |
| 4' | 3,98 | 68,8 | 3,9 | 70,2 |
| 5' | 3,89 | 73,0 | 3,9 | 74,2 |
| 6a'/6b' | 3,91/3,73 | 66,5 | 3,9/3,7 | 67,9 |
| $\alpha\text{-D-galactopiranosse-(1}\rightarrow\text{)}$ | | | | |
| 1'' | 4,98 | 98,3 | 5,0 | 99,7 |
| 2'' | 3,83 | 68,3 | 3,8 | 69,8 |
| 3'' | 3,86 | 69,3 | 3,8 | 71,0 |
| 4'' | 3,98 | 68,8 | 4,0 | 70,8 |
| 5'' | 3,67 | 70,8 | 3,7 | 72,5 |
| 6a''/6b'' | 3,75/3,75 | 61,2 | 3,7/3,7 | 62,7 |

^a presente estudo. Solvente utilizado: D_2O .

^b SASSAKI *et al.*, 1999. Solvente utilizado: $\text{CDCl}_3:\text{CD}_3\text{OD}$ (3:1).

A subfração E4 foi analisada por ESI-MS em modo positivo, gerando um espectro com íon principal de m/z 439 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, que corresponde à razão m/z do digalactosil-glicerol na forma de Na^+ (FIGURA 27).

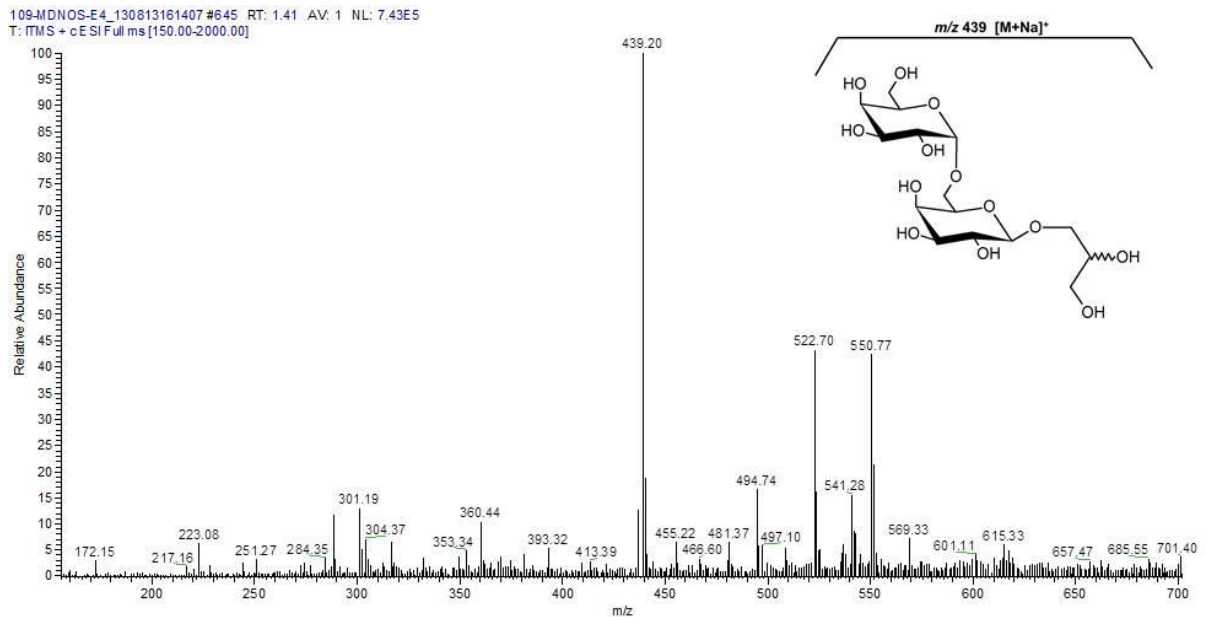


FIGURA 27 - ESPECTRO DE ESI-MS EM MODO POSITIVO DO ÍON PRINCIPAL DIGALACTOSILGLICEROL

Os dados de RMN e ESI-MS, juntamente com a comparação com os dados de literatura indicam que a subfração E4 corresponde a uma α -D-galactopiranosose-(1 \rightarrow 6)- β -D-galactopiranosose-(1 \rightarrow 1)-glicerol (FIGURA 28).

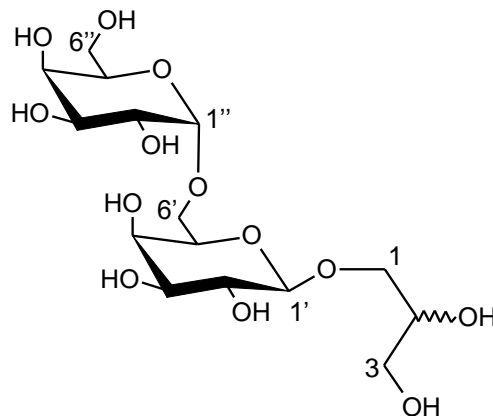


FIGURA 28 - ESTRUTURA PROPOSTA PARA SUBFRAÇÃO E4: α -D-GALACTOPIRANOSE-(1 \rightarrow 6)- β -D-GALACTOPIRANOSE-(1 \rightarrow 1)-GLICEROL.

(Nomenclatura: os carbonos da unidade de açúcar mais próxima do glicerol são seguidos de um apóstrofo, e os carbonos da unidade de açúcar mais distante do glicerol são seguidos de dois apóstrofes).

O glicosídeo encontrado neste trabalho também faz parte da composição dos glicolípídeos, neste caso o digalactosildiácilglicerol (DGDG), um dos três principais glicosídeos constituintes da membrana dos cloroplastos. A descoberta dos

glicolípídeos foi realizada por CARTER, MCCLUER e SLIFER (1956) em lipídeos de farinha de trigo. Nos dois anos seguintes, o mesmo composto foi isolado das macroalgas vermelhas *Polysiphonia fastigiata* e *Corallina officinalis* (WICKBERG, 1957 e 1958a), e primeiramente sintetizado por WICKBERG (1957b). Os sulfolípídeos também já foram isolados em líquens (SASSAKI *et al.*, 1999). Entretanto, acredita-se que o digalactosil-glicerol não esterificado descrito neste trabalho é o primeiro relato em microalgas.

4.4.1.3 Subfração E5

O espectro de HSQC da subfração E4 (FIGURA 29) permitiu a identificação de uma correlação anomérica em 103,1 e 4,40 ppm (C-1'/H-1'), e a constante de acoplamento $J_{1,2}$ de 7,7 Hz sugere a presença de um açúcar de anomericidade β .

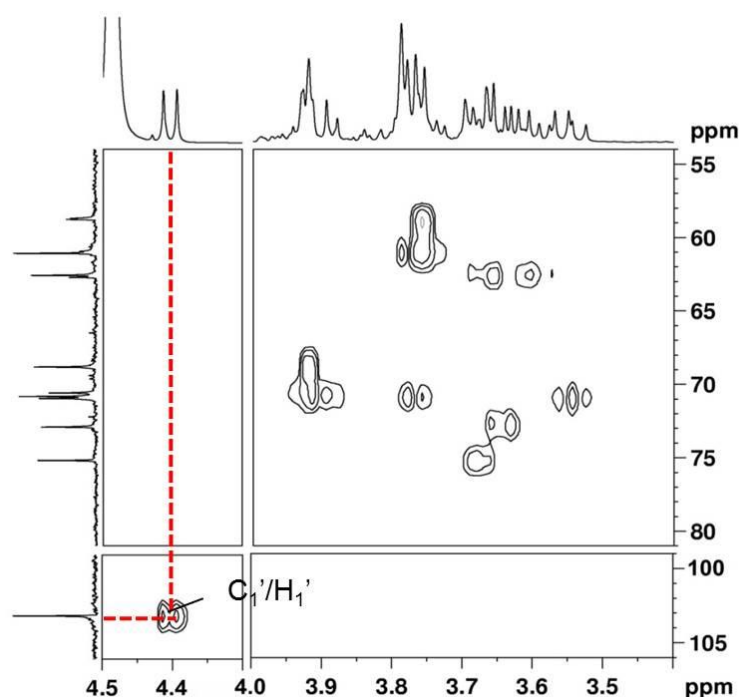


FIGURA 29 - ESPECTRO DE HSQC DA SUBFRAÇÃO E5, COM DESTAQUE PARA A REGIÃO ANOMÉRICA. TEMPERATURA: 50°C. SOLVENTE: D₂O

A partir da determinação do sinal referente ao hidrogênio anomérico pelo HSQC, foi realizada a análise de TOCSY (FIGURA 30) que permitiu a

identificação de 3 correlações, perfil característico de configuração do tipo galacto (GHEYSEN *et al.*, 2008). A unidade apresentou as correlações H-1'/H-4' em 4,40/3,92 ppm, H-1'/H-3' em 4,40/3,63 ppm, e H-1'/H-2' em 4,40/3,54 ppm. Além disto, a composição monossacarídica do extrato E mostrou 76% de galactose.

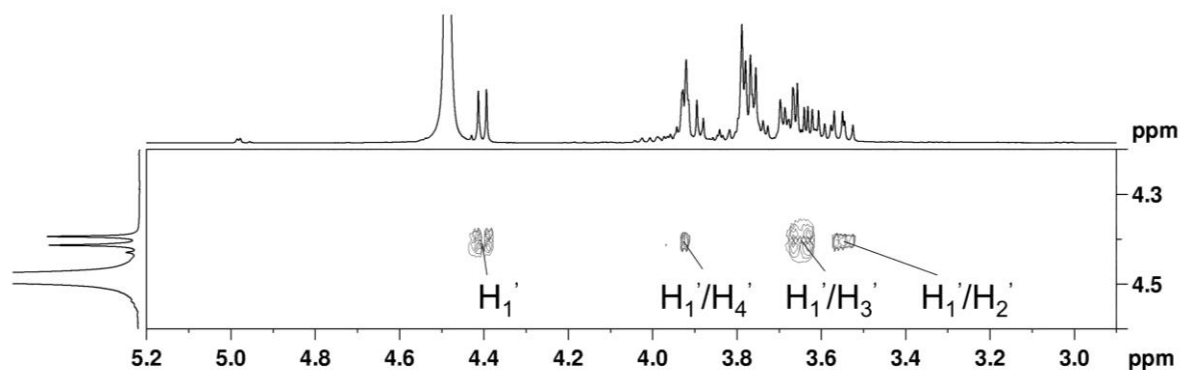


FIGURA 30 – REGIÃO ANOMÉRICA DO ESPECTRO DE TOCSY DA SUBFRAÇÃO E5. TEMPERATURA: 50°C. SOLVENTE: D₂O

A partir dos assinalamentos dos hidrogênios, foi possível determinar os deslocamentos químicos dos demais carbonos através do espectro de HSQC (FIGURA 33). O espectro de ¹³C da subfração E5 (FIGURA 31) mostrou um sinal na região anomérica atribuídos aos C-1' da unidade de galactose, em 103,1 ppm. Na região entre 76 e 65 ppm foram atribuídos os sinais referentes aos carbonos do anel C-2' a C-5'. O sinal de C-6' livre pode ser facilmente identificado em 61 ppm. Além destes, observam-se outros 3 sinais em 70,9, 62,5 e 70,8 ppm, referentes aos carbonos de uma unidade de glicerol. Outros sinais de menor intensidade, em 62,7 ppm e 58,7 ppm no espectro de ¹³C indicam que a subfração não está totalmente pura.

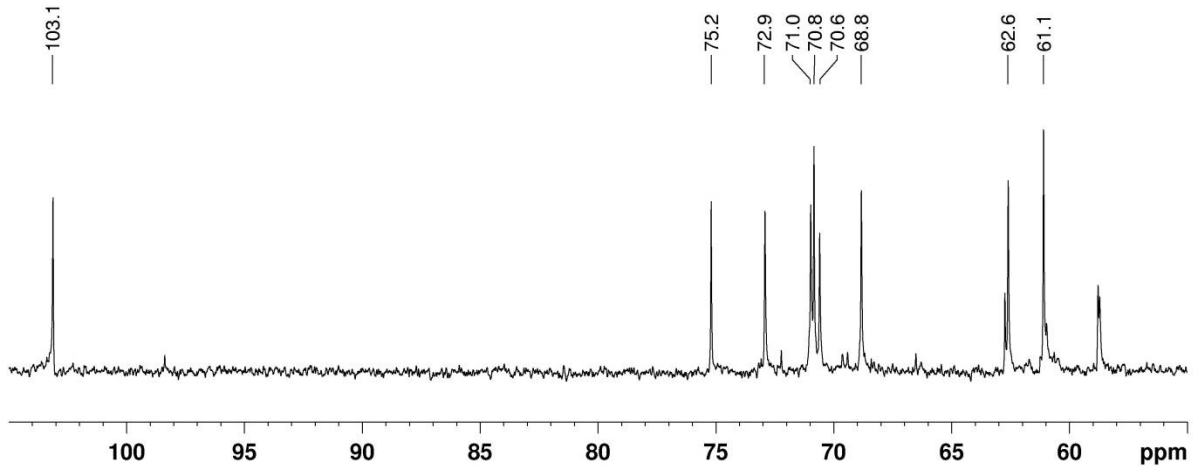


FIGURA 31 - ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DA SUBFRAÇÃO E5. TEMPERATURA: 50°C . SOLVENTE: D_2O

Através das análises de ^{13}C -DEPT (FIGURA 32), foi possível confirmar a presença de 3 grupos metilênicos (CH_2), que apresentaram-se em fase negativa. Um deles é referente ao C-6' da unidade de β -galactose (61 ppm), e os outros dois foram atribuídos ao C-1 e C-3 da unidade de glicerol, em 70,8 e 62,6 ppm respectivamente.

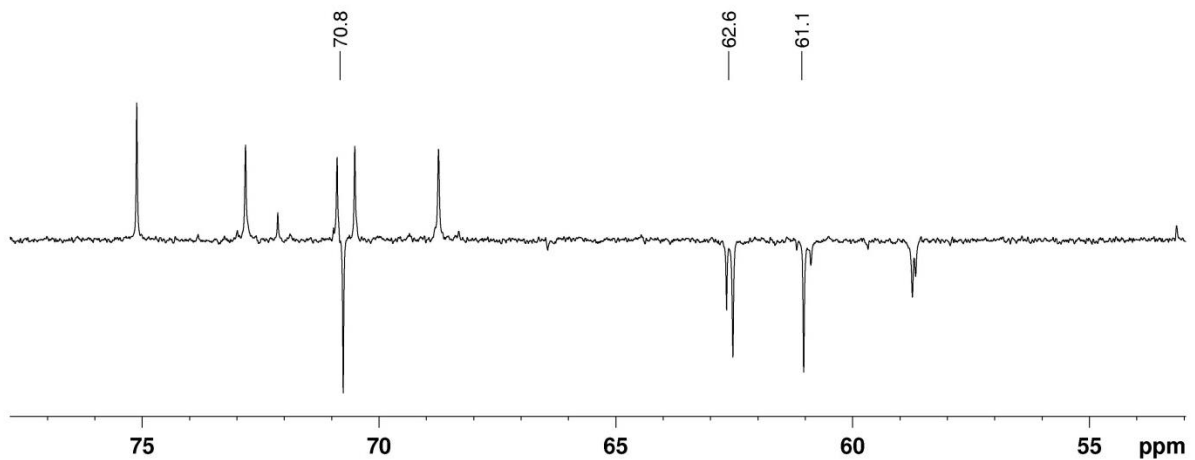


FIGURA 32 - ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C -DEPT DA SUBFRAÇÃO E5. TEMPERATURA: 50°C . SOLVENTE: D_2O

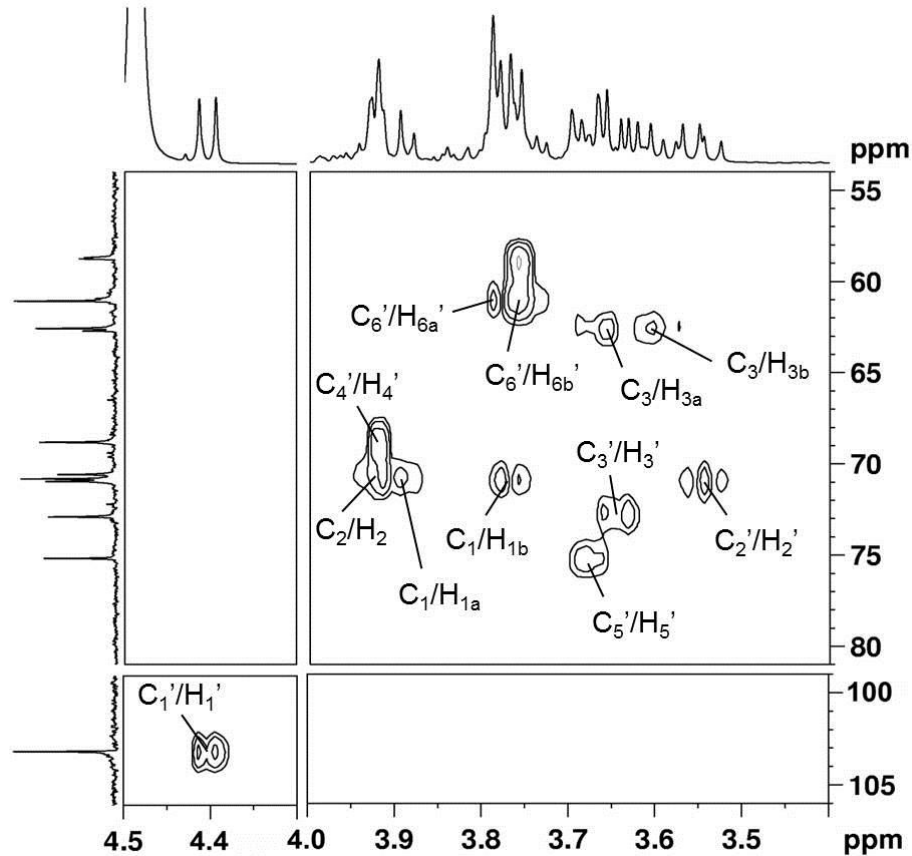


FIGURA 33 - ESPECTRO DE HSQC DA SUBFRAÇÃO E5. TEMPERATURA: 50°C. SOLVENTE: D₂O

Foi realizado um experimento de HMBC a fim de confirmar a ligação entre glicerol e galactose. Foi possível observar duas correlações entre o H-1a e o H-1b da unidade de glicerol com o C-1' da unidade de galactose (3,76/98,2 ppm e 3,89/98,2 ppm), os quais indicam a ligação entre as duas unidades (FIGURA 34). Além disso, foram observadas mais duas correlações em 3,68/98,2 ppm e 3,54/98,2 ppm referentes ao H-5' e H-2' e o C-1' do açúcar.

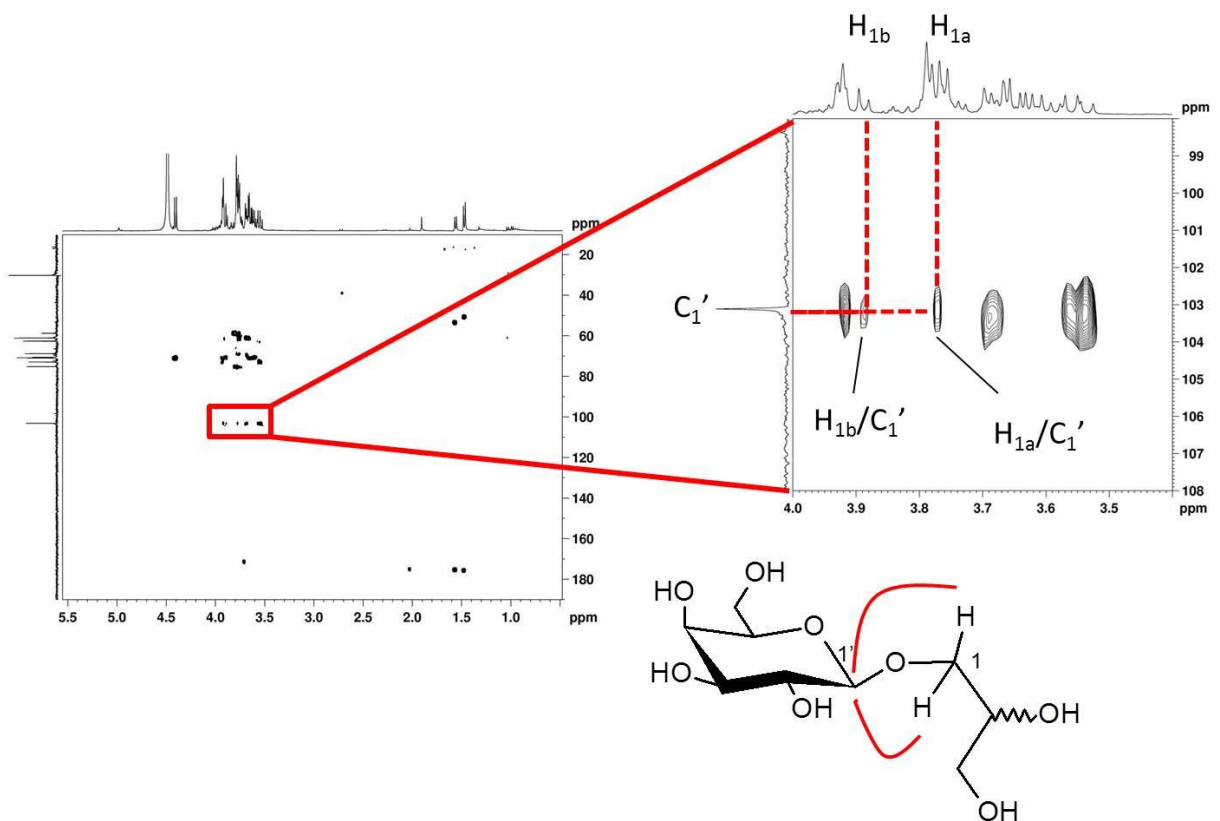


FIGURA 34 - ESPECTRO DE HMBC DA SUBFRAÇÃO E5, COM DESTAQUE PARA A CORRELAÇÃO C_{1'}/H₁. TEMPERATURA: 50°C. SOLVENTE: D₂O

Esses assinalamentos foram comparados com os dados de literatura (SASSAKI *et al.*, 1999) e são apresentados na TABELA 8, sugerindo a presença de um monogalactosil-glicerol. Os dados de RMN são semelhantes aos encontrados por RUBERTO e TRINGALI (2004), que estudou os metabólitos secundários de folhas de arbusto *Feijoa sellowiana*, no qual a β-D-galactopiranosose-(1→1)-glicerol foi obtida através de hidrólise alcalina de um galactolípido. SASSAKI *et al.* (1999) também isolaram galactolípido de líquen e por saponificação obtiveram o monogalactosil-glicerol.

TABELA 8 - DESLOCAMENTOS QUÍMICOS (ppm) DE ^1H E ^{13}C DA SUBFRAÇÃO E5

| Unidade | Monogalactosil-glicerol ^a | | Monogalactosil-glicerol ^b | | Monogalactosil-glicerol ^c | |
|--|--------------------------------------|-----------------|--------------------------------------|-----------------|--------------------------------------|-----------------|
| | ^1H | ^{13}C | ^1H | ^{13}C | ^1H | ^{13}C |
| $\rightarrow 1$)-glicerol | | | | | | |
| 1a/1b | 3,76/3,89 | 70,8 | 3,7/3,7 | 71,2 | 3,7/3,9 | 72,0 |
| 2 | 3,91 | 70,5 | 3,9 | 69,3 | 3,8 | 72,2 |
| 3a/3b | 3,65/3,60 | 62,6 | 3,6/3,6 | 63,0 | 3,6/3,5 | 64,1 |
| β -D-galactopiranoose-(1 \rightarrow | | | | | | |
| 1' | 4,40 | 103,2 | 4,3 | 104,0 | 4,2 | 105,3 |
| 2' | 3,54 | 71,0 | 3,6 | 73,7 | 3,5 | 72,6 |
| 3' | 3,63 | 73,0 | 3,5 | 71,2 | 3,5 | 74,9 |
| 4' | 3,92 | 68,8 | 3,8 | 71,5 | 3,8 | 70,3 |
| 5' | 3,68 | 75,2 | 3,6 | 75,7 | 3,5 | 76,8 |
| 6a'/6b' | 3,78/3,76 | 61,0 | 3,7/3,7 | 61,5 | 3,7/3,6 | 62,5 |

^a presente estudo. Solvente utilizado: D_2O .

^b SASSAKI *et al.*, 1999. Solvente utilizado: CDCl_3 - CD_3OD (3:1).

^c RUBERTO e TRINGALI, 2004. Solvente utilizado: CD_3OD .

A subfração E5 foi analisada por ESI-MS em modo negativo, gerando um espectro com íon principal de m/z 253 $[\text{M}-\text{H}]^-$, que corresponde à razão m/z do monogalactosil-glicerol desprotonado (FIGURA 35).

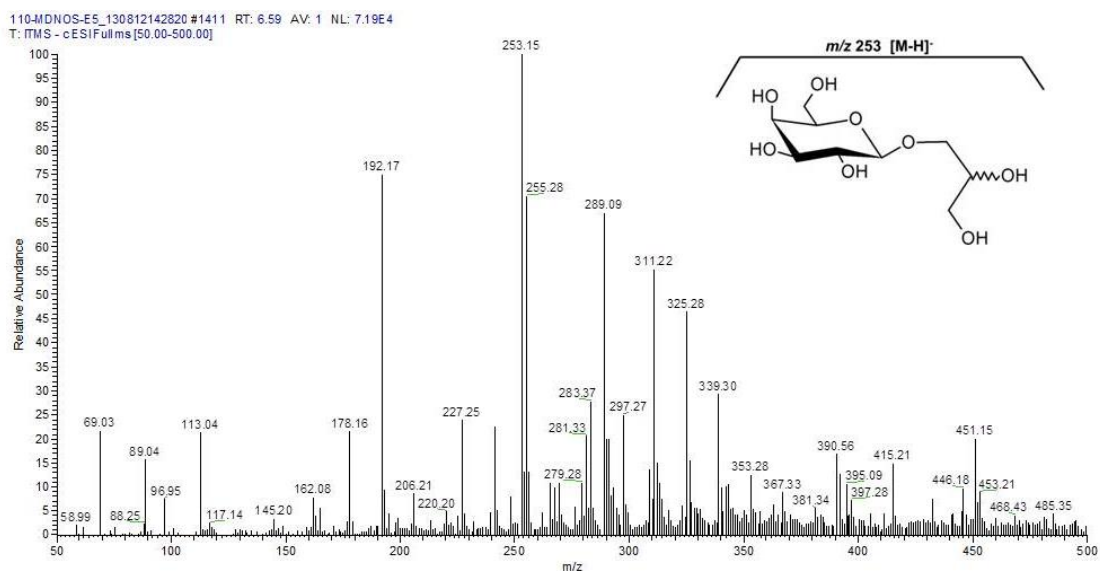


FIGURA 35 - ESPECTROS DE ESI-MS EM MODO NEGATIVO DO ÍON PRINCIPAL MONOGALACTOSIL-GLICEROL

Baseado nas análises dos espectros obtidos, juntamente com dados de comparação na literatura (SASSAKI *et al.*, 1999; RUBERTO e TRINGALI, 2004), observa-se que os sinais de ^1H principalmente, são muito semelhantes aos já descritos para o glicosídeo $\beta\text{-D-galactopiranoose-(1}\rightarrow\text{1)-glicerol}$ (FIGURA 36).

O glicosídeo encontrado neste trabalho também faz parte da composição dos glicolípídeos, que neste caso corresponde ao monogalactosilglicerol (MGDG), um dos três principais glicolípídeos constituintes da membrana dos cloroplastos. O MGDG foi primeiramente isolado por CARTER, MCCLUER e SLIFER (1956) em farinha de trigo, e primeiramente sintetizado por WICKBERG em 1958.

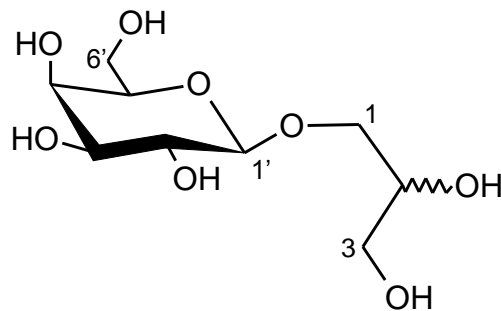


FIGURA 36 - ESTRUTURA PROPOSTA PARA SUBFRAÇÃO E5: $\beta\text{-D-GALACTOPIRANOSE-(1}\rightarrow\text{1)-GLICEROL}$

4.4.1.4 Subfração E6

A subfração E6 foi a última a ser eluída da coluna de Bio-Gel P-2. Sua caracterização química foi feita através de análises de RMN de ^1H e HSQC. Analisando o espectro de ^1H (FIGURA 37), podem ser observados principalmente 4 sinais na região anomérica, os quais foram identificados segundo a sua constante de acoplamento (J). Da esquerda para a direita, a sequência é 5,22 ppm com $J_{1,2} = 3,7$ Hz, 5,17 ppm com $J_{1,2} = 1,6$ Hz, 4,88 ppm com $J_{1,2} = 1,0$ Hz e 4,63 ppm com $J_{1,2} = 7,7$ Hz. Devido a ser a última subfração a ser eluída da coluna, sugere-se que a massa dos seus componentes seja menor ainda do que a massa da subfração E5. Portanto, sugeriu-se inicialmente a presença de monossacarídeos redutores.

Foi então realizada uma CCD (FIGURA 38) comparando os padrões puros de monossacarídeos L-ramnose, D-manose, D-galactose e D-glucose com a subfração E6, e de acordo com os valores de Rf ($Rf_{\text{man}} = 0,48$; $Rf_{\text{glc}} = 0,42$; $Rf_{\text{E6}} = 0,45$) foi possível sugerir a presença de D-manose e D-glucose.

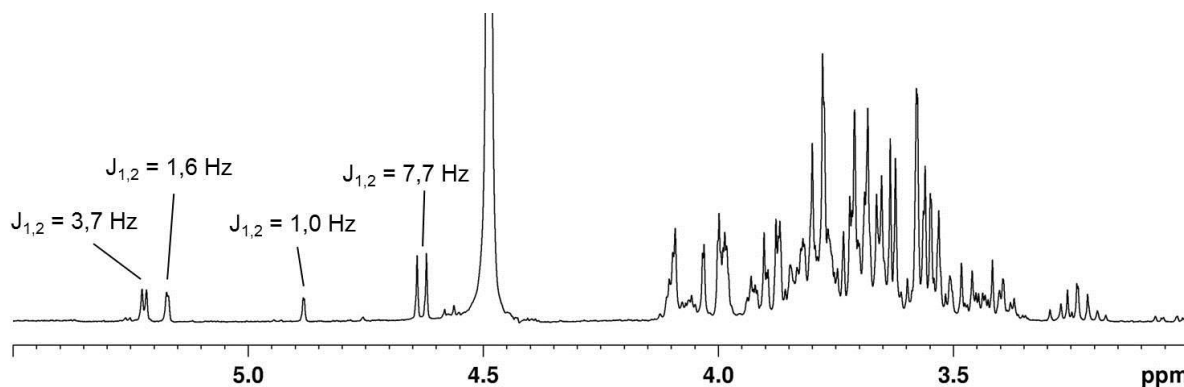


FIGURA 37 - ESPECTRO DE RMN DE ^1H DA SUBFRAÇÃO E6. TEMPERATURA: 50°C. SOLVENTE: D_2O

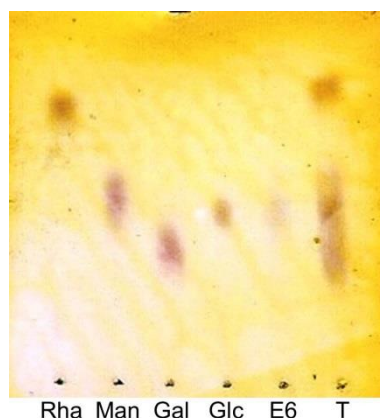


FIGURA 38 - CCD DE PADRÕES DOS MONOSSACARÍDEOS L-RAMNOSE, D-MANOSE, D-GALACTOSE E D-GLUCOSE COM A SUBFRAÇÃO E6. T: TODOS OS PADRÕES (L-RAMNOSE, D-MANOSE, D-GALACTOSE E D-GLUCOSE). FASE MÓVEL: ACETATO DE ETILA : ETANOL : ÁGUA (3:2:1). REVELADOR: ORCINOL.

Para a D-manose, que tem um H-2 em posição equatorial, os valores típicos de $J_{1,2}$ são 1,6 Hz para acoplamento diequatorial (configuração α) e 0,8 Hz para acoplamento axial-equatorial (configuração β) (BUBB, 2003). Na FIGURA 37, as configurações α e β da D-manose foram confirmadas pelos valores de $J_{1,2} = 1,6$ Hz e $J_{1,2} = 1,0$, respectivamente.

A presença dos dois monossacarídeos foi confirmada pelo experimento de HSQC (FIGURA 39), que permitiu correlacionar os sinais de hidrogênio e carbono (CASPER, 2013). Os sinais referentes aos carbonos estão de acordo com BOCK e

PEDERSEN (1983). As estruturas dos monossacarídeos identificados são mostradas na FIGURA 40.

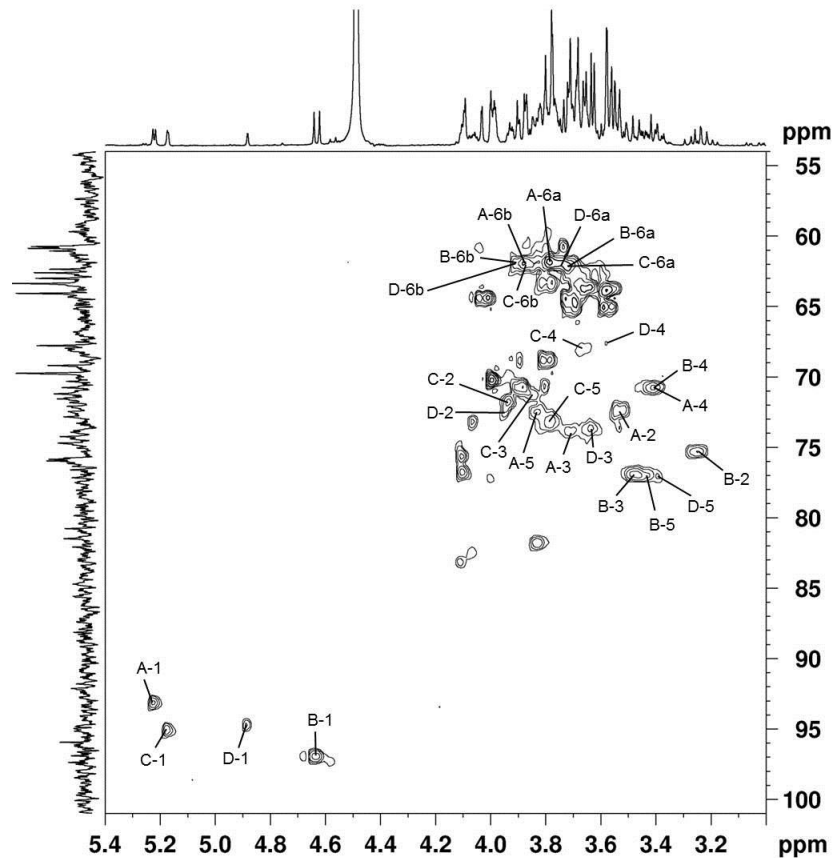


FIGURA 39 - ESPECTRO DE HSQC DA SUBFRAÇÃO E6. A: α -D-GLUCOSE, B: β -D-GLUCOSE, C: α -D-MANOSE, D: β -D-MANOSE. TEMPERATURA: 50°C. SOLVENTE: D₂O

Além das correlações assinaladas, pode-se observar a presença de outras correlações mais intensas, as quais não foram identificadas. Tais correlações (em 81,7/3,82 ppm; 64,3/4,04/4,0 ppm; 65,0/3,70 ppm, 65,0/3,57 ppm, 63,8/3,57 ppm) podem ser referentes a impurezas.

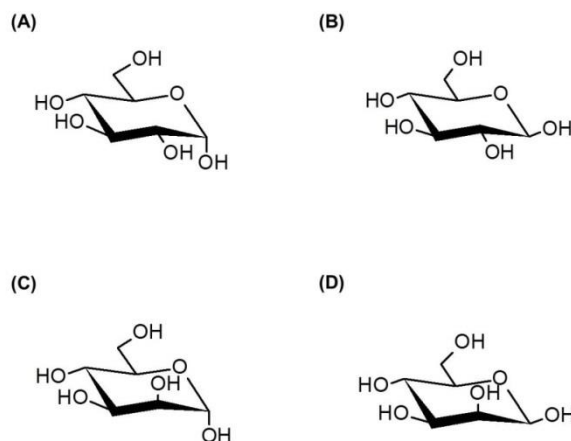


FIGURA 40 - ESTRUTURA DOS MONOSSACARÍDEOS α -D-GLUCOSE (A), β -D-GLUCOSE (B), α -D-MANOSE (C) e β -D-MANOSE (D)

4.4.1.5 Panorama geral – Extrato E

Em um breve resumo do que foi apresentado até o momento, conclui-se que as subfrações E2, E3, E4 e E5 constituem cerca de 80% do extrato E. Os glicosídeos isolados são constituintes dos três principais glicolipídeos de membrana dos cloroplastos: o monogalactosildiacilglicerol (MGDG), o digalactosildiacilglicerol (DGDG) e o sulfoquinovosildiacilglicerol (SQDG). Juntos, os glicolipídeos correspondem a aproximadamente 90% dos lipídeos de membrana dos cloroplastos (SHIMOJIMA, 2011; SHAIKH *et al.*, 2013).

Entretanto, as subfrações foram isoladas na forma não esterificada, e são necessários estudos para determinar a função deste tipo de molécula nas microalgas. Além disto, outra perspectiva é levantada: determinar se essas estruturas realmente são as responsáveis pela atividade bioestimulante vegetal do extrato, já que constituem 80% do total, e se atuam isoladamente ou em conjunto.

4.4.2 Caracterização Química da Fração Pak

A fração Pak, obtida a partir de extração alcalina com NaOH 0,5 M, foi analisada em relação à sua homogeneidade, e apresentou um perfil polidisperso e heterogêneo (FIGURA 41). Entre 35 e 40 minutos, foi identificado um composto de alta massa molecular pelo detector de espalhamento de luz, porém em pequena concentração (detector de índice de refração). Outro composto de alta massa molecular foi identificado pelo detector de espalhamento de luz e também pelo de índice de refração, entre 45 e 60 minutos, indicando que está em maior concentração. Após 60 min, compostos de baixa massa molecular foram identificados em um conjunto de picos heterogêneos pelo detector de índice de refração.

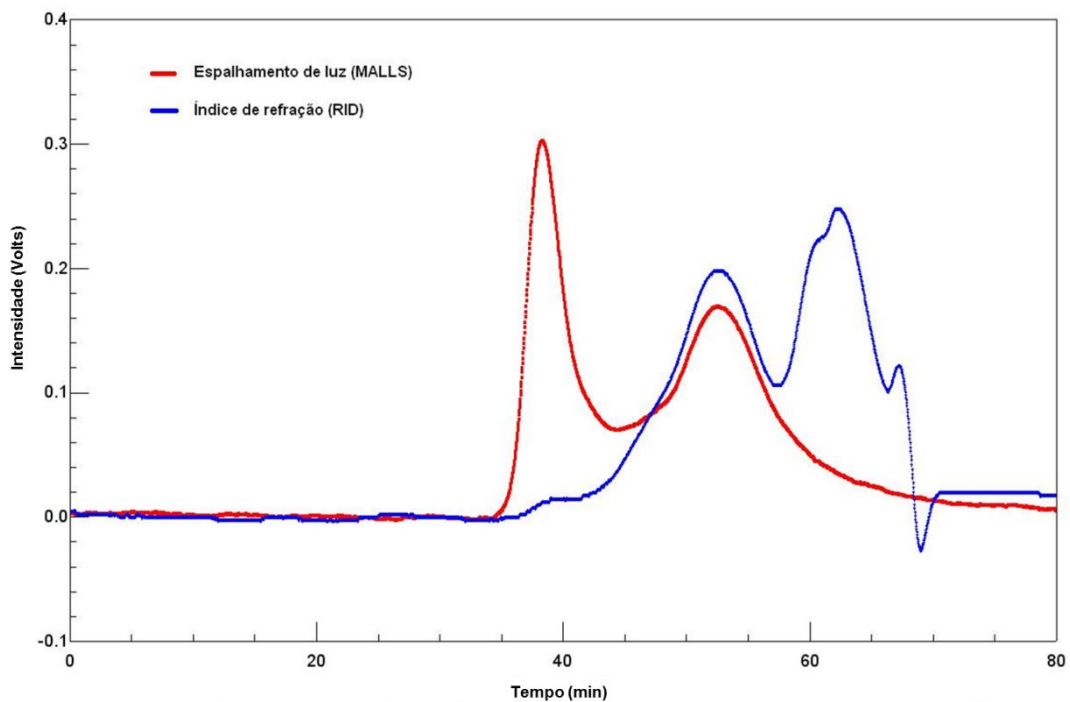


FIGURA 41 - PERFIL DE ELUIÇÃO POR HPSEC-MALLS-RID DA FRAÇÃO Pak

Através das análises de composição monossacarídica da fração Pak (TABELA 3 – página 30), observou-se predominância do monossacarídeo glucose, cerca de 88%, sugerindo fortemente a presença de uma glucana.

O espectro de ^{13}C da fração Pak apresenta um sinal em 99,6 ppm característico de anomeridade α . O deslocamento químico em 77,2 ppm corresponde ao C-4 de unidades de glucose em ligação α -(1 \rightarrow 4), enquanto os sinais referentes aos outros carbonos do anel, C-2, C-3 e C-5, aparecem em 71,7 ppm, 73,3 ppm e 71,2 ppm. Em 60,5 ppm está o sinal do C-6 livre das unidades monossacarídicas (RIZZI, 2010; MACHADO, 2011) (FIGURA 42).

Os assinalamentos da fração Pak, em conjunto com os dados de composição monossacarídica na qual há 88% de glucose, indicam a presença de uma α -glucana (1 \rightarrow 4) ligada (amilose), polissacarídeo linear de reserva de algas (FIGURA 43).

Os assinalamentos assemelham-se aos encontrados em extratos da microalga verde *Tetraselmis gracilis* (Chlorophyta) e da microalga vermelha *Porphyridium cruentum* (Rodophyta) (RIZZI, 2010; MACHADO, 2011). Os espectros de RMN obtidos por RIZZI (2010) e MACHADO (2011) permitem visualizar outros sinais de menor intensidade referentes à ramificações, o que caracteriza o polímero

como uma amilopectina. O espectro de ^{13}C da fração Pak não permitiu o assinalamento destes carbonos característicos de ramificação devido à baixa resolução do espectro. Porém, não é descartada a possibilidade de que estes assinalamentos estejam presentes. Outros solventes ou até o aumento da temperatura de análise poderiam ser testados a fim de confirmar a presença ou ausência de ramificação.

A amilose também está presente em extratos alcalinos da biomassa do fotobionte *Trebouxia* sp. (CORDEIRO *et al.*, 2003, CORDEIRO *et al.*, 2005), e compõe o principal polissacarídeo extracelular da microalga *Dunaliella tertiolecta* (GOO *et al.*, 2013). Os assinalamentos químicos em comparação com a literatura estão organizados na TABELA 9.

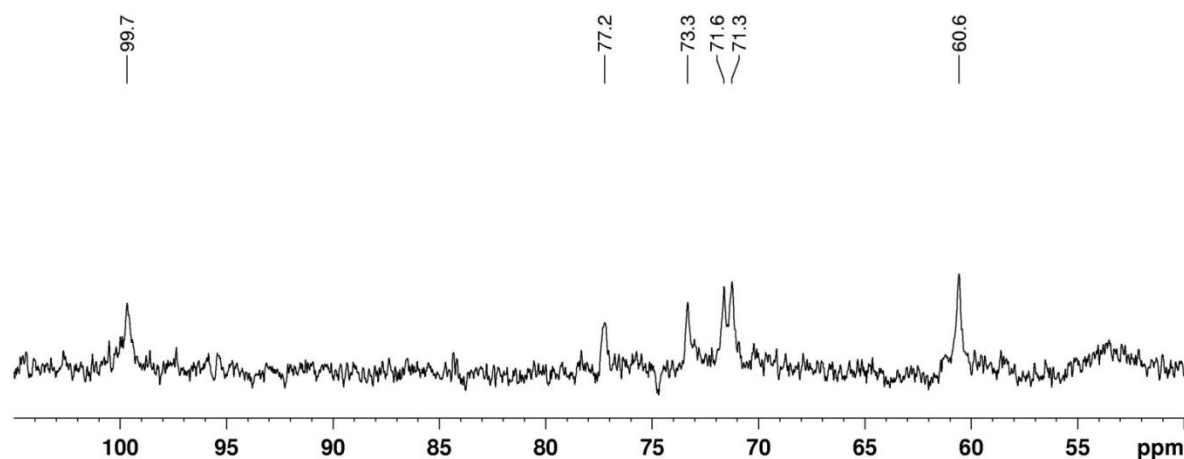


FIGURA 42 - ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DA FRAÇÃO Pak. TEMPERATURA: 50°C. SOLVENTE: D_2O

TABELA 9 - DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DE ^{13}C (ppm) DA FRAÇÃO Pak

| Unidade | α -glucana (1 \rightarrow 4) ligada ^a | α -glucana (1 \rightarrow 4) ligada ^b | α -glucana (1 \rightarrow 4) ligada ^c | α -glucana (1 \rightarrow 4) ligada ^d | α -glucana (1 \rightarrow 4) ligada ^e |
|---|---|---|---|---|---|
| \rightarrow 4)- α -D-Glcp-(1 \rightarrow | | | | | |
| C-1 | 99,6 | 99,7 | 99,7 | 99,9 | 99,6 |
| C-2 | 71,7 | 71,7 | 71,6 | 71,9 | 71,5 |
| C-3 | 73,3 | 73,4 | 73,4 | 73,1 | 73,3 |
| C-4 | 77,2 | 77,4 | 77,3 | 78,8 | 76,8 |
| C-5 | 71,2 | 71,3 | 71,3 | 71,5 | 71,2 |
| C-6 | 60,5 | 60,7 | 60,6 | 60,5 | 60,4 |

^a Presente estudo. Solvente utilizado: D_2O

^b RIZZI, 2010. Solvente utilizado: D_2O .

^c MACHADO, 2011. Solvente utilizado: D_2O .

^d CORDEIRO *et al.*, 2003. Solvente utilizado: d_6 -DMSO.

^e GOO *et al.*, 2013. Solvente utilizado: D_2O .

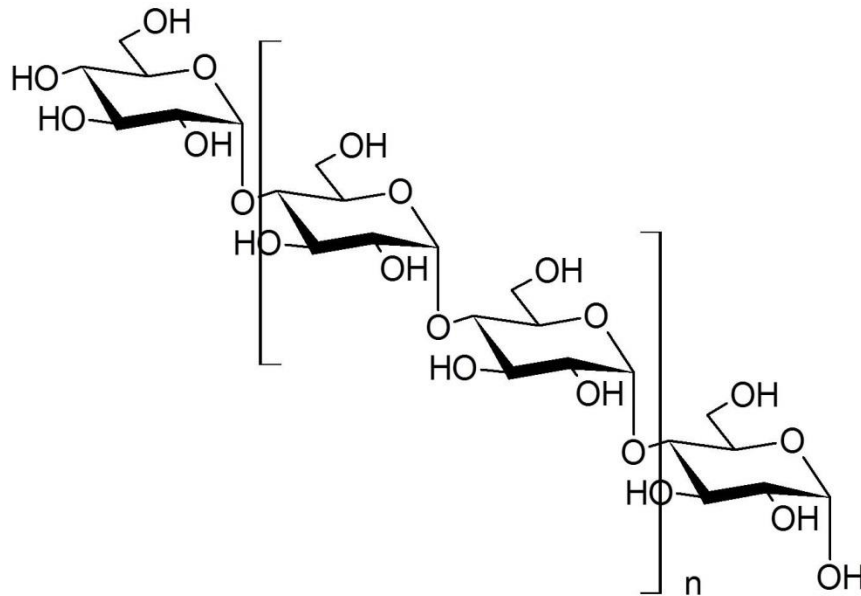


FIGURA 43 - ESTRUTURA PROPOSTA PARA FRAÇÃO Pak: α -GLUCANA (1 \rightarrow 4) LIGADA

4.4.3 Caracterização Química da Fração Pwh

A fração Pwh foi analisada quanto à sua homogeneidade (FIGURA 44), e apresentou um perfil heterogêneo, como pode ser observado na detecção por índice de refração. Na região entre 35 e 40 min, observa-se que há presença de um composto de alta massa molecular (detector de espalhamento de luz), em pequena quantidade (não detectado pelo índice de refração). Entre 50 e 70 min são observados vários picos correspondentes a moléculas com diferentes massas moleculares.

A fim de separar estes compostos, foi realizada uma ultrafiltração em membrana de 30 kDa, e as frações geradas Pwh-E30 (eluída) e Pwh-R30 (retida) apresentaram 46,1% e 30,7% de rendimento em relação à fração bruta, respectivamente. Após diálise fechada contra água MilliQ (membrana *cut off* de 6 a 8 kDa), a fração Pwh-E30 apresentou 10,5% de rendimento e a fração Pwh-R30 apresentou 21% de rendimento. Os perfis de eluição são apresentados na FIGURA 44.

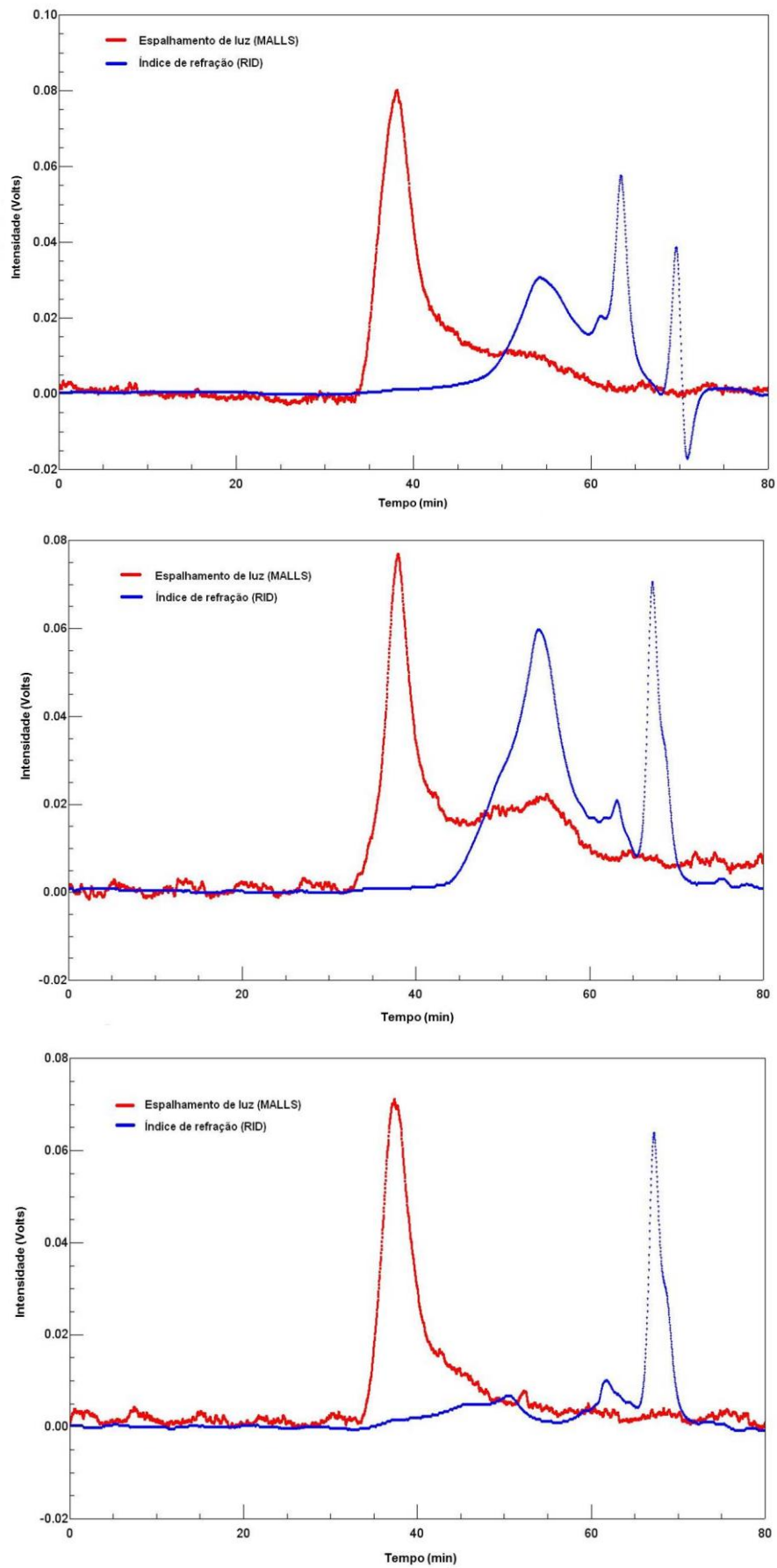


FIGURA 44 - PERFIL DE ELUIÇÃO POR HPSEC-MALLS-RID DAS FRAÇÕES Pwh (A), Pwh-E30 (B) e Pwh-R30 (C)

Como pode ser observado, a tentativa de purificação por ultrafiltração não foi eficaz, uma vez que os cromatogramas permaneceram muito semelhantes ao da fração bruta, no que diz respeito ao espalhamento de luz. Entretanto, pode ser observado no cromatograma da fração Pwh-R30 que houve uma redução significativa do tamanho dos picos detectados pelo índice de refração na região de 50 a 65 min, enquanto no cromatograma da fração Pwh-E30, esses picos ficaram mais intensos quando comparados com a fração bruta.

Outros tratamentos poderiam ser aplicados para a purificação da fração Pwh. O rendimento de Pwh-E30 e Pwh-R30 foi muito baixo, por isso não foi possível prosseguir as análises com estas frações. Entretanto, foi realizada a análise de RMN de ^{13}C da fração bruta Pwh, que será discutido a seguir.

A análise de composição monossacarídica (TABELA 3, página 30) apresentou como principais constituintes dessa fração a glucose (59%) e a manose (21%). Na FIGURA 45 pode-se observar o espectro de RMN de ^{13}C da fração Pwh. Na região anomérica, foi observado um sinal majoritário em 100,2 ppm. Em 60,7 ppm há um sinal intenso que foi assinalado como pertencente a C-6 não ligado de hexoses (RIZZI, 2010). Na região entre 67 e 78 ppm observam-se sinais referentes aos carbonos do anel. Na região de 40 a 22 ppm foram observados sinais sugestivos de carbonos metilênicos e metílicos de cadeias laterais de aminoácidos, corroborando com o alto teor de proteína (49,5%) dessa fração (TABELA 3, página 30) (BREITMAIER e VOELTER, 1990).

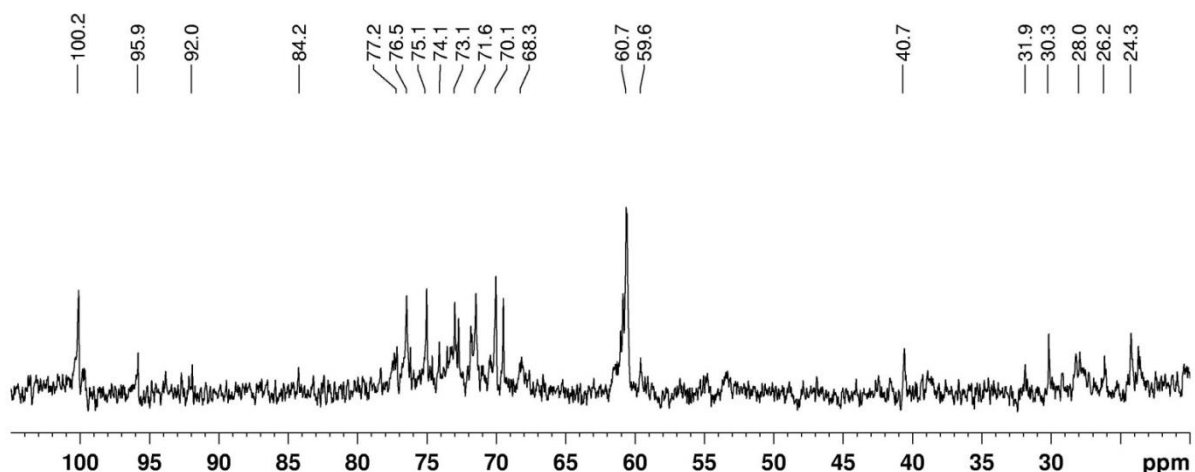


FIGURA 45 - ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DA FRAÇÃO Pwh. TEMPERATURA: 50°C. SOLVENTE: D_2O

Devido à impureza e complexidade desta fração, é necessária a purificação para uma melhor caracterização estrutural dos componentes.

5 CONCLUSÕES

Os resultados das análises químicas e espectroscópicas das subfrações E2, E3, E4, E5 e E6, obtidas após fracionamento do extrato aquoso E por cromatografia de exclusão em Bio-Gel P-2, sugerem que a microalga *S. subspicatus* possui os seguintes glicosídeos: 6-sulfo- α -D-quinovopiranos- α -(1 \rightarrow 1)-glicerol (E2 e E3), α -D-galactopiranos-(1 \rightarrow 6)- β -D-galactopiranos-(1 \rightarrow 1)-glicerol (E4), β -D-galactopiranos-(1 \rightarrow 1)-glicerol (E5). Além disso, a fração E6 possui os monossacarídeos α - e β -D-manose e α - e β -D-glucose (E6). Acredita-se que, em parte, estes glicosídeos e monossacarídeos podem estar relacionados à atividade bioestimulante do crescimento vegetal promovida pela fração E, que é estatisticamente igual ao produto comercial proveniente da macroalga *Ascophyllum nodosum*. Entretanto, são necessários mais estudos para elucidar todos os componentes desse extrato, e mais ensaios biológicos para caracterizar o mecanismo pelo qual eles estimulam o crescimento vegetal, e também se eles atuam em conjunto ou isoladamente.

A partir do extrato alcalino obteve-se uma α -glucana (1 \rightarrow 4) ligada, ou amilose, polissacarídeo de reserva de algas e já descrita para outras microalgas. A amilose foi testada quanto à sua atividade bioestimulante vegetal, porém não apresentou resultado positivo.

REFERÊNCIAS

ALGAE BASE, < <http://www.algaebase.org/>>. Acesso em 17/07/2013.

ANDRIANASOLO, E. H.; HARAMATY, L.; VARDI, A.; WHITE, E.; LUTZ, R.; FALKOWSKI, P. Apoptosis-Inducing galactolipids from a cultured marine diatom, *Phaeodactylum tricornutum*. **Journal of Natural Products**. v. 71, p. 1197-1201, 2008.

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

AZIZ, A.; POINSSOT, B.; DAIRE, X.; ADRIAN, M.; BÉZIER, A.; LAMBERT, B.; JOUBERT, J. M.; PUGIN, A. Laminaran elicits defense responses in grapevine and induces protection against *Botrytis cinerea* and *Plasmopara viticola*. **Molecular Plant Microbe Interaction**. v. 16, p. 1118-1128, 2003.

BANSAL, M. P.; JASWAL, S. Hypercholesterolemia induced oxidative stress is reduced in rats with diets enriched with supplement from *Dunaliella salina* algae. **American Journal of Biomedical Sciences**. v.1, p. 196-204, 2009.

BARDIVIESSO, D. M.; BACKES, C.; VILLAS BOAS, R. L.; SANTOS, A. J. M.; LIMA, C. P. Aplicação foliar de extrato de alga na cultura da batata. **Horticultura Brasileira**. v. 29, p. 1170-1177, 2011.

BENSON, A. A., DANIEL, H., WISER, R. A sulfolipid in plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 45, p. 1582-1587, 1959.

BERTOLDI, F. C.; SANT'ANNA, E.; OLIVEIRA, J. L. B. Revisão: Biotecnologia de microalgas. **B. Ceppa**. v. 25, p. 9-20, 2008.

BICUDO, C. E. de M.; MENEZES, M. **Gêneros de algas de águas continentais do Brasil. Chave para identificação e descrições**. 2. ed. São Paulo: Rima Editora, 2005.

BOCK, K.; PEDERSEN, C. Carbon-13 nuclear magnetic resonance Spectroscopy of monosaccharides. **Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry**, v. 41, p. 27-66, 1983.

BONJOUKLIAN, R.; SMLTKA, T. A.; DOOLN, L. E.; MOLLOY, R. M.; DEBONO, M.; SHAFFER, S. A.; MOORE, R. E.; STEWART, J. B.; PATTERSON, G. M. L. Tijnpanazoles, New Antifungal Agents from the Blue-Green Alga *Tolypothrix tjipanansensis*. **Tetrahedron**. v. 47, p. 7739-7750, 1991.

BOROWITZKA, M. A. Microalgae as sources of pharmaceuticals and other biologically active compounds. **Journal of Applied Phycology**. v. 7, p. 3-15, 1995.

BREITMAIER, E., VOELTER, W. ^{13}C NMR spectra of natural products. in: **Carbon-13 NMR Spectroscopy. High-resolution methods and applications in organic chemistry and biochemistry**. Third edition, New York, VCH, pp. 327-467, 1990.

BRUCE, D. L.; DUFF, D. C. B.; ANTIA, N. J. The identification of two antibacterial products of the marine planktonic alga *Isochrysis galbana*. **Journal of General Microbiology**. v. 48, p. 293-298, 1967.

BUBB, W. A. NMR Spectroscopy in the study of carbohydrates: characterizing the structural complexity. **Concepts in Magnetic Resonance Part A**, v. 19, p. 1-19, 2003.

CANTER-LUND, H.; LUND, J. W. G. **Freshwater algae. Their microscopic world explored**. Bristol, England: Bioress Ltd., 1995.

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

CARTER, H. E., MCCLUER, R. H., SLIFER, E. D. Lipids of wheat flour. I. Characterization of galactosylglycerol components. **Journal of the American Chemical Society**. v. 78, p. 3735-3738, 1956.

CASPER, <<http://www.casper.organ.su.se/casper/index.php>>. Stockholm University. Acesso em 20/06/2013.

CHANDÍA, N. P.; MATSUHIRO, B. Characterization of a fucoidan from *Lessonia vadosa* (Phaeophyta) and its anticoagulant and elicitor properties. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 42, p. 235-240, 2008.

CHEN, F. High cell density culture of microalgae in heterotrophic growth. **Tibtech**. v. 14, p. 421-426, 1996.

CHENG, Y. S.; ZHENG, Y.; LABAVITCH, J. M.; VANDERGHEYNST, J. S. The impact of cell wall carbohydrate composition on the chitosan flocculation of *Chlorella*. **Process Biochemistry**. v. 46, p. 1927-1933, 2011.

CHERNG, J. Y.; SHIH, M. F. Preventing dyslipidemia by *Chlorella pyrenoidosa* in rats and hamsters after chronic high fat diet treatment. **Life Sciences**, v. 76 p. 3001–3013, 2005.

CHU, C. Y.; LIAO, W. R.; HUANG, R.; LIN, L. P. Haemagglutinating and antibiotic activities of freshwater microalgae. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 20, p. 817–825, 2004.

CLUZET, S.; TORREGROSA, S.; JACQUET, C.; LAFITTE, C.; FOURNIER, J.; MERCIER, L.; SALAMAGNE, S.; BRIAND, X.; ESQUERRÉ-TUGAYÉ, M. T.; DUMAS, B. Gene expression profiling and protection of *Medicago truncatula* against a fungal infection in response to an elicitor from green algae *Ulva* spp. **Plant, Cell and Environment**. v. 27, p. 917-928, 2004.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de cromatografia**. São Paulo: Editora Unicamp, 2006.

CORDEIRO, L. M. C.; CARBONERO, E. R.; SASSAKI, G. L.; REIS, R. A.; STOCKER-WORGOTTER, E.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. A fungus-type β -galactofuranan in the cultivated *Trebouxia* photobiont of the lichen *Ramalina gracilis*. **FEMS Microbiology Letters**. v. 244, p. 193-198, 2005.

CORDEIRO, L. M. C.; REIS, R. A.; TISCHER, C. A.; GORIN, P. A. J.; FERREIRA, J. C.; IACOMINI, M. Linear β -mannose-containing polysaccharide, β -xylan, and amylose from the cultured photobiont *Trebouxia* sp. of the ascolichen *Ramalina celastri*. **FEMS Microbiology Letters**. v. 220, p. 89-94, 2003.

CUONG, N. X.; MINH, C. V.; KIEM, P. V.; HUONG, H. T.; BAN, N. K.; NHIEM, N. X.; TUNG, N. H.; JUNG, J. W.; KIM, H. J.; KIM, S. Y.; KIM, J. A.; KIM, Y. H. Inhibitors of osteoclast formation from rhizomes of *Cibotium barometz*. **Journal of Natural Products**. v. 72, p. 1673-1677, 2009.

CRAIGIE, J. S. Seaweed extract stimuli in plant science and agriculture. **Journal of Applied Phycology**, v. 23, p. 371-393, 2011.

DANIEL, H., MIYANO, M., MUMMA, R. O., YAGI, T., LEPAGE, M., SHIBUYA, I., BENSON, A. A. The plant sulfolipid. Identification of 6-sulfo-quinovose. **Journal of the American Chemical Society**. v. 83, p. 1765 – 1766, 1961.

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

DHARGALKAR, V. K.; PEREIRA, N. Seaweed: Promising plant of the millennium. **Science and Culture**. v. 71, p. 60-66, 2005

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

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

EL GAMAL, A. A. Biological importance of marine algae. **Saudi Pharmaceutical Journal**. v. 18, p. 1-34, 2010.

FAO. **FAO Statistical Yearbook 2013**. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/018/i3107e/i3107e00.htm>>. Acesso em: 25/07/2013.

FERRINI, F.; NICESE, F. P. Response of English oak (*Quercus robur* L.) trees to biostimulants application in the urban environment. **Journal of Arboriculture**. v. 28, p. 70-75, 2002.

FUENTES, M. M. R., SÁNCHEZ, J. L. G., SEVILLA, J. M. F., FERNÁNDEZ, F. G. A., PÉREZ, J. A. S., GRIMA, E. M. Outdoor continuous culture of *Porphyridium cruentum* in a tubular photobioreactor: quantitative analysis of the daily cyclic variation of culture parameters. **Journal of Biotechnology**. v. 70, p. 271-288, 1999.

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

GHASEMI, Y.; MORADIAN, A.; MOHAGHEGHZADEH, A.; SHOKRAVI, S.; MOROWVAT, M. H. Antifungal and antibacterial activity of the microalgae collected from paddy fields of Iran: characterization of antimicrobial activity of *Chroococcus dispersus*. **Journal of Biological Sciences**. v. 7, p. 904-910, 2007.

GHEYSEN, K., MIHAI, C., CONRATH, K., MARTINS, J. C. Rapid identification of common hexapyranose monosaccharide units by a simple TOCSY matching approach. **Chemistry - A European Journal**. v. 14, p. 8869-8878, 2008.

GLADUE, R. M.; MAXEY, J. E. Microalgal feeds for aquaculture. **Journal of Applied Phycology**. v. 6, p. 131-141, 1994.

GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, C.; BALLESTEROS, M. Linking microalgae and cyanobacteria culture conditions and key-enzymes for carbohydrate accumulation. **Biotechnology Advances**. v. 30, p.1655-1661, 2012.

GOO, B. G.; BAEK, G.; CHOI, D. J.; PARK, Y. I.; SYNITSYA, A.; BLEHA, R.; SEONG, D. H.; LEE, C. G.; PARK, J. K. Characterization of a renewable extracellular polysaccharide from defatted microalgae *Dunaliella tertiolecta*. **Bioresource Technology**. v. 129, p. 343-350, 2013.

GOUVEIA, L.; BATISTA, A. P.; SOUSA, I.; RAYMUNDO, A.; BANDARRA, N. M. Microalgae in Novel Food Products. In: **Food Chemistry Research Developments**. Nova Science Publishers. Cap. 2, p. 1-37, 2008.

GRANADO-LORENCIO, F.; HERRERO-BARBUDO, C.; ACIÉN-FERNÁNDEZ, G.; MOLINA-GRIMA, E.; FERNÁNDEZ-SEVILLA, J. M.; PÉREZ-SACRISTÁN, B.; BLANCO-NAVARRO, I. *In vitro* bioaccessibility of lutein and zeaxanthin from the microalgae *Scenedesmus almeriensis*. **Food Chemistry**. v. 114, p. 747-752, 2009.

GRANUM, E.; KIRKVOLD, S.; MYKLESTAD, S. M. Cellular and extracellular production of carbohydrates and amino acids by the marine diatom *Skeletonema costatum*: diel variations and effects of N depletion. **Marine Ecology and Progress Series**. v. 242, p. 83-94, 2002.

GUERRINI, F.; CANGINI, M.; BONI, L.; TROST, P.; PISTOCCHI, R. Metabolic responses of the diatom *Achnanthes brevipes* (Bacillariophyceae) to nutrient limitation. **Journal of Phycology**. v. 36, p. 882-890, 2000.

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

GUSTAFSON, K. R.; CARDELLINA II, J. H.; FULLER, R. W.; WEISLOW, O. S.; KISER, R. F., SNADER, K. M., PATTERSON, G. M. L.; BOYD, M. R. AIDS-antiviral sulfolipids from cyanobacteria (Blue green algae). **Journal of the National Cancer Institute.** v. 81, p. 1254–1258, 1989.

HARUN, R., SINGH, M., FORDE, G. M., DANQUAH, M. K. Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products. **Renewable and Sustainable Energy Reviews.** v. 14, p. 1037-1047, 2010.

HOA, L. T. P.; QUANG, D. N.; HA, N. T. H.; TRI, N. H. Isolating and screening mangrove microalgae for anticancer activity. **Research Journal of Phytochemistry.** v. 5, p. 156-162, 2011.

HO, S. H.; CHEN, C. Y.; CHANG, J. S. Effect of light intensity and nitrogen starvation on CO₂ fixation and lipid/carbohydrate production of an indigenous microalga *Scenedesmus obliquus* CNW-N. **Bioresource Technology.** v. 113, p. 244-252, 2012.

HUHEIEL, M.; ISHANU, V.; TAL, J.; ARAD, J. (Malis). Activity of *Porphyridium* sp. polysaccharide against herpes simplex viruses in vitro and in vivo. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 50, p. 189-200, 2002.

JAKI, B.; ORJALA, J.; STICHER, O. A novel extracellular diterpenoid with antibacterial activity from the Cyanobacterium *Nostoc commune*. **Journal of Natural Products**, v. 62, p. 502-503, 1999.

KHAN, W.; RAYIRATH, U. P.; SUBRAMANIAN, S.; JITHESH, M. N.; RAYORATH, P.; HODGES, D. M.; CRITCHLEY, A. T.; CRAIGIE, J. S.; NORRIE, J.; PRITHIVIRAJ, B. Seaweed extracts as biostimulants of plant growth and development. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 28, p. 386–399, 2009.

KLARZYNSKI, O.; DESCAMPS, V.; PLESSE, B.; YVIN, J. C.; KLOAREG, B.; FRITIG, B. Sulfated fucan oligosaccharides elicits defense responses in tobacco and local and systemic resistance against tobacco mosaic virus. **Molecular Plant-Microbe Interactions.** v. 16, p. 115-122, 2003.

KLARZYNSKI, O.; PLESSE, B.; JOUBERT, J. M.; YVIN, J. C.; KOPP, M.; KLOAREG, B.; FRITIG, B. Linear β -1,3 glucans are elicitors of defense responses in tobacco. **Plant physiology**. v. 124, p. 1027-1037, 2000.

KOYAMA, R., BETTONI, M. M., RODER, C., ASSIS, A. M., ROBERTO, S. R., MÓGOR, A. F. Extrato da alga *Ascophyllum nodosum* (L.) Le Jolis no desenvolvimento vegetativo e na produção do tomateiro. **Revista Ciência Agrária**. v. 55, p. 282-287, 2012.

LEE, R. E. **Phycology**. Quarta edição. Colorado, USA. Editora Cambridge University Press. 2008.

LEWIS, B. A., SMITH, F. Sugars and derivatives. in: STHAL, E. **Thin-Layer Chromatography. A laboratory handbook**. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Second Edition, New York, pp. 807-834, 1969.

LIPTÁK, A., BALLA, E., JÁNOSSY, L., SAJTOS, F., SZILÁGYI, L. The first synthesis of secondary sulfonic acids by nucleophilic displacement reactions. **Tetrahedron Letters**. v. 45, p. 839-842, 2004.

LOMBARDI, A. T.; HIDALGO, T. M. R.; VIEIRA, A. A. H. Copper complexing properties of dissolved organic materials exuded by the freshwater microalgae *Scenedesmus acuminatus* (Chlorophyceae). **Chemosphere**. v. 60, p. 453-459, 2005.

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

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

MACHADO, T. W. M. **Estrutura Química de Polissacarídeos e Atividade Antioxidante de Extratos de Microalgas Marinhas**. 98 p. Dissertação (Mestrado em Ciências – Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

MATA, T. M.; MARTINS, A. A.; CAETANO, N. S. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. v. 14, p. 217-232, 2010.

MAZUR, H.; KONOP, A.; SYNAK, R. Indole-3-acetic acid in the culture medium of two axenic green microalgae. **Journal of Applied Phycology**. v. 13, p. 35-42, 2001.

MERCIER, L.; LAFITTE, C.; BORDERIES, G.; BRIAND, X.; ESQUERRÉ-TUGAYÉ, M. T.; FOURNIER, J. The algal polysaccharide carrageenans can act as an elicitor of plant defense. **New phytologist**. v. 149, p. 43-51, 2001.

MIYANO, M., BENSON, A.A. The plant sulfolipid. VI. Configuration of the glycerol moiety. **Journal of the American Chemical Society**. v. 84, p. 57–59, 1962a.

MIYANO, M., BENSON, A.A. The plant sulfolipid. VII. Synthesis of 6-sulfo- α -D-quinovopyranosyl-(1 \rightarrow 1')-glycerol and radiochemical syntheses of sulfolipids, **Journal of the American Chemical Society**. v. 84, p. 59–62, 1962b.

MÓGOR, A. F.; ONO, E. O.; RODRIGUES, J. D.; MÓGOR, G. Aplicação foliar de extrato de alga, ácido L-glutâmico e cálcio em feijoeiro. **Scientia Agraria**. v.9, p. 431-437, 2008.

MÓGOR, G.; NOSEDA, M. D.; MÓGOR, A. F.; NOSEDA, M. E. D. **Ação bioestimulante do extrato e suspensões de microalga *Scenedesmus* sp.** 0000221112334151, 26 Dez., 2011.

MOLNÁR, Z., ÖRDÖG, V. Microalgal and cyanobacterial extracts in the tissue cultures of higher plants (pea, tobacco, beet). **Acta Biologica Szegediensis**. v. 49, p. 39-40, 2005.

NODA, K.; OHNO, N.; TANAKA, K.; KAMIYA, N.; OKUDA, M.; YADOMAE, T.; NOMOTO, K.; SHOYAMA, Y. A water-soluble antitumor glycoprotein from *Chlorella vulgaris*. **Planta Medica**, v. 62, p. 423-426, 1996.

OGBONNA, J. C.; TANAKA, H. Night biomass loss and changes in biochemical composition of cells during light/dark cyclic culture of *Chlorella pyrenoidosa*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 82, p. 558-564, 1996.

OHSE, S.; DERNER, R. B.; OZÓRIO, R. A.; BRAGA, M. V. C.; CUNHA, P.; LAMARCA, C. P.; SANTOS, M. E. Crescimento de microalgas em sistema autotrófico estacionário. **Revista Biotemas**. v. 21, p. 7-18, 2008.

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

ÖRDÖG, V., STIRK, W.A., VAN STADEN, J., NOVÁK, O., STRNAD, M. Endogenous cytokinins in three genera of microalgae from the Chlorophyta. **Journal of Phycology**. v. 40, p. 88-95, 2004a.

ÖRDÖG, V.; STIRK, W. A.; LENOBEL, R.; BANCÍROVÁ, M.; STRNADS, M.; VAN STADEN, J.; SZIGETI, J.; N'EMETH, L. Screening microalgae for some potentially useful agricultural and pharmaceutical secondary metabolites. **Journal of Applied Phycology**. v. 16, p. 309–314, 2004b.

PAULERT, R.; TALAMINI, V.; CASSOLATO, J. E. F.; DUARTE, M. E. R.; NOSEDA, M. D.; SMANIA JR, A.; STADINIK, M. J. Effects of sulfated polysaccharide and alcoholic extracts from green seaweed *Ulva fasciata* on anthracnose severity and growth of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Journal of Plant Diseases and Protection**. v. 116, p. 263–270, 2009.

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

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

PULZ, O.; GROSS, W. Valuable products from biotechnology of microalgae. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 65, p. 635–648, 2004.

RAMADAN, M. F.; ASKER, M. M. S.; IBRAHIM, K. Functional bioactive compounds and biological activities of *Spirulina platensis* lipids. **Czech Journal of Food Sciences**. v. 26, p. 211-222, 2008.

RASTRELLI, L.; TOMMASI, N. de; BERGER, I.; CACERES, A.; SARAVIA, A.; SIMONE, F. de. Glycolipids from *Byrsonima crassifolia*. **Phytochemistry**. v. 45, p. 647-650, 1997.

RATHORE, S. S.; CHAUDHARY, D. R.; BORICHA, G. N.; GHOSH, A.; BHATT, B. P.; ZODAPE, S. P.; PATOLIA, J. S. Effect of seaweed extract on the growth, yield and nutrient uptake of soybean (*Glycine max*) under rainfed conditions. **South African Journal of Botany**. v. 75, p. 351–355, 2009.

RESHEF, V., MIRZRACHI, E., MARETZKI, T., SILBERSTEIN, C., LOYA, S., HIZI, A., CARMELI, S. New acylated sulfoglycolipids and digalactolipids and related known glycolipids from cyanobacteria with a potential to inhibit the reverse transcriptase of HIV-1. **Journal of Natural Products**. v. 60, p. 1251-1260, 1997.

RIZZI, J. **Potencial biotecnológico dos polissacarídeos de microalgas marinhas**. 101 p. Dissertação (Mestrado em Ciências - Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

ROY, A. B., HEWLINS, M. J. E. An improved preparation of cyclohexylammonium allyl and D-glycer-1'-yl 6-deoxy-6-C-sulfonato- α -D-glucopyranosides. **Carbohydrate Research**. v. 310, p. 173-176, 1998.

RUBERTO, G., TRINGALI, C. Secondary metabolites from the leaves of *Feijoa sellowiana* Berg. **Phytochemistry**. v. 65, p. 2947-2951, 2004.

RUSSO, R. O., BERLYN, G. P. The use of organic biostimulants to help low input sustainable agriculture. **Journal of Sustainable Agriculture**. v. 1, p. 19-42, 1990.

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

SHAABAN, M. M. Green microalgae water extract as foliar feeding to wheat plants. **Pakistan Journal of Biological Science**, v. 4, p. 628-632, 2001.

SHAABAN, M. M.; EL-SAADY, A. K. M.; EL-SAYED, A. E. K. Green Microalgae Water Extract and Micronutrients Foliar Application as Promoters to Nutrient Balance and Growth of Wheat Plants. **Journal of American Science**. v. 6, p. 631-636, 2010.

SHAIKH, N.; COLOMBO, D.; RONCHETTI, F.; DANGATE, M. SQAGs: A stepping stone in the biotic world. **Comptes Rendus Chimie**. v. 16, p. 850-862, 2013.

SHANAB, S. M. M.; MOSTAFA, S. S. M.; SHALABY, E. A.; MAHMOUD, G. I. Aqueous extracts of microalgae exhibit antioxidant and anticancer activities. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**. v. 2, p. 608-615, 2012.

SHARMA, H. S. S.; FLEMING, C.; SELBY, C.; RAO, J. R.; MARTIN, T. Plant biostimulants: a review on the processing of macroalgae and use of extracts for crop

management to reduce abiotic and biotic stresses. *Journal of Applied Phycology*. p. 1-26. DOI 10.1007/s10811-013-0101-9. 2013.

SHENG, J.; YU, F.; XIN, Z.; ZHAO, L.; ZHU, X.; HU, Q. Preparation, identification and their antitumor activities *in vitro* of polysaccharides from *Chlorella pyrenoidosa*. **Food Chemistry**. v. 105, p. 533-539, 2007.

SHIBUYA, I.; BENSON, A. A. Hydrolysis of α -sulphoquinovosides by β -galactosidase. **Nature**. v. 192, p. 1186-1187, 1961.

SHIMOJIMA, M. Biosynthesis and functions of the plant sulfolipid. **Progress in Lipid Research**. v. 50, p. 234-239, 2011.

SON, B. W. Glycolipids from *Gracilaria verrucosa*. **Phytochemistry**. v. 29, p. 307-309, 1990.

SPINELLI, F.; FIORI, G.; NOFERINI, M.; SPROCATTI, M.; COSTA, G. Perspectives on the use of a seaweed extract to moderate the negative effects of alternate bearing in apple trees. **Journal of Horticultural Science & Biotechnology**. p. 131-137, 2009.

SPOLAORE, P.; JOANNIS-CASSAN, C.; DURAN, E.; ISAMBERT, A. Commercial Applications of Microalgae. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. v. 101, p. 87-96, 2006.

STENGEL, D. B.; CONNAN, S.; POPPER, Z. A. Algal chemodiversity and bioactivity: sources of natural variability and implications for commercial application. **Biotechnology Advances**. v. 29, p. 483-501, 2011.

STIRK, W. A.; BÁLINT, P.; TARKOWSKÁ, D.; NOVÁK, O.; STRNAD, M.; ÖRDÖG, V. Hormone profiles in microalgae: Gibberellins and brassinosteroids. **Plant Physiology and Biochemistry**. v. 70, p. 348-353, 2013.

STIRK, W. A.; ÖRDÖG, V.; VAN STADEN, J.; JAGER, K. Cytokinin- and auxin-like activity in Cyanophyta and microalgae. **Journal of Applied Phycology**, 14, 215-221, 2002.

SUÁREZ, E. R.; KRALOVEC, J. A.; NOSEDA, M. D.; EWART, H. S.; BARROW, C. J.; LUMSDEN, M. D.; GRINDLEY, T. B. Isolation, characterization and structural

determination of a unique type of arabinogalactan from an immunostimulatory extract of *Chlorella pyrenoidosa*. **Carbohydrate Research**. v. 340, p. 1489-1498, 2005.

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

SUN, L.; WANG, C.; SHI, Q.; MA, C. Preparation of different molecular weight polysaccharides from *Porphyridium cruentum* and their antioxidant activities. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 45, p. 42-47, 2009.

TANAKA, K.; SHOYAMA, Y.; YAMADA, A.; NODA, K.; KONISHI, F.; NOMOTO, K. Immunopotentiating effects of a glycoprotein from *Chlorella vulgaris* strain ck and its characteristics. **Bioactive Natural Products**. v. 25, p. 429-458, 2001.

TANAKA, M. T.; SENGIK, E.; SANTOS, H. S.; JÚNIOR, C. H.; SCAPIM, C. A.; SILVÉRIO, L.; KVITSCHAL, M. V.; ARQUEZ, I. C. Efeito da aplicação foliar de biofertilizantes, bioestimulantes e micronutrientes na cultura do tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.). **Acta Scientiarum Agronomy**. v. 25, n. 2, p. 315-321, 2003.

TARAKHOVSKAYA, E. R.; MASLOV, Y. I.; SHISHOVA, M. F. Phytohormones in algae. **Russian Journal of Plant Physiology**. v. 54, n. 2, p. 163-170, 2007.

UTEX, The Culture Collection of Algae. Disponível em: <<http://web.biosci.utexas.edu/utex/>>. Acesso em: 17/07/2013.

VEGA, B. O. A.; VOLTOLINA, D. Concentración, recuento celular y tasa de crecimiento. In: _____. **Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal**. La Paz, México, 2007.

VEGA, B. O. A.; ESQUIVEL, B. C.; VOLTOLINA, D. Determinación de carbohidratos por métodos espectrofotométricos. In: VEGA, B.O.A., VOLTOLINA, D. **Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomassa microalgal**. La Paz, México, 2007.

VIEIRA, E. L.; CASTRO, P. R. C. Ação de bioestimulante na germinação de sementes, vigor das plântulas, crescimento radicular e produtividade de soja. **Revista Brasileira de Sementes**. v. 23, n. 2, p. 222-228, 2001.

VOLTOLINA, D.; CORDERO, B.; NIEVES, M.; SOTO, L. P. Growth of *Scenedesmus* sp. in artificial wastewater. **Bioresource Technology**. v. 68, p. 265-268, 1998.

WANG, J.; HOLLINGSWORTH, R. I. The identification of glycerol-3-yl 6-deoxy-6-C-sulfo- α -D-glucopyranoside (glyceryl α -sulfoquinovoside) as a metabolite in *Rhizobium*, a non-photosynthetic organism. **Carbohydrate Research**. v. 307, p. 347-350, 1998.

WICKBERG, B. Isolation of 2-L-amino-3-hydroxyl-1-propane sulphonic acid from *Polysiphonia fastigiata*. **Acta Chemica Scandinavica**, v. 11, p. 506-511, 1957.

WICKBERG, B. Structure of a glyceritol glycoside from *Polysiphonia fastigiata* and *Corallina officinalis*. **Acta Chemica Scandinavica**. v. 12, p. 1183-1186, 1958a.

WICKBERG, B. Synthesis of 1-glyceritol D-galactopyranosides. **Acta Chemica Scandinavica**, v. 12, p. 1187-1201, 1958b.

XUE, C.; HU, Y.; SAITO, H.; ZHANG, Z.; LI, Z.; CAI, Y.; OU, C.; LIN, H.; IMBS, A. B. Molecular species composition of glycolipids from *Spirulina platensis*. **Food Chemistry**. v. 77, p. 9-13, 2002.