

SERGIO DONIZETI ASCENCIO

**HETEROSÍDEOS SINTETIZADOS POR LINHAGENS DE COR E
ESTÁDIOS REPRODUTIVOS DE MACROALGAS VERMELHAS DOS
GÊNEROS *Hypnea* E *Gracilaria***

Tese apresentada ao Curso de Pós-graduação em Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Miguel Daniel Nosedá

CURITIBA

2006

Orientador: Prof. Dr. Miguel Daniel Nosedá

Co-orientadora: Profa. Dra. Maria Eugênia Duarte Nosedá

Dedico esta tese a minha esposa
Poliana Guerino Marson Ascencio, com carinho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus pela minha existência, saúde e por todas as Graças que tenho recebido. Há coisas que vão além da Ciência.

Agradeço imensamente à minha esposa Poliana Guerino Marson Ascencio a quem dedico esta tese. Sua companhia, carinho, compreensão e sugestões foram essenciais para a realização deste trabalho.

Agradeço ao Prof. Dr. Miguel Daniel Nosedá, pela orientação e companheirismo durante todos os momentos deste trabalho. Obrigado pelos laços de amizade. À Profa. Dra. Maria Eugênia Duarte Nosedá pela co-orientação.

Agradeço especialmente aos meus pais Salvador Valero Ascêncio e Rosa Hadas Ascêncio, pelo incentivo, força e compreensão que tiveram em todos os desafios que a vida me proporcionou. Vocês são meus exemplos de amor, honestidade, trabalho e respeito.

A minhas irmãs, Eliane e Viviane, e a minhas sobrinhas amadas, Anna Paula, Giovanna e a mais nova da família Yasmin. Vossas demonstrações de amor e afeto as tornam especiais.

Agradeço a todos os colegas do Instituto de Botânica de São Paulo, Seção de Ficologia, que zelaram pelo cultivo das algas. Em especial a Dra. Nair S. Yokoya. Sua paciência e sabedoria servem hoje para mim como exemplo no exercício da docência. Não poderia deixar de lembrar a Dra. Mutue T. Fujii que muito nos ajudou na classificação e identificação de várias espécies de algas.

Agradeço também a Profa. Dra. Estela Maria Plastino e Dra. Suzana Ursi que além do material fornecido muito ajudaram na realização de parte deste trabalho.

Agradeço a Profa. Dra. Ana Lucia Mercê pela contribuição nos experimentos de Titulação Potenciométrica (dados não descritos neste trabalho) e RMN-¹³C.

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

Agradeço aos amigos de laboratório, Rosiane, Adriano, menina Paula, Marcos, Alan, Gisele, Alexandre e Diogo, pela ajuda e excelente convívio durante este período. Em especial ao Robson, por sua dedicação e perseverança nos experimentos em que me ajudou.

Um agradecimento muito especial à Profa. Dra. Guilhermina Noletto que foi mais que uma colaboradora, tornou-se uma amiga, além de conterrânea.

Aos amigos Prof. Dr. Renato, Lauro e Prof. Dr. Guilherme pela troca de informações.

Às bibliotecárias da UFPR, em especial a Ruth e Mariza, por preservarem pela qualidade das normas empregadas neste trabalho.

Ao PRONEX-Carboidratos, CAPES, CNPq e CEUL/ULBRA, pelo suporte financeiro.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	V
LISTA DE TABELAS	VIII
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	X
RESUMO	XII
ABSTRACT.....	XIII
1 INTRODUÇÃO	01
1.1 ALGAS: Aspectos Gerais	01
1.2 CLASSIFICAÇÃO DAS ALGAS	02
1.2.1 A Divisão Rhodophyta	03
1.3 CARBOIDRATOS EM ALGAS MARINHAS	05
1.3.1 Polissacarídeos da matriz e parede celular	05
1.3.2 Polissacarídeos de reserva	05
1.3.3 Carboidratos de baixa massa molecular	06
1.4 FREQUÊNCIA DE MUTAÇÃO EM RHODOPHYTA	13
1.5 O GÊNERO <i>Hypnea</i>	13
1.5.1 Diferenças bioquímicas entre as linhagens Marrrom e Verde de <i>H. musciformis</i>	14
1.6 O GÊNERO <i>Gracilaria</i>	15
1.6.1 A espécie <i>Gracilaria birdiae</i>	16
1.6.2 A espécie <i>Gracilaria domingensis</i>	17
1.7 COMPLEXAÇÃO DE CARBOIDRATOS COM METAIS	18
1.7.1 Vanádio	20

1.7.2 Estados de oxidação do vanádio	21
1.7.3 Compostos de Vanádio	21
1.7.4 Interação entre vanádio e carboidratos	22
2 OBJETIVOS	25
2.1 OBJETIVO GERAL.....	25
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
3 MATERIAIS E MÉTODOS	27
3.1 ESPÉCIES DE ALGAS ESTUDADAS	27
3.1.1 Alga <i>Hypnea musciformis</i>	27
3.1.2 Alga <i>Gracilaria domingensis</i>	31
3.1.3 Alga <i>Gracilaria birdiae</i>	32
3.2 EXTRAÇÃO DOS CARBOIDRATOS DE BAIXA MASSA MOLECULAR	34
3.2.1 Extração etanólica qualitativa dos CBMM	34
3.2.2 Extração etanólica quantitativa dos CBMM	36
3.3 OBTENÇÃO DOS PADRÕES DE HETEROSÍDEOS E SORBITOL	37
3.3.1 Técnicas cromatográficas preparativas	37
3.4 QUANTIFICAÇÃO DOS HETEROSÍDEOS FLORIDOSÍDEO E DIGENEASÍDEO	38
3.4.1 Análises por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	38
3.4.2 Parâmetros de quantificação por CLAE	39
3.5 ANÁLISES DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR.....	39
3.5.1 Técnicas de ressonância magnética nuclear monodimensionais	40
3.6 ESPECTROMETRIA DE MASSA	41

3.7 TRATAMENTO DO DIGENEASÍDEO COM RESINA CATIONICA (DOWEX 50-X8)	41
3.8 PREPARO DA AMOSTRAS DOS COMPLEXOS DIGENEASÍDEO-ÍON VANADILO PARA ANÁLISES POR RMN- ¹³ C	42
3.9 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	42
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
4.1 OBTENÇÃO DOS PADRÕES DE DIGENEASÍDEO E FLORIDOSÍDEO	43
4.2 VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE QUANTIFICAÇÃO POR CLAE	47
4.2.1 Linearidade e exatidão do método	49
4.2.2 Precisão e reprodutibilidade do método	51
4.3 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS CBMM DAS LINHAGENS MARROM E VERDE DA ALGA <i>Hypnea musciformis</i>	54
4.3.1 Avaliação dos CBMM da alga <i>H. musciformis</i> cultivada em diferentes condições de fotoperíodo e temperatura	55
4.3.2 Avaliação dos CBMM da alga <i>H. musciformis</i> cultivada em diferentes condições de salinidade	70
4.4 VARIAÇÃO INTRAESPECÍFICA DOS CBMM PRODUZIDOS PELA ALGA <i>Gracilaria birdiae</i> PLASTINO & E. C. OLIVERIA (GRACILARIALES)	76
4.4.1 Variação intraespecífica dos CBMM em diferentes estádios reprodutivos de <i>G. birdiae</i>	75
4.4.2 Variação intraespecífica dos CBMM em diferentes linhagens de cor de <i>G. birdiae</i> obtidas de cultivo em mar	84

4.5 VARIAÇÃO INTRAESPECÍFICA DOS CBMM PRODUZIDOS POR LINHAGENS DE COR VERDE E VERMELHA DA ALGA <i>Gracilaria domingensis</i> (GRACILARIALES)	90
4.6 AVALIAÇÃO DA FORMAÇÃO DE COMPLEXOS ENTRE A MOLÉCULA DE DIGENEASÍDEO E ÍON VANADÍLO (VIV) EM DIFERENTES VALORES DE pH	92
4.6.1 Análises por RMN- ¹³ C dos complexos digeneasídeo-vanádio (DIG-VO)....	92
5 CONCLUSÕES	101
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	105

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: ESTRUTURAS QUÍMICAS DE HETEROSÍDEOS PRESENTES NAS ALGAS VERMELHAS (RHODOPHYTA).....	07
FIGURA 2: ESTRUTURAS QUÍMICAS DE POLIÓIS ENCONTRADOS EM DIFERENTES GRUPOS DE ALGAS VERMELHAS.....	08
FIGURA 3: VIAS DE BIOSÍNTESE DO FLORIDOSÍDEO, AMIDO DAS FLORÍDEAS E CARRAGENANAS	10
FIGURA 4: CICLO DE VIDA ISOMÓRFICO PARA O GÊNERO <i>Gracilaria</i>	16
FIGURA 5: PROPOSTA PARA POSSÍVEIS COMPLEXOS DE VANÁDIO (V ^{IV}) COM COMPOSTOS POLIHIDROXILADOS	24
FIGURA 6: ESPECTRO DE RMN- ¹³ C CORRESPONDENTE AO PADRÃO DE DIGENEASÍDEO PURIFICADO DA ALGA <i>B. binderii</i>	45
FIGURA 7: ESPECTRO DE ESI-MS CORRESPONDENTE AO PADRÃO DE DIGENEASÍDEO PURIFICADO DA ALGA <i>B. binderii</i>	45
FIGURA 8: ESPECTRO DE RMN- ¹³ C CORRESPONDENTE AO PADRÃO DE FLORIDOSÍDEO PURIFICADO DA ALGA <i>A. spicifera</i>	46
FIGURA 9: ESPECTRO DE ESI-MS* CORRESPONDENTE AO PADRÃO DE FLORIDOSÍDEO PURIFICADO DA ALGA <i>A. spicifera</i>	46
FIGURA 10: ANÁLISE POR CLAE DOS TRÊS NÍVEIS DE CALIBRAÇÃO DOS CBMM UTILIZANDO A COLUNA REZEX - ROA.....	48
FIGURA 11: ANÁLISE POR CLAE DOS TRÊS NÍVEIS DE CALIBRAÇÃO DOS POLIÓIS UTILIZANDO A COLUNA REZEX – RPM.....	49
FIGURA 12: ANÁLISE POR CLAE DOS CBMM DAS ALGAS <i>A. spicifera</i> e <i>B. tenella</i> UTILIZANDO A COLUNA REZEX – ROA EM COMPARAÇÃO COM PADRÕES.....	52
FIGURA 13: ANÁLISE POR CLAE DOS CBMM DA ALGA <i>B. tenella</i> UTILIZANDO A COLUNA REZEX – RPM.....	53
FIGURA 14: INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA NA BIOSÍNTESE DE FLORIDOSÍDEO NAS LINHAGENS MARROM E VERDE DE <i>H. musciformis</i>	61

FIGURA 15: INFLUÊNCIA DO FOTOPERÍODO NA BIODISSÍNTese DE FLORIDOSÍDEO NAS LINHAGENS MARROM E VERDE DE <i>H. musciformis</i>	61
FIGURA 16: INFLUÊNCIA DO FOTOPERÍODO E TEMPERATURA NA BIODISSÍNTese DE FLORIDOSÍDEO NAS LINHAGENS MARROM E VERDE DE <i>H. musciformis</i>	62
FIGURA 17: INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA NA BIODISSÍNTese DE DIGENEASÍDEO NAS LINHAGENS MARROM E VERDE DE <i>H. musciformis</i>	66
FIGURA 18: INFLUÊNCIA DO FOTOPERÍODO NA BIODISSÍNTese DE DIGENEASÍDEO NAS LINHAGENS MARROM E VERDE DE <i>H. musciformis</i>	66
FIGURA 19: INFLUÊNCIA DO FOTOPERÍODO E TEMPERATURA NA BIODISSÍNTese DE DIGENEASÍDEO NAS LINHAGENS MARROM E VERDE DE <i>H. musciformis</i>	67
FIGURA 20: INFLUÊNCIA DA SALINIDADE NA BIODISSÍNTese DO DIGENEASÍDEO NAS LINHAGENS MARROM E VERDE DE <i>H. musciformis</i>	74
FIGURA 21: REGIÃO ANOMÉRICA DOS ESPECTROS DE RMN- ¹³ C OBTIDOS PARA OS DIFERENTES ESTÁDIOS REPRODUTIVOS DA LINHAGEM VERMELHA DE <i>G. birdiae</i>	78
FIGURA 22: ESPECTROS DE RMN- ¹ H OBTIDOS PARA OS DIFERENTES ESTÁDIOS REPRODUTIVOS DA LINHAGEM VERMELHA DE <i>G. birdiae</i>	79
FIGURA 23: ESPECTROS DE RMN- ¹³ C OBTIDOS PARA OS DIFERENTES ESTÁDIOS REPRODUTIVOS DA LINHAGEM VERMELHA DE <i>G. birdiae</i>	81
FIGURA 24: ESPECTROS DE RMN- ¹ H OBTIDOS PARA AS DIFERENTES LINHAGENS DE COR DA ALGA <i>G. birdiae</i>	86
FIGURA 25: ESPECTRO DE RMN- ¹³ C OBTIDO DA SOLUÇÃO EQUIMOLAR DE DIGENEASÍDEO / ÍON VANADILO EM pH 2,76.....	95
FIGURA 26: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS ESTRUTURAS PROPOSTAS PARA OS POSSÍVEIS COMPLEXOS DE VANÁDIO (V ^{IV}) COM DIGENEASÍDEO EM PH 2,76	96
FIGURA 27: ESPECTRO DE RMN- ¹³ C OBTIDO DA SOLUÇÃO EQUIMOLAR DE DIGENEASÍDEO / ÍON VANADILO EM pH 3,47	97
FIGURA 28: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS ESTRUTURAS PROPOSTAS PARA OS POSSÍVEIS COMPLEXOS DE VANÁDIO (V ^{IV}) COM DIGENEASÍDEO EM pH 3,47	97

FIGURA 29: ESPECTRO DE RMN-¹³C OBTIDO DA SOLUÇÃO EQUIMOLAR DE DIGENEASÍDEO / ÍON VANADILO EM pH 4,20.....99

FIGURA 30: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS ESTRUTURAS PROPOSTAS PARA OS POSSÍVEIS COMPLEXOS DE VANÁDIO (V^{IV}) COM DIGENEASÍDEO EM pH 4,20.....99

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA SOLUÇÃO DE Von STOSCH PREPARADA SEGUNDO EDWARDS (1970) E MODIFICADA SEGUNDO YOKOYA (1996)	28
TABELA 2: LINHAGENS DE <i>Gracilaria birdiae</i> UTILIZADAS NO PRESENTE ESTUDO.....	33
TABELA 3: ASSINALAMENTO DE RMN- ¹³ C E ¹ H PARA A MOLÉCULA DE DIGENEASÍDEO E FLORIDOSÍDEO.....	44
TABELA 4: ANÁLISE DA LINEARIDADE ENTRE A CONCENTRAÇÃO DOS CARBOIDRATOS E RESPOSTA DO DETECTOR (RI) ANALISADOS NA COLUNA DE SEPARAÇÃO REZEX-ROA.....	50
TABELA 5: ANÁLISE DE LINEARIDADE ENTRE A CONCENTRAÇÃO DOS CARBOIDRATOS E RESPOSTA DO DETECTOR (RI) ANALISADOS NA COLUNA DE SEPARAÇÃO REZEX-RCM	50
TABELA 6: ANÁLISE POR CLAE DOS CBMM OBTIDOS DE <i>A. spicifera</i> e <i>B. tenella</i> UTILIZANDO COLUNA REZEX-ROA	52
TABELA 7: ANÁLISE POR CLAE DA ALGA <i>B. tenella</i> UTILIZANDO A COLUNA DE REZEX-RPM	54
TABELA 8: CONCENTRAÇÃO DE CBMM PRESENTES NA LINHAGEM MARROM DE <i>H. musciformis</i> QUANDO SUBMETIDA A DIFERENTES CONDIÇÕES DE CULTIVO	56
TABELA 9: CONCENTRAÇÃO DE CBMM PRESENTES NA LINHAGEM VERDE DE <i>H. musciformis</i> QUANDO SUBMETIDA A DIFERENTES CONDIÇÕES DE CULTIVO	56
TABELA 10: CONCENTRAÇÃO DOS CBMM DA LINHAGEM MARROM DA ALGA <i>H. musciformis</i> SUBMETIDA A DIFERENTES CONDIÇÕES SALINIDADE	71
TABELA 11: CONCENTRAÇÃO DOS CBMM EM DIFERENTES ESTÁDIOS REPRODUTIVOS DE <i>G. birdiae</i>	82
TABELA 12: CONCENTRAÇÃO DOS CBMM EM DIFERENTES LINHAGENS DA ALGA <i>G. birdiae</i> (GAMETÓFITO FEMININO).....	87
TABELA 13: CONCENTRAÇÃO DOS CBMM EM DIFERENTES LINHAGENS DE COR DA ALGA <i>G. domingensis</i>	90

TABELA 14: ASSINALAMENTOS DOS SINAIS DE RMN- ¹³ C (ppm) DA MOLÉCULA DE DIGENEASÍDEO E DE SEUS COMPLEXOS COM O ÍON VANADILO EM SOLUÇÕES DE DIFERENTES VALORES DE pH.....	94
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

α : denota anomeridade alfa;

β : denota anomeridade beta;

μ RIU: micro unidades de índice de refração;

CBMM: carboidratos de baixa massa molecular;

CG: cromatografia gasosa;

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

CLAE: cromatografia líquida de alta eficiência;

COSY: *correlation spectroscopy*

d.i.: diâmetro interno;

D₂O: óxido de deutério;

DEPT: *distortionless enhancement by polarization*;

EDTA: ácido dietilamino tetra acético;

ESI-MS: *electrospray ionization – mass spectroscopy*;

ETOH 70%: solução de etanol 70% (v/v) em água;

ETOH 75%: solução de etanol 75% (v/v) em água;

H¹⁴CO₃⁻: bicarbonato marcado com carbono-14;

mQ: água deionizada ultra purificada;

HMQC: *heteronuclear multiple quantum correlation spectroscopy*;

J: constante de acoplamento;

L/E: luz/escuro;

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

ppm: deslocamento químico;

RID: detector por índice de refração;

RMN: ressonância magnética nuclear;

RMN-¹³C: ressonância magnética nuclear de carbono-13;

RMN-¹H: ressonância magnética nuclear hidrogênio;

TFA: ácido trifluoracético;

TR: tempo de retenção em minutos;

ups: unidade de salinidade;

V_o: volume morto;

VS/2: meio de cultura com 50 % de von Stosch modificado segundo YOKOYA (1996);

V_t: volume total;

RESUMO

As macroalgas biossintetizam além dos polissacarídeos de reserva, carboidratos de baixa massa molecular (CBMM) os quais podem representar seus principais produtos fotossintéticos. Os principais CBMM encontrados em Rhodophyta são floridosídeo [α -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 2)-glicerol] e seus isômeros de posição D- e L-isofloridosídeos [α -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 1)-D-glicerol e α -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 1)-L-glicerol, respectivamente]. Ainda pode ser encontrado o heterosídeo denominado digeneasídeo [α -D-manopiranosil-(1 \rightarrow 2)-D-glicerato]. Estes heterosídeos têm sido considerados úteis como marcadores quimiotaxonômicos em diversas ordens de Rhodophyta. No presente trabalho, foi realizada a validação do método de quantificação dos CBMM por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Este método permitiu identificar e quantificar floridosídeo, digeneasídeo e polióis nos espécimes de algas estudados. Os dados de quantificação dos CBMM via CLAE de variantes de cor (Marrom e Verde) da alga *Hypnea musciformis* (Wulfen) Lamouroux obtidas de cultivo em laboratório em diferentes condições de salinidade, fotoperíodo e temperatura permitiram determinar que, apesar de apresentarem vias biossintéticas diferentes, floridosídeo e digeneasídeo são similarmente influenciados por variações do ambiente externo. Também foi evidenciado o efeito osmorregulador do glicosídeo floridosídeo. Para a alga *Gracilaria birdiae* Plastino & E.C. Oliveira foi detectada a presença de floridosídeo, L-isofloridosídeo, D-isofloridosídeo e digeneasídeo, além do ácido isotiônico. Além disso, os dados obtidos demonstram que há diferenças quantitativas na concentração de floridosídeo e digeneasídeo para os diferentes estádios reprodutivos (haplóide e diplóide) e também para as variantes de cor estudadas, demonstrando a influência dos pigmentos fotossintetizantes (clorofila *a* e ficobiliproteínas) na biossíntese destes heterosídeos. Para a alga *G. domingensis* (Kützinger) Sonder ex Dickie também foi detectada a presença de ambos heterosídeos floridosídeo e digeneasídeo para as duas linhagens de cor (Verde e Vermelho). Os resultados demonstram ainda diferenças significativas na concentração destes carboidratos entre as diferentes linhagens. Estes dados sugerem uma revisão na literatura na utilização destes carboidratos como caráter quimiotaxonômico. Foi demonstrada, via RMN-¹³C, a complexação entre digeneasídeo e o cátion vanadilo (VO²⁺) em função da variação do pH da solução. Os dados obtidos sugerem que a complexação em pH 2,76 apresenta especiação ligante:metal (L:M) 4:1, em pH 3,47 especiação (L:M) 2:1 e em pH 4,20 especiação (L:M) 4:1.

ABSTRACT

Seaweeds biosynthesize apart from the storage polysaccharides low molecular mass carbohydrates (LMMC) which can represent their main photosynthetic products. The main LMMC found in Rhodophyta are floridoside [α -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-glycerol] and its positional isomers D- and L- isofloridosides [α -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 1)-D-glycerol and α -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 1)-L-glycerol, respectively]. In addition, the heteroside digeneaside [α -D-mannopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-D-glycerate] can be found. These heterosides have been considered useful as chemotaxonomic markers in several orders of Rhodophyta. In the present study a LMMC quantitation method using high performance liquid chromatography (HPLC) was validated. This method allowed the identification and quantification of floridoside, digeneaside and polyols in the studied species. The LMMC HPLC quantification data of *Hypnea musciformis* (Wulfen) Lamouroux colour strains (brown and green) obtained by lab culture using different salinity, photoperiod and temperature conditions allowed to determine that although digeneaside and floridoside present different biosynthetic pathways are similarly influenced by external parameters. It was also determined the osmoregulatory effect of the glycoside floridoside. For *Gracilaria birdiae* Plastino & E.C. Oliveira the presence of digeneaside, floridoside, L- and D-isofloridoside together with isethionic acid was detected. Moreover, data suggest quantitative differences in floridoside and digeneaside concentrations for the reproductive stages (haploid and diploid), and also for the colour strains, demonstrating the influence of the accessory pigments (chlorophylla and phycobiliprotein) in the biosynthesis of these heterosides. For the alga *G. domingensis* (Kützing) Sonder ex Dickie the presence of both heterosides floridoside and digeneaside was also detected in both colour strains (green and red). These results also demonstrate significant differences in carbohydrate concentration between the strains. These data suggest the need of a revision on the use of these carbohydrates as chemotaxonomic markers. It was demonstrated using ^{13}C NMR, the complexation of digeneaside and vanadyl (VO^{2+}) as a function of the range in pH of the solution. These results indicate for the complexation at pH 2.76 species 4:1 ligand: metal (L:M), 2:1 (L:M) at pH 3.47 and 4:1 (L:M) at pH 4.20.

1. INTRODUÇÃO

1.1 ALGAS: Aspectos gerais

As algas compreendem um grupo muito diverso de organismos fotossintetizadores e não vasculares, com estruturas reprodutivas desprotegidas (Cryptogâmia), produtoras de esporos e desprovidas de sementes e flores (SOUTH; WHITTICK, 1987). Por não apresentarem uma estrutura vegetal diferenciada em raiz, caule e folhas, as algas são classificadas como talófitas. Podem ser procarióticas ou eucarióticas, unicelulares ou pluricelulares, apresentando-se na forma de agregados, filamentos ou talos pseudoparenquimatosos e parenquimatosos. Mesmo estas formas multicelulares mostram baixo nível de diferenciação celular quando comparadas com outros grupos de vegetais, e apenas as espécies com talos mais complexos apresentam tecidos condutores elementares (VAN DEN HOEK; MANN; JAHNS, 1989).

Por outro lado, a variação morfológica é extremamente diversa, sendo que em algumas espécies de algas pardas podemos encontrar organismos com dezenas de metros. Esta variabilidade também se estende aos seus mecanismos de reprodução, onde estão envolvidos processos vegetativos, sexuais e assexuais e em muitas espécies pode ocorrer alternância de gerações (SOUTH; WHITTICK, 1987).

Do ponto de vista bioquímico e fisiológico, as algas apresentam similaridade em muitos aspectos às plantas superiores. Todas possuem clorofila "a" como principal pigmento fotossintético e as mesmas vias bioquímicas básicas. Outros tipos de clorofila apresentam uma distribuição mais limitada, funcionando como pigmentos acessórios, assim como os carotenóides (β -caroteno e fucoxantina) e as ficobiliproteínas (ficocianina, ficoeritrina e aloficocianina). Também seus carboidratos

de reserva e proteínas apresentam similaridade com as estruturas das plantas superiores (SOUTH; WHITTICK, 1987).

Em relação à distribuição geográfica, as algas apresentam-se amplamente distribuídas, ocorrendo em praticamente todas as condições ambientais da Terra, sendo encontradas desde os solos mais férteis até aos mais inóspitos desertos (quentes ou frios) e em todos os tipos de ambientes aquáticos. Nestes últimos, são encontradas em maior abundância e representam as maiores fontes de compostos orgânicos, desempenhando um papel central na base da cadeia alimentar e ainda servindo como fonte de oxigênio, necessário ao metabolismo dos consumidores (LEE, 1989). Também podem representar problemas em sistemas de abastecimento de água e em fontes sujeitas a eutrofização, além de algumas espécies oferecerem riscos de envenenamento, como as pertencentes à divisão Dinophyta, responsáveis pela maré-vermelha (SOUTH; WHITTICK, 1987).

Algumas algas pertencentes às divisões Rhodophyta e Phaeophyta (vermelhas e pardas, respectivamente) são utilizadas na indústria como fonte de alimento humano ou de extratos químicos, os quais são amplamente utilizados na manufatura de alimentos e muitos outros produtos, sendo o valor nutritivo das algas utilizadas na dieta humana está relacionado apenas aos carboidratos solúveis, uma vez que os carboidratos estruturais (constituintes da parede celular) não são digeridos pelo homem. Por outro lado, representam excelentes fontes de vitaminas A, B₁, B₁₂, C, D e E, sendo a concentração de vitamina C encontrada em algumas algas considerada equivalente a dos frutos cítricos. Além disso, apresentam elementos traços requeridos para a nutrição humana (SOUTH; WHITTICK, 1987).

1.2 CLASSIFICAÇÃO DAS ALGAS

As algas são primariamente classificadas levando-se em conta seus pigmentos fotossintéticos, seguidos de uma série de outros fatores mais específicos como morfologia, ciclo de vida, natureza química dos produtos de reserva e composição da parede celular. Além disso, estudos citológicos direcionados à estrutura fina de organelas como flagelo, núcleo e cloroplastos são amplamente utilizados. Desta forma, são reconhecidas divisões de algas, cujos nomes freqüentemente fazem referência à cor dos pigmentos fotossintéticos nelas encontrados. Entre estas divisões duas são representadas por algas procarióticas, compreendendo as divisões Cyanophyta e Prochlorophyta. Já as algas eucarióticas são distribuídas em várias divisões, destacando-se as divisões Rhodophyta (algas vermelhas), Phaeophyta (algas marrons ou pardas), Chlorophyta (algas verdes) e Euglenophyta (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 1996; SOUTH; WHITTICK, 1987; VAN DEN HOEK; MANN; JAHNS, 1989; WYNE, 2005).

1.2.1 A Divisão Rhodophyta

A Divisão Rhodophyta representa um dos mais antigos grupos de algas eucarióticas, sendo constituída por apenas uma única classe, Rhodophyceae, que se divide em duas subclasses, Bangioideae e Florideae. Esta divisão engloba mais de 6000 espécies, distribuídas em aproximadamente 600 gêneros, sendo que destes, cerca de 20 são representantes de água doce e 10 são unicelulares. Os demais gêneros até agora conhecidos são representados unicamente por organismos pluricelulares de ambiente marinho (LEE, 1989; VAN DEN HOEK; MANN; JAHNS, 1989). A grande maioria das algas marinhas pertence à divisão Rhodophyta, existindo mais algas vermelhas do que todos os outros grupos de algas marinhas combinados. Ainda assim, trata-se de uma divisão pequena quando

comparada às plantas superiores (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 1996; VAN DEN HOEK; MANN; JAHNS, 1989).

O habitat dessas macroalgas também é muito diverso, podendo se desenvolver fixadas a rochas, sobre substratos calcários, paredes oceânicas ou ainda sobre conchas de moluscos ou sobre outras algas (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 1996; VAN DEN HOEK; MANN; JAHNS, 1989). Desenvolvem-se em maior abundância nas regiões quentes, próximas a linha do Equador, onde em geral, apresentam tamanho reduzido. Podem se estender até águas mais frias, onde atingem maiores proporções, porém, existindo poucas espécies em regiões polares e sub-polares, onde as divisões Phaeophyta e Chlorophyta são mais abundantes (VAN DEN HOEK; MANN; JAHNS, 1989; LEE, 1989).

A coloração predominante (avermelhada) é devido à presença do pigmento acessório fotossintético denominado ficoeritrina, o qual se acumula no interior dos cloroplastos. Também podem se apresentar violeta, marrom ou azul, sendo estas variações de coloração atribuídas a outros pigmentos acessórios que também são encontrados nestas algas, como ficocianina e aloficocianina. Espécimes que se desenvolvem em regiões mais superficiais são predominantemente azul-violeta, uma vez que apresentam uma maior quantidade de ficocianina, enquanto que espécimes de regiões mais profundas são vermelho-escuros por possuírem maior quantidade de ficoeritrina (VAN DEN HOEK; MANN; JAHNS, 1989; SOUTH; WHITTICK, 1987). Em regiões com incidência direta de luz, as algas podem ainda apresentar coloração amarelo-marrom ou até mesmo verde, pois a clorofila "a" e os carotenóides (α -caroteno, β -caroteno, luteína e zeaxantina) mascaram as ficobiliproteínas, que são pigmentos acessórios associados a proteínas (ficocianina e aloficocianina). Quando morrem, as algas vermelhas tendem a se tornar verdes, uma vez que, ao contrário da clorofila, as ficobiliproteínas são solúveis em água e, portanto, são perdidas (VAN DEN HOEK; MANN; JAHNS, 1989).

Alguns membros das ordens de Rhodophyta, como Corallinales, Nemaliales e Gigartinales, apresentam ainda calcificação da parede celular, um processo relacionado com as vias de fixação do carbono, onde íons carbonato (CO_3^{2-}) se combinam com íons cálcio (Ca^{2+}) resultando no depósito de carbonato de cálcio (CaCO_3) ao redor da célula ou no meio intracelular (SOUTH; WHITTICK, 1987).

1.3 CARBOIDRATOS EM ALGAS MARINHAS

1.3.1 Polissacarídeos da matriz e parede celular

A maior parte das algas pertencentes à divisão Rhodophyta sintetizam galactanas sulfatadas como principal polissacarídeo da matriz e da parede celular (PAINTER, 1983). Estruturalmente, as galactanas apresentam cadeias lineares formadas por unidades alternadas de β -D-galactopiranoose, ligadas glicosidicamente através da posição 3 (unidade A) e α -galactopiranoose, ligadas glicosidicamente através da posição 4 (unidade B). Esta última unidade pode ocorrer na forma de 3,6-anidrogactose. A estereoquímica da unidade B define a classificação das galactanas como agaranas (estereoquímica L) ou carragenanas (estereoquímica D) (USOV, 1992). As galactanas apresentam grande variedade estrutural em função dos diferentes grupos substituintes na cadeia principal: éster sulfato, éster metil, acetal de ácido pirúvico e ramificações de unidades de xilopiranoose e galactopiranoose. Da relação destes substituintes dependem as propriedades físicas das agaranas (LAHAYE; ROCHAS, 1991).

1.3.2 Polissacarídeos de reserva

Os principais polissacarídeos com a função de reserva biossintetizados pelas algas são polímeros de glucose, relativamente insolúveis em meio aquoso. Nas algas da Divisão Chlorophyta, encontra-se um típico amido, como o das plantas superiores, constituído de uma cadeia linear α -(1→4) (amilose) e uma cadeia ramificada α -(1→4) e α -(1→6) (amilopectina), armazenados na forma de grãos dentro dos cloroplastos. Já em Rhodophyta, encontra-se o chamado amido das florídeas, que constitui uma glucana similar à amilopectina, armazenada na forma de grãos citoplasmáticos, enquanto que em Phaeophyta encontra-se uma poliglucana β -(1→3) denominada de laminarana, que pode apresentar unidades terminais de manitol e algumas ramificações do tipo (1→6) (LEE, 1989; SOUTH; WHITTICK, 1987).

1.3.3 Carboidratos de baixa massa molecular

As macroalgas biossintetizam, além de polissacarídeos de reserva, carboidratos de baixa massa molecular (CBMM) (heterosídeos, sacarose e polióis), os quais em muitos casos podem representar os principais produtos fotossintéticos desses organismos (KARSTEN et al., 1999). Os heterosídeos encontrados em macroalgas são compostos formados a partir de galactose e glicerol [α -D-galactopiranosil-(1→2)-glicerol], denominado de floridosídeo, e seus isômeros de posição [α -D-galactopiranosil-(1→1)-D-glicerol] e [α -D-galactopiranosil-(1→1)-L-glicerol], denominados de D-isofloridosídeo e L-isofloridosídeo, respectivamente (KARSTEN; BARROW; KING, 1993) (FIGURA 1). Além desses heterosídeos, ainda pode ser encontrado o heterosídeo formado por manose e ácido glicérico [α -D-manopiranosil-(1→2)-D-glicerato], denominado digeneasídeo (FIGURA 1) (BOUVENG; LINDBERG; WICKBERG, 1955; KREMER; VOLG, 1975; KARSTEN, 1999).

Os polióis são formados a partir de unidades monossacarídicas reduzidas, constituindo dessa maneira poliálcoois de D-manose, D-glucose e D-galactose (D-manitol, D-sorbitol e dulcitol, respectivamente) (FIGURA 2). Estes compostos são considerados como principais responsáveis pela manutenção das pressões osmótica e de turgescência, embora este mecanismo ainda não esteja bem esclarecido (CROWE et al., 1987). Em termos de CBMM, as algas vermelhas (Divisão Rhodophyta) biossintetizam floridosídeo, isofloridosídeos, digeneasídeo e polióis (sorbitol e dulcitol) enquanto que as algas Verdes (Divisão Chlorophyta) e pardas (Divisão Phaeophyta) produzem principalmente sacarose e manitol, respectivamente (KARSTEN et al., 1991).

FIGURA 1: ESTRUTURAS QUÍMICAS DE HETEROSÍDEOS PRESENTES NAS ALGAS VERMELHAS (RHODOPHYTA).

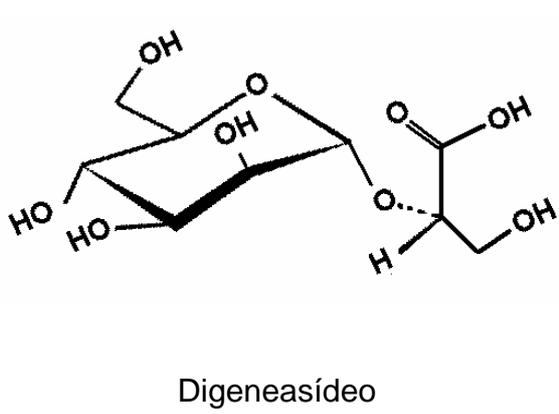
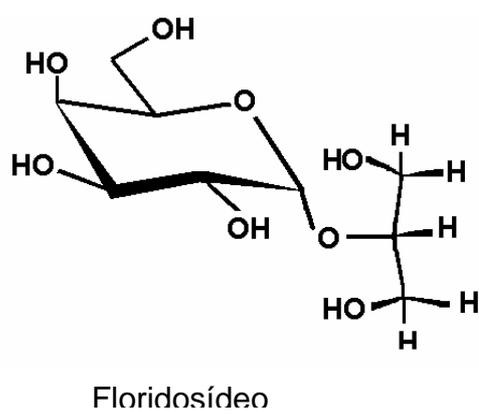
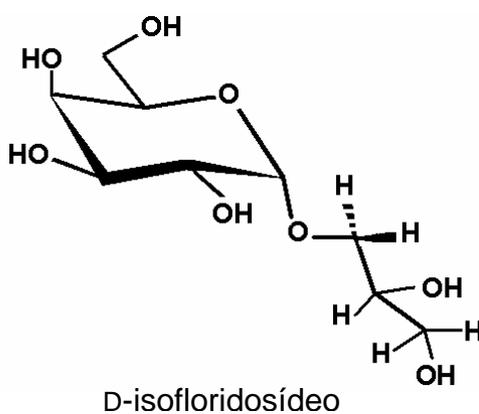
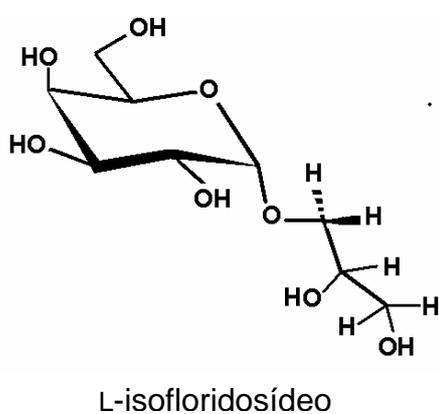
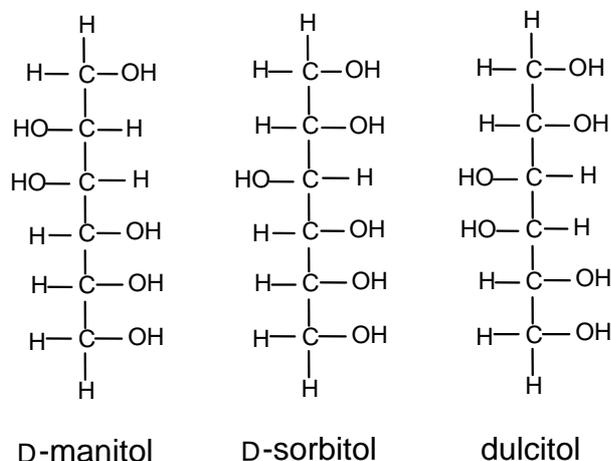


FIGURA 2: ESTRUTURAS QUÍMICAS DE POLIÓIS ENCONTRADOS EM DIFERENTES GRUPOS DE ALGAS VERMELHAS.



Os primeiros relatos do heterosídeo α -D-manopiranosil-(1 \rightarrow 2)-D-glicerato datam de 1939, e foram descritos por COLIN e AUGIER (1939). Estes autores isolaram este glicosídeo da alga vermelha *Polysiphonia fastigiata* Grev. e assumiram que a ligação glicosídica se dava no carbono 2 do ácido glicérico, embora não tenham oferecido nenhuma evidência experimental para tal estrutura. AUGIER (1954), investigou um grande número de algas vermelhas e encontrou esta mesma estrutura em várias espécies estudadas.

A primeira evidência experimental da estrutura química deste composto foi descrita por BOUVENG; LINDBERG e WICKBERG (1955), a qual foi elucidada por técnicas de metilação. O material analisado foi obtido da alga vermelha *Ceramium rubrum* Roth e encontrava-se na forma de sal de sódio. O glicosídeo foi então submetido a metilação com metilsulfato e hidróxido de sódio. Posteriormente, o material metilado foi tratado com diazometano para esterificação do grupamento carboxílico. O éster formado foi então reduzido com hidreto de alumínio/lítio. O produto reduzido foi submetido à hidrólise e analisado por cromatografia em papel. Foram utilizados como padrões 1-O-metil glicerol, 2-O-metil glicerol e 2,3,4,6-tetra-

O-metil-D-manose. Os resultados desta cromatografia mostraram duas manchas com valores de Rf (distância percorrida pela amostra) e coloração idêntica ao primeiro e terceiro padrão. A presença do 1-O-metil glicerol e a ausência de 2-O-metil glicerol foi a primeira evidência de que a ligação glicosídica deste composto se dava no carbono 2 do ácido glicérico. Novos passos reacionais foram realizados com o material reduzido, obtendo-se como produtos de hidrólise 1,3-di-O-metil glicerol e 2,3,4,6-tetra-O-metil-D-manose, confirmando, então, a estrutura química proposta (BOUVENG; LINDBERG; WICKBERG, 1955).

WHYTE (1969) também relata a presença de α -D-manopiranosil-(1 \rightarrow 2)-D-glicerato em *Rhodomela larix*, utilizando para sua identificação técnicas de ressonância magnética nuclear (RMN- 1 H) e espectrometria de massa (EM).

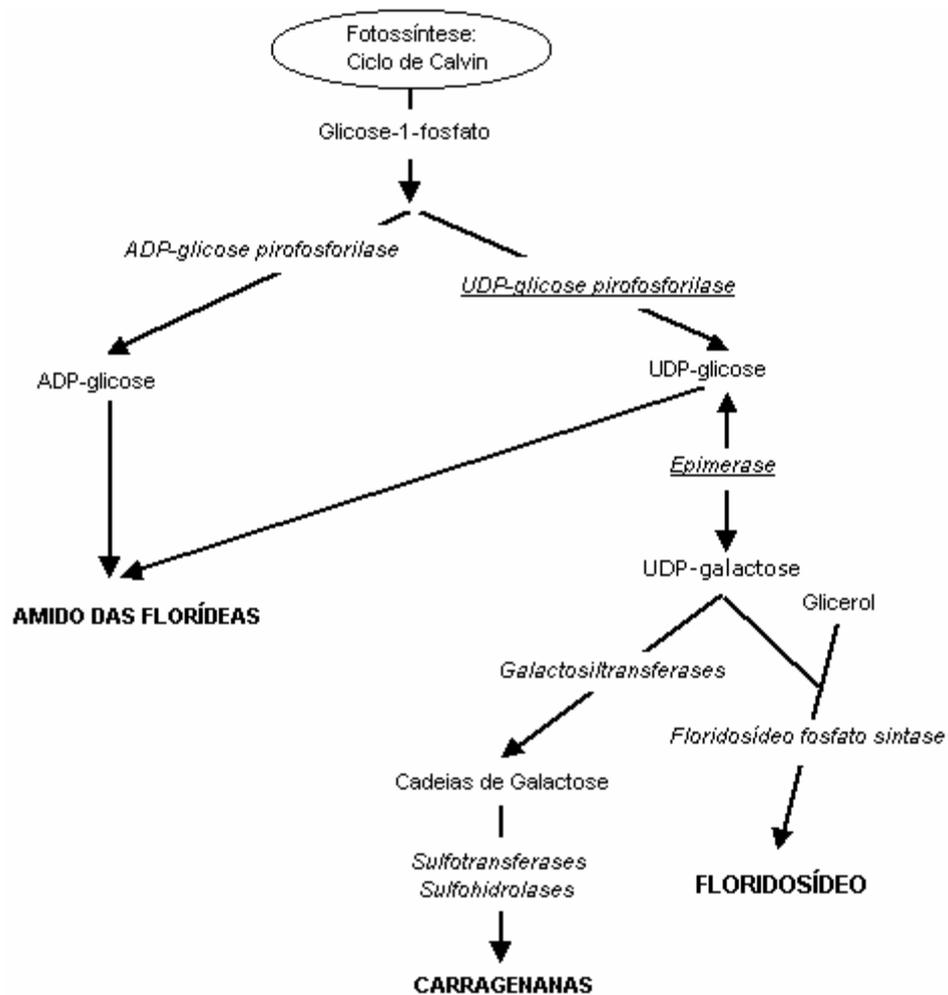
KREMER e VOLG (1975) estudando os produtos fotossintéticos de várias espécies de Rhodophyta, pela técnica de incorporação de 14 C (utilizando H 14 CO $_3^-$) através da fotossíntese, detectaram a presença do composto α -D-manopiranosil-(1 \rightarrow 2)-D-glicerato somente em espécies da ordem Ceramiales, passando a tratar tal composto pelo nome usual digeneasídeo, e sugerindo ainda seu uso na classificação quimiotaxonômica das espécies pertencentes àquela ordem.

O heterosídeo floridosídeo foi isolado e descrito pela primeira vez por COLIN e GUÉGUEM (1930) e, após sua descoberta, tem sido relatado em várias espécies de algas vermelhas. Este carboidrato é considerado como principal produto fotossintético e de reserva de todas as ordens de Rhodophyta, exceto para ordem Ceramiales, onde, em geral, os membros desta ordem sintetizam e acumulam o heterosídeo digeneasídeo (KREMER; VOLG, 1975; KIRST, 1980a).

A enzima chave para a biossíntese do floridosídeo é a Floridosídeo fosfato sintase (FPS, UDP-galactose, *sn*-3-glicerol fosfato: 1 \rightarrow 2' galactosiltransferase), que apresenta massa molar de aproximadamente 120 KDa. A reação catalisada por esta enzima produz floridosídeo-fosfato, que é posteriormente desfosforilado, produzindo

então floridosídeo (MENG; SRIVASTAVA, 1991; MENG; SRIVASTAVA, 1993). GOULAR et al. (2000) propuseram uma via de síntese para o amido das florídeas, carragenanas e floridosídeo, usando como precursor comum a Glicose-1-fosfato proveniente da fotossíntese (FIGURA 3). Estudos têm demonstrado que este heterosídeo também serve como fonte de compostos de carbono para a síntese dos polissacarídeos sulfatados que compõem a parede celular em *Porphyridium* sp., uma microalga pertencente à divisão Rhodophyta (LI et al., 2001; LI et al., 2002).

FIGURA 3: VIAS DE BIOSÍNTESE DO FLORIDOSÍDEO, AMIDO DAS FLORÍDEAS E CARRAGENANAS.



Fonte: GOULAR et al. (2000)

Os CBMM apresentam atividade osmorreguladora, funcionando como osmólitos ou solutos compatíveis, tendo efeito estabilizante em enzimas, membranas e em estruturas de macromoléculas sob condições de hipersalinidade, mostrando-se acumulados no citoplasma celular (KIRST, 1980a; KIRST, 1980b; KARSTEN et al., 1999). Estes compostos têm sido estudados por métodos químicos clássicos (KREMER; VOLG, 1975) e, mais recentemente, vêm sendo estudados através de métodos cromatográficos de alta resolução, tais como cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-EM), além de técnicas de ressonância magnética nuclear (RMN) de ^{13}C e ^1H (KARSTEN et al., 1991; KARSTEN et al., 1993; DUARTE et al., 1997; KARSTEN et al., 1999; ASCENCIO, 2002). As técnicas de RMN permitem uma rápida elucidação da estrutura química destes compostos, bem como determinação de suas percentagens relativas nas algas (KARSTEN et al., 1993; KARSTEN et al., 1994). Já as técnicas de CLAE permitem identificar e quantificar, com segurança, estes componentes mesmo quando em baixas concentrações (ASCENCIO, 2002).

Devido a diferenças na distribuição dos CBMM entre as espécies de algas vermelhas, estes passaram a ser considerados úteis como critério taxonômico e filogenético quando associado a outros caracteres, tais como: morfologia, genética, ultraestrutura, desenvolvimento e histórico de vida (KREMER; VOLG, 1975; KIRST, 1980a; KARSTEN et al., 1993; KARSTEN et al., 1999).

Em geral para que um componente orgânico seja útil como marcador na sistemática, é necessário que este seja específico de um certo táxon ou grupo de organismos e que seja suficientemente abundante para ser detectado e identificado com segurança (KARSTEN et al., 1991).

Apesar destas considerações sobre os heterosídeos floridosídeo e digeneasídeo, tem-se demonstrado, através da técnica de RMN de ^{13}C , que algumas espécies de Ceramiales, pertencentes ao complexo *Laurencia* (*Chondrophyucus*,

Laurencia e *Osmundea*), produzem e acumulam floridosídeo e não digeneasídeo (BARROW et al., 1995).

ASCENCIO (2002) e ASCENCIO et al. (2002), estudando os CBMM de várias espécies de algas pertencentes às ordens Ceramiales, Gracilariales e Nemaliales, incluindo algumas espécies estudadas por BARROW et al. (1995), detectaram via CLAE, RMN de ^{13}C e ^1H , a presença de ambos heterosídeos (floridosídeo e digeneasídeo) em todas as espécies estudadas por uma ou mais técnica analítica empregada, demonstrando diferenças na sensibilidade de cada método analítico utilizado, sendo o primeiro relato na literatura da presença de ambos heterosídeos em espécies daquelas ordens. Considerando os dados quantitativos, foi ainda possível verificar, nos trabalhos destes autores, diferenças nas concentrações dos CBMM entre as espécies estudadas, além de grandes variações na relação floridosídeo/digeneasídeo, sugerindo uma revisão nos conceitos quimiotaxonômicos relacionados ao heterosídeo digeneasídeo.

KARSTEN et al. (1993) relatam variações nas concentrações dos CBMM de algumas espécies de algas vermelhas coletadas em diferentes épocas do ano. Estes autores atribuem estas variações a efeitos sazonais e osmóticos.

Para um melhor entendimento da função dos CBMM nos processos fisiológicos, fez-se necessário o estudo dos CBMM de espécies de algas vermelhas (Rhodophyta) submetidas a condições controladas de desenvolvimento.

Desta forma, o presente trabalho se propôs a avaliar os efeitos da temperatura, salinidade e fotoperíodo sobre a biossíntese dos CBMM de duas linhagens (Verde e Marrom) da alga vermelha *Hypnea musciformis* (Wulfen) Lamouroux cultivadas em laboratório sob rigoroso controle das variáveis ambientais. Além disso, foram também avaliados os CBMM de variantes de cor de duas espécies de rodófitas pertencentes ao gênero *Gracilaria*: *G. birdiae* Plastino & E.C. Oliveira e *G. domingensis* (Kützinger) Sonder ex Dickie. Para a alga *G. birdiae* foram

estudadas variantes de cor obtidas em cultivo no mar e também três estádios reprodutivos desta espécie (tetrásporófito, gametófito feminino e gametófito masculino), obtidos de espécimes de campo, enquanto que para *G. domingensis* foram analisados duas variantes de cor no estágio gametofítico de desenvolvimento cultivados em laboratório.

1.4 FREQUÊNCIA DE MUTAÇÃO EM RHODOPHYTA

A frequência de mutações entre as algas vermelhas varia entre as espécies onde geralmente dão origem a plantas com diferenças na cor predominante, ditas mutantes pigmentares. Estas mutações podem ocorrer espontaneamente ou estar associadas ao meio em que a alga se desenvolve (VAN DER MEER, 1990). Mutantes pigmentares de *Chondrus crispus* são mais comuns em algumas populações crescendo em regiões entre marés (VAN DER MEER, 1981). Por outro lado, os mutantes pigmentares de *Gracilaria tikvahiae* são originados mais frequentemente em condições de cultivo (VAN DER MEER, 1979). A ocorrência de mutações espontâneas em rodofíceas foi descrita para algumas espécies, como especificado a seguir: *Chondrus crispus* (VAN DER MEER, 1981), *Gracilaria* spp. (VAN DER MEER; BIRD, 1977; VAN DER MEER, 1979; RAMUS; VAN DER MEER, 1983; PLASTINO et al., 1999), *Porphyra* spp. (MIURA, 1977), *Euclima denticulatum* e *Kappaphycus alvarezii* (DAWES et al., 1994).

1.5 O GÊNERO *Hypnea*

O gênero *Hypnea* (Gigartinales, Rhodophyta) inclui cerca de 50 espécies de algas marinhas que estão distribuídas em regiões de águas quentes (MASUDA et al., 1997). A alga *Hypnea musciformis* (Wulfen) Lamouroux apresenta uma ampla

distribuição geográfica ao longo do litoral brasileiro, sendo uma espécie de potencial econômico por constituir matéria prima para a produção de polissacarídeos sulfatados (carragenanas).

O fenótipo de *Hypnea musciformis* encontrado freqüentemente na natureza corresponde a plantas de cor Marrom (linhagem Marrom). No litoral do estado do Espírito Santo, Brasil, foi encontrada uma linhagem pigmentar desta espécie, que, neste estudo, foi definida como linhagem Verde. Esta linhagem pode ter se originado por meio de uma mutação espontânea.

1.5.1 Diferenças bioquímicas entre as linhagens Marrom e Verde de *H. musciformis*

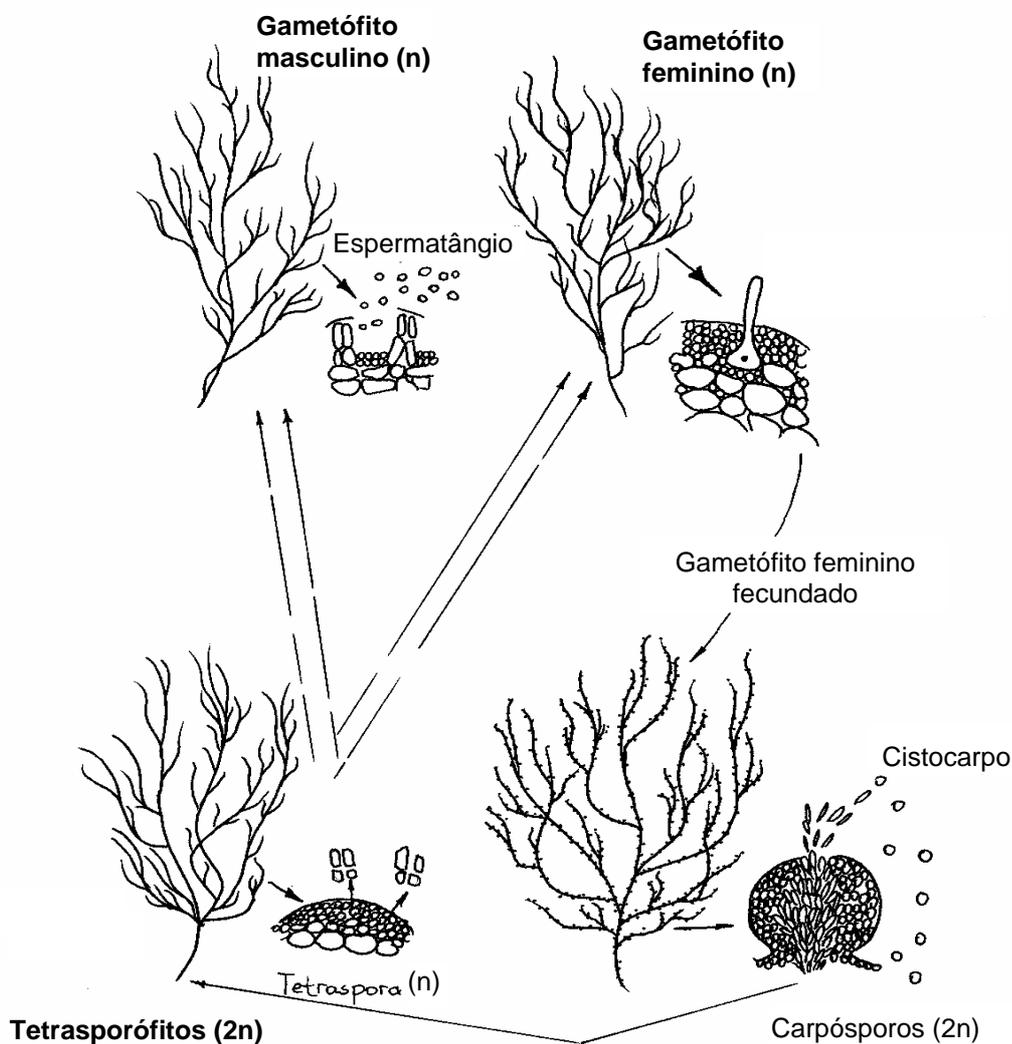
Segundo YOKOYA et al. (2003) a principal diferença entre os componentes pigmentares das linhagens Marrom e Verde de *H. musciformis*, provenientes do litoral do Espírito Santo, Brasil, referem-se às concentrações de ficobiliproteínas. Estudos realizados com as variantes de cor que foram objetos de estudo deste trabalho mostram que a linhagem Verde apresenta concentrações mais baixas de ficoeritrina e concentrações mais altas de ficocianina e aloficocianina quando comparada à linhagem Marrom. As duas linhagens apresentam também diferentes comportamentos fisiológicos quanto à temperatura, salinidade e respostas aos fitorreguladores (YOKOYA et al., 2003). Estes dados chamaram a atenção para uma avaliação qualitativa e quantitativa dos CBMM nas linhagens Verde e Marrom de *H. musciformis*, uma vez que estes carboidratos são produtos fotossintéticos do metabolismo secundário das algas. Além disso, uma avaliação quantitativa dos CBMM em condições controladas de salinidade, fotoperíodo e temperatura pode produzir dados interessantes que podem auxiliar no entendimento do papel fisiológico destes heterosídeos e correlacioná-los com os dados publicados na literatura, constituindo assim um dos propósitos deste trabalho.

1.6 O GÊNERO *Gracilaria*

As algas pertencentes ao gênero *Gracilaria* (Gracilariales, Rhodophyta) representam a principal fonte de agaranas, principalmente no que diz respeito ao uso destes polissacarídeos na indústria alimentícia. Parte deste interesse se dá ao sucesso de produção em virtude do uso do tratamento alcalino, uma técnica que proporciona uma melhora na qualidade do gel obtido dos polissacarídeos produzidos por espécies de algas pertencentes a este gênero (ARMISEN, 1995). Algas pertencentes a este gênero apresentam ciclo de vida isomórfico onde ocorre a alternância entre os estádios reprodutivos tetrasporofítico (diplóide) e gametofítico (haplóide) (FIGURA 4). A diversidade interespecífica relacionada ao rendimento, composição química e propriedades das agaranas sintetizadas por espécies de *Gracilaria* é bem estabelecida (MURANO, 1995), bem como variações destes polissacarídeos ocasionadas em resposta às condições ambientais (HOYLE, 1978; BIRD et al., 1981; CRAIGIE; WEN, 1984; CRAIGIE et al., 1984, ROTEN et al., 1986).

Por outro lado, estudos relacionados à diversidade intraespecífica dos polissacarídeos deste gênero são menos freqüentes. Os dados publicados se referem a estudos comparativos entre linhagens selvagens e variantes de cor (CRAIGIE et al., 1984; LIGNELL; PEDERSÉN, 1989; GUIMARÃES, 2000), estádios reprodutivos (MINGHOU et al., 1985; MATSUHIRO et al., 1994; MARINHO-SORIANO et al., 1999; ESPINOZA-AVALOS et al., 2003) e utilizando diferentes partes do talo (CRAIGIE; WEN, 1984; CRAIGIE; JURGENS, 1989; MACCHIAVELLO, 1990). Grande parte destes trabalhos aborda dados referentes ao rendimento e propriedades físicas do agar, sendo poucos os que tratam da composição monossacarídica e estrutura química dos polissacarídeos (MATSUHIRO et al., 1994; GUIMARÃES, 2000).

FIGURA 4: CICLO DE VIDA ISOMÓRFICO PARA O GÊNERO *Gracilaria*.



Fonte: (PLASTINO; OLIVEIRA, 2002)

1.6.1 A espécie *Gracilaria birdiae*

A alga *Gracilaria birdiae* Plastino & E.C. Oliveira é uma das principais espécies brasileiras atualmente utilizada para extração de agar (PLASTINO; OLIVEIRA, 2002). Esta alga apresenta ampla distribuição no litoral brasileiro, onde populações localizadas em diferentes latitudes estão sujeitas a diferentes condições

ambientais. Estas condições provavelmente contribuíram para a seleção de diferentes adaptações genéticas, como as verificadas por URSI et al. (2003) no que diz respeito à fotossíntese e dinâmica de carotenóides em linhagens derivadas de uma população do Ceará e outra do Espírito Santo. Variantes pigmentares desta espécie foram encontradas em populações naturais ou obtidas espontaneamente em laboratório, onde o conteúdo de clorofila “a” e ficobiliproteínas (COSTA; PLASTINO, 2001; PLASTINO et al., 2004), propriedades fotossintéticas (URSI et al., 2003) e taxas de crescimento (URSI; PLASTINO, 2001) de algumas destas variantes de cor são distintos dos parâmetros observados para as linhagens selvagens.

Uma vez que as linhagens de *Gracilaria birdiae* apresentam diferenças em sua fotossíntese, é possível que também apresentem variações em relação à composição e concentração dos CBMM, já que estes carboidratos são produtos secundários dos processos fotossintéticos. Desta forma, o presente trabalho também apresenta um estudo comparativo dos CBMM de linhagens selvagens e variantes pigmentares de *G. birdiae* originadas de populações geograficamente distantes, bem como linhagens selvagens de gametófitos femininos, masculinos e tetrasporófitos, sendo o primeiro trabalho realizado que faz esta abordagem para uma espécie de alga marinha.

1.6.2 A espécie *Gracilaria domingensis*

A alga *G. domingensis* (Kützinger) Sonder ex Dickie é uma agarófita comumente encontrada no litoral brasileiro, especialmente no nordeste. Esta espécie tem particular interesse devido ao seu valor econômico e singularidades intraespecíficas (GUIMARÃES, 2000). Tem sido coletada no litoral nordestino e exportada para o mercado japonês como alimento. Esta atividade contribui com a geração de emprego, tendo um importante papel social com a população local. Além

do seu interesse na indústria alimentícia, seus polissacarídeos têm se destacado devido a suas atividades antitumorais (FERNANDEZ et al., 1989).

Esta espécie também apresenta polimorfismo na cor. Linhagens Vermelha e Verde de *G. domingensis* foram encontradas crescendo lado a lado em uma mesma população. Estas diferenças de cor são geneticamente determinadas por um par de alelos codominantes, onde espécimes Verdes e Vermelhas são fenótipos homocigotos e espécimes Marrom heterocigoto (PLASTINO et al., 1999).

Apesar das diferenças genéticas, não são observadas alterações em relação a ultraestrutura da organização celular entre as linhagens Verde e Vermelha de *G. domingensis* (PLASTINO et al., 1999).

Uma vez que as linhagens pigmentares de *G. domingensis* podem apresentar diferenças fotossintéticas relevantes que podem estar diretamente relacionadas com a biossíntese de compostos do metabolismo secundário, como os CBMM, uma avaliação qualitativa e quantitativa dos CBMM nas linhagens Verde e Vermelha desta alga constitui mais uma etapa a que se propôs este trabalho.

1.7 COMPLEXAÇÃO DE CARBOIDRATOS COM METAIS

A grande diversidade de funções atribuídas aos carboidratos está diretamente relacionada às disposições conformacionais resultantes das ligações glicosídicas e também das hidroxilas de diferentes carbonos das unidades monoméricas (DWEK, 1996). Em função das características estruturais, estabelecidas pelos grupos funcionais que compõem os diferentes carboidratos, estas moléculas têm sido estudadas como ligantes para íons metálicos (DILL; CARTER, 1989). Esta condição envolve os grupos hidroxilas da molécula, bem como eventuais grupos carboxilas a ela ligados, além de fatores como o tamanho e a carga do cátion (MILLS, 1961; ANGYAL, 1974; ANGYAL et al., 1974a; ANGYAL et al., 1974b). Recentemente, a

formação de complexos entre Ce (III) e monossacarídeos (D-glucose, D-frutose, D-galactose, D-manose, L-sorbose e D-xilose) ou dissacarídeos (maltose e lactose) foi caracterizada por várias técnicas analíticas como a espectral, magnética e eletroquímica (MUKHOPADHYAY et al., 2000). Utilizando também a técnica potenciométrica, em adição a ressonância paramagnética eletrônica (EPR), MERCÊ et al., (1998) verificaram a interação de galactomananas com cobre (Cu^{2+}).

ASCENCIO (2002), durante a purificação do glicosídeo digeneasídeo, obtido a partir da alga *Bostrychia tenella* (J. V. Lamour.) J. Agardh [*binderi*; *calamistrata*; *elegans*; *manzei*; *muscoides*] observou um comportamento anormal deste carboidrato quando submetido à cromatografia de filtração em gel, onde o mesmo apresentava um volume de eluição referente a compostos de massa molecular muito superior a sua massa real. Interessantemente, este composto retornava ao seu volume teórico de eluição (de acordo com sua massa molecular) quando o passo cromatográfico era realizado utilizando-se fase móvel em pH 2,51. Desta forma, este autor propôs que as moléculas de digeneasídeo pudessem estar presentes na forma de complexos, através de interações com cátions provenientes da alga e que tais complexos seriam desestabilizados em função da diminuição do pH.

As aplicações químicas dos complexos entre carboidratos e metais têm se difundido rapidamente. Baseados em estudos pioneiros BOESEKEN (1949), estabeleceu o uso do ácido bórico para determinar a configuração glicosídica de carboidratos. Em sistemas biológicos, o uso de complexos carboidratos-metais é relativamente recente e os mecanismos moleculares de tais interações continuam não bem esclarecidos (BURGER; NAGY, 1990; WHITFIELD, 1993; YANO; OTOSUKA, 1996). Também varias aplicações farmacológicas têm sido descritas para os complexos carboidratos-metais, onde carboidratos podem atuar como carreadores do metal desempenhando vários efeitos terapêuticos (WEBSTER, 1991;

CANTOS et al., 1993; ROBERTS et al., 1996; CARAVAN et al., 1995; YUEN et al., 1997; MATTE et al., 2000; CRANS, 2000).

1.7.1 Vanádio

O elemento químico vanádio é um metal de transição alocado no grupo 5B da tabela periódica. Apresenta número atômico 23, eletronegatividade 1,5 e distribuição eletrônica 2, 8,11 e 2 entre as camadas K, L, M e N, respectivamente. Sua abundância natural é de 0,02% (MORINVILLE; MAYSINGER; SHAVER, 1998), podendo ser encontrado combinado com vários minerais, carvão e petróleo (COTTON; WILKINSON, 1988). Na água do mar, sua concentração média é de 2 ppb (NECHAY et al., 1986). Interessantemente, algumas espécies de tunicatos e o cogumelo *Amanita muscaria* acumulam altas concentrações de vanádio (MACARA, 1980).

Para os seres humanos são os alimentos e o ar atmosférico as principais fontes de vanádio e sua função fisiológica em mamíferos ainda não está completamente esclarecida (TSIANI; FANTUS, 1997; QURESHI et al., 1999). Este metal pode ser absorvido por inalação, trato gastrointestinal ou através da pele. Seu acúmulo tem sido descrito em tecidos como ósseo, renal e hepático (ETCHEVERRY; CORTIZO, 1998) podendo levar ao aparecimento de efeitos tóxicos relacionados ao estresse oxidativo (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999).

Várias respostas biológicas são descritas para o vanádio e seus complexos, onde se destaca a ação insulino-mimética, a qual é a mais estudada. O vanadato (V^V), é bem conhecido como agente hipoglicêmico em modelos animais diabéticos, bem como em pacientes diabéticos (SHECHTER, 1990) onde os

progressos quanto aos estudos clínicos direcionados para determinar a aplicação terapêutica do vanádio no tratamento desta patologia são crescentes (GOLDFINE et al., 1995; COHEN et al., 1995; HALBERSTAM et al., 1996; CUSI et al., 1997).

1.7.2 Estados de oxidação do vanádio

Quando em solução o vanádio apresenta estados químicos complexos, podendo existir em vários estados de oxidação, os quais podem variar de -1 a +5 (CLARK, 1973). Para estudos biológicos, destacam-se os estados de oxidação de +3, +4 e +5 (III, IV e V). O vanádio +3 (V^{III}) somente é estável em soluções ácidas de pH menor que 2 e livre da presença de oxigênio (MACARA, 1980). O vanádio +4 (V^{IV}) também é estável em soluções ácidas, podendo existir como cátion vanadilo (VO^{2+}) onde neste estado de oxidação é paramagnético em função de apresentar elétron não emparelhado. Este fato impede que este estado de oxidação possa ser detectado por espectroscopia de ressonância eletrônica de *spin* (RES) ou ressonância paramagnética eletrônica (EPR) (SREEDHARA et al., 1994; SREEDHARA et al., 1996; MICERA et al., 1996; MERCÊ et al., 1999). Já o vanádio no estado de oxidação +5 (V^V) é encontrado em solução ácida como cátion dioxovanádio (VO_2^+), enquanto que os vanadatos predominam em soluções de pH igual ou superior ao fisiológico.

1.7.3 Compostos de Vanádio

O vanádio, principalmente em seus estados de oxidação IV e V, tem sido alvo de grande interesse, por interagir com diferentes moléculas, originando

complexos, os quais têm sido caracterizados através da combinação de diferentes metodologias, como RMN (^1H , ^{13}C e ^{51}V), infravermelho, titulação potenciométrica, cristalografia de Raio X e outras (CALDEIRA et al., 1986; GERALDES; CASTRO, 1989; REDHER et al., 1989; DJORDJEVIC et al., 1995; TRACEY et al., 1990; CRANS et al., 1991; HAMBLEY et al., 1992; VERGOPOULOS et al., 1993; SREEDHARA et al., 1994; CRANS; SHIN, 1994; CRANS et al., 1995; ZHANG et al., 1996; MICERA et al., 1996; ETCHEVERRY et al., 1997a; VERCHÈRE et al., 1998; MICERA et al., 1999; MERCÉ et al., 1999). Muitos destes complexos são utilizados como modelos de interações entre o vanádio e macromoléculas (CRANS et al., 1993a; 1993b; CRANS et al., 1995; VERGOPOULOS et al., 1993), enquanto outros visam potencial aplicação farmacológica (CARAVAN et al., 1995; YUEN et al., 1997; CRANS, 2000).

1.7.4 Interação entre vanádio e carboidratos

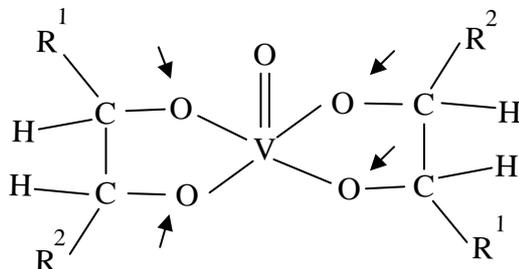
Os estudos referentes à interação entre vanádio e carboidratos é relativamente recente, havendo poucos dados na literatura que abordam este tema (TRACEY et al., 1988; GERALDES; CASTRO, 1989; SREEDHARA et al., 1994; SREEDHARA et al., 1996; ETCHEVERRY et al., 1997b). A formação de complexos entre carboidratos ácidos ou neutros e vanádio, tem sido descrita por RAY Jr. et al. (1995) e ETCHEVERRY et al. (1997b). A interação entre carboidratos e vanádio também já foi descrita para os estados de oxidação IV e V (GERALDES; CASTRO, 1989; SREEDHARA et al., 1996).

1.7.4.1 Interações entre vanádio (V^{IV}) e carboidratos

As interações entre o vanádio (V^{IV}) e sistemas 1,2 dióis formam complexos que ocorrem principalmente na razão ligante:metal 2:1 (L:M 2:1), em uma geometria piramidal quadrada (FIGURA 5). Acredita-se que esta, seja a espécie predominante para os sistemas vanadilo-carboidratos, tanto em solução quanto no estado sólido (VERCHÈRE et al., 1998).

Estudos envolvendo a caracterização de complexos entre carboidratos e o cátion oxovanádio (V^{IV}) foram descritos por SREEDHARA et al. (1996), que analisaram diferentes monossacarídeos (D-ribose, D-xilose, D-lixose, D-arabinose; e a hexose L-sorbose). Além disso, estes autores também demonstraram a complexação entre o cátion oxovanádio e alguns monossacarídicos ácidos (ácido D-glucônico, ácido D-galacturônico), bem como a interação *in vitro* de alguns destes complexos com a ribonuclease e a desoxiribonuclease. ETCHEVERRY et al. (1997a), descrevem a interação entre os monossacarídeos D-frutose, e os dissacarídeos sacarose e turanose com o íon vanadilo, onde as espécies de complexos encontradas apresentaram em solução, estequiometria ligante metal (L:M) de 2:1 para os complexos de glicose- VO^{2+} , sacarose- VO^{2+} e turanose- VO^{2+} , enquanto que os complexos frutose- VO^{2+} apresentaram estequiometria L:M de 3:1. Estas diferenças também foram detectadas entre os complexos em sua versão no estado sólido. Estudos realizados por MICERA (1989) demonstram que os monossacarídeos ácidos D-galacturônico e D-glucurônico formam complexos mais estáveis com o vanádio (V^{IV}) que para os complexos destas moléculas com o átomo de cobre.

FIGURA 5: PROPOSTA PARA POSSÍVEIS COMPLEXOS DE VANÁDIO (V^{IV}) COM COMPOSTOS POLIHIDROXILADOS



Representação do complexo L:M (2:1) de geometria bipiramidal quadrada. As setas indicam a participação de grupos dióis vicinais. FONTE: VERCHÈRE et al. (1998).

Devido às características químicas e estruturais da molécula de digeneasídeo (FIGURA 1) somadas às observações de ASCENCIO (2002) e às várias aplicações químicas e biológicas dos complexos carboidratos-metais, é de grande interesse a elucidação do comportamento químico deste glicosídeo frente a íons metálicos.

1. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho teve como objetivo geral avaliar a concentração de floridosídeo, digeneasídeo e sorbitol em espécimes de algas vermelhas pertencentes aos gêneros *Hypnea* e *Gracilaria* e estudar a formação de complexos entre a molécula de digeneasídeo e cátions.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1 Para a alga *Hypnea musciformis*:

- quantificar os CBMM nas linhagens Marrom e Verde cultivadas em laboratório sob diferentes condições de temperatura, fotoperíodo e salinidade;
- análise estatística dos dados obtidos (ANOVA/MANOVA).

2.2.2 Para a alga *Gracilaria birdiae*:

- quantificar os CBMM nas linhagens desta espécie obtidas em cultivo em mar: linhagens Verde, Marrom Esverdeada e duas linhagens de cor vermelha originadas de regiões geográficas diferentes (Ceará e Espírito Santo);
- quantificar os CBMM de espécimes selvagens provenientes de populações naturais do Espírito Santo, Brasil, em diferentes estádios reprodutivos: Gametófito feminino, Gametófito masculino e Tetrasporófito;
- análise estatística dos dados obtidos (ANOVA/MANOVA).

2.2.3 Para a alga *Gracilaria domingensis*:

- quantificar os CBMM nas linhagens Verde e Vermelha de *Gracilaria domingensis* obtidas em cultivo em laboratório;
- análise estatística dos dados obtidos (ANOVA/MANOVA).

2.2.4 Complexação do digeneasídeo com cátion vanádio:

- avaliar a formação de complexos entre a molécula de digeneasídeo frente ao íon vanadilo (VO^{2+}) em diferentes faixas de pH;
- estabelecer a porção da molécula de digeneasídeo responsável pela interação carboidrato-metal;

2. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ESPÉCIES DE ALGAS ESTUDADAS

3.1.1 Alga *Hypnea musciformis*

A espécie *H. musciformis* (Wulfen) Lamouroux, pertence à Divisão Rhodophyta, ordem Gigartinales e família Hypneaceae. Esta espécie apresenta uma ampla plasticidade na coloração das plantas, sendo que duas linhagens foram selecionadas para o presente estudo: uma linhagem Marrom e uma linhagem Verde. Uma planta Marrom com somente um ramo lateral Verde foi coletada na Ponta da Baleia, Espírito Santo (Dr.^a Noemy Yamaguishi-Tomita). As linhagens Verde e Marrom originaram-se, respectivamente, a partir do isolamento e propagação vegetativa de segmentos apicais do ramo Verde e de ramos marrons, originários de uma única planta.

3.1.1.1 Culturas unialgais de *H. musciformis* em laboratório

3.1.1.2 Esterilização da água do mar

A água do mar utilizada nos cultivos foi coletada na Base Norte do Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo, na Praia do Lamberto, em Ubatuba, SP. A salinidade média foi de 30 ± 2 ups, e o pH variou de 7,32 a 8,45. No laboratório, a água do mar foi filtrada em pré-filtro (Millipore, AP 20, retenção de partículas maiores do que 1-8 μm) por duas vezes, e aquecida em banho-maria a 100°C durante 1 h, contados após o início da fervura do banho. Neste estudo, a água do mar submetida a tal processo foi denominada água do mar esterilizada.

3.1.1.3 Meio de cultura utilizado para cultivo de *Hypnea musciformis*

Culturas unialgais de *H. musciformis* foram mantidas em meio de cultura composto por água do mar esterilizada enriquecida com a solução de Von Stosch preparada segundo EDWARDS (1970) e modificada segundo YOKOYA (1996) (TABELA 1). Essa solução foi adicionada na proporção de 4 ml da solução de Von Stosch por litro de água do mar esterilizada (este meio de cultura foi referido com a abreviatura VS/2).

TABELA 1: COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA SOLUÇÃO DE Von STOSCH PREPARADA SEGUNDO EDWARDS (1970) E MODIFICADA SEGUNDO YOKOYA (1996).

Componentes	Concentração para um litro de meio
NaNO ₃	0,50 mMol/l
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	30 μMoles/l
FeSO ₄ .7H ₂ O	1 μMol/l
MnCl ₂ .4H ₂ O	0,1 μMol/l
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	10 μMoles/l
Tiamina.HCl	0,59 μMol/l *
Biotina	4,10 nMoles/l *
Cianocobalamina	1,0 nM/l *

* Concentrações equivalentes a 50% em relação à composição original proposta por Edwards (1970).

3.1.1.4 Manutenção das culturas unialgais de *H. musciformis*

As culturas unialgais de *H. musciformis* foram iniciadas a partir do isolamento de segmentos apicais das linhagens estudadas e cultivadas em meio de cultura VS/2 durante todo o período de estudo. A troca do meio de cultura foi realizada a cada 7 dias. Foram usados frascos de boca larga, com volume de 70 ml. Toda a vidraria utilizada foi autoclavada a 121 °C durante 30 min e os instrumentos utilizados no manuseio das plantas foram esterilizados em etanol 70% e flambados ao rubro.

3.1.1.5 Condições laboratoriais para o cultivo unialgal de *Hypnea musciformis*

As linhagens de *H. musciformis* estudadas foram cultivadas na sala de cultura do Laboratório de Cultura de Algas "Marilza Cordeiro Marino" da Seção de Ficologia, Instituto de Botânica - SP, nas seguintes condições: temperatura média de 24 ± 2 °C, fotoperíodo de 14 h de luz e 10 h de escuro, salinidade 30-32 ups, densidade de fluxo fotônico de 30 a 50 $\mu\text{moles de fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, fornecidas por duas lâmpadas fluorescentes de 40 W, do tipo "luz do dia", dispostas horizontalmente acima dos frascos de cultura. A salinidade foi determinada utilizando-se um refratômetro (American Optical) e a densidade de fluxo fotônico foi determinada utilizando-se o medidor de quanta LI-COR 250 com um sensor de quanta sub-aquático (LI-COR 192 SA, LI-COR, Inc.).

3.1.1.6 Estudos experimentais das linhagens Verde e Marrom de *H. musciformis*

3.1.1.6.1 Experimento de temperatura e fotoperíodo

O cultivo das algas para este experimento foi realizado em seis câmaras incubadoras diferentes, cada uma com ajuste de temperatura combinada com um

fotoperíodo. Assim os tratamentos testados foram: temperatura 20°C e fotoperíodo 14:10; 25°C e 14:10; 30°C e 14:10; 20°C e 10:14; 25°C e 10:14 e 30°C e 10:14. As demais condições laboratoriais do experimento foram as mesmas descritas no item 3.1.1.5, tanto para a linhagem Marrom quanto para a Verde.

Para cada tratamento testado foram feitas três repetições simultâneas. Cada repetição continha seis segmentos apicais de 1cm de comprimento, provenientes das culturas unialgais. Foram usados Erlenmeyers (250 ml) contendo aproximadamente 150 ml de meio de cultura VS/2, cuja troca foi realizada a cada 7 dias.

3.1.1.6.2 Experimentos de salinidade

As diferentes salinidades foram obtidas a partir do congelamento e descongelamento da água do mar esterilizada (salinidade média de 32 ups). Utilizando este procedimento, foram obtidas salinidades altas (60-80 ups), intermediárias (25-35 ups) e baixas (5-15 ups). Com a mistura destas diferentes salinidades, foram obtidas as salinidades utilizadas no experimento (5, 15, 25, 35, 45, 55 e 65 ups). Os meios de cultura (VS/2) foram obtidos utilizando água em diferentes salinidades e esterilizadas por filtração em membrana Millipore (diâmetro do poro de 0,45 µm). As demais condições laboratoriais do experimento foram as mesmas descritas no item 3.1.1.5, tanto para a linhagem Marrom quanto para a Verde.

Para cada tratamento testado foram feitas três repetições simultâneas. Cada repetição continha quatro segmentos apicais de 1cm de comprimento, provenientes das culturas unialgais. Foram usados Erlenmeyers (250 ml) contendo aproximadamente 150 ml de meio de cultura VS/2, cuja troca meio foi realizada a cada 7 dias.

3.1.1.6.3 Tempo de cultivo e acompanhamento dos experimentos

Foi realizada a observação semanal durante o período de cinco semanas para os experimentos de temperatura, fotoperíodo e salinidade. A massa da matéria fresca obtida dos segmentos vegetativos da alga *Hypnea musciformis* foi determinada usando-se balança analítica de 4 casas decimais (marca Sartorius). O material dos experimentos de temperatura e fotoperíodo e de salinidade foi gentilmente cedido pela Dra. Nair Sumie Yokoya, da Seção de Ficologia do Instituto de Botânica (SP).

- a) cultivo das linhagens Marrom e Verde de *Hypnea musciformis* em diferentes condições de temperatura: 20, 25 e 30°C;
- b) cultivo das linhagens Marrom e Verde de *Hypnea musciformis* em diferentes fotoperíodos: 14:10 L/E e 10:14 L/E;
- c) cultivo das linhagens Marrom e Verde de *Hypnea musciformis* em diferentes salinidades: 25, 35 e 45 ups;

3.1.2 Alga *Gracilaria domingensis*

3.1.2.1 Culturas unialgais de *G. domingensis*

As linhagens Verde e Vermelha de *G. domingensis* estudadas foram cultivadas na sala de cultura do Departamento de Botânica, Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (USP), nas seguintes condições: temperatura média de 24 ± 2 °C, fotoperíodo de 12 h de luz e 12 h de escuro, salinidade 30-32 ups e aeração a cada 15 min. A densidade de fluxo fotônico de 50 $\mu\text{moles de fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ fornecidas por lâmpadas fluorescentes de 40 W, do tipo “luz do dia”, dispostas horizontalmente acima dos frascos de cultura. A salinidade foi determinada

utilizando-se um refratômetro (American Optical) e a densidade de fluxo fotônico foi determinada utilizando-se o medidor de quanta LI-COR 250 com um sensor de quanta sub-aquático (LI-COR 192 SA, LI-COR, Inc.). As culturas unialgais de *Gracilaria domingensis* foram mantidas em meio de cultura PES 100%, modificado pela ausência de tampão Tris. Este material foi gentilmente cedido pela Dra. Estela Maria Plastino, do Departamento de Botânica, Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (USP).

3.1.3 Alga *Gracilaria birdiae*

Sete linhagens de *G. birdiae* foram estudadas (TABELA 2). As linhagens VMCE e MECE foram obtidas a partir de tetrásporos liberados por um tetrasporófito de coloração vermelha coletado em Paracuru - Ceará (03°04'S; 39°07'O), em março de 1994. Espécimes da linhagem VDCE foram obtidos de mutações espontaneamente em laboratório, a partir da diferenciação de um ramo verde em um tetrasporófito vermelho (VMCE), originado do cruzamento entre um gametófito feminino vermelho e um gametófito masculino Marrom-esverdeado (MECE) (COSTA; PLASTINO, 2001). A linhagem VMES foi obtida a partir de tetrásporos liberados por um tetrasporófito de coloração vermelha coletado em Anchieta - Espírito Santo (20°80'S; 40°65'O), em agosto de 1994 (PLASTINO et al., 2004). As linhagens VMCE, MECE, VDCE e VMES foram mantidas no laboratório em culturas unialgais, estabelecidas como descrito por PLASTINO; OLIVEIRA (1990). Ramos pertencentes a estas quatro linhagens foram transferidos para Ubatuba - São Paulo (23°26.9'S; 45°0.3'O), em junho de 2002. Os ramos foram cultivados em um sistema de balsas flutuantes como descrito por PAULA et al. (1999). O material biológico utilizado no presente estudo foi coletado nestes cultivos no mar em novembro de 2002. As linhagens em diferentes estádios reprodutivos (tetrasporófito – VMTE,

gametófito feminino - VMFE e gametófito masculino – VMMA) foram coletadas diretamente da população natural de Anchieta - Espírito Santo, em setembro de 2002. A identificação dos estádios reprodutivos foi realizada logo após a coleta, utilizando-se estereomicroscópio. O material coletado em cultivos no mar ou na população natural foi limpo de epífitos, lavado em água corrente, pesado em balança analítica e seco em estufa ventilada a 40 °C, até a estabilização da biomassa seca. A relação biomassa seca/biomassa fresca foi de 11-13%, independentemente da linhagem. O material foi macerado em nitrogênio líquido até a formação de um pó fino. Este material foi gentilmente cedido pela Dra. Estela M. Plastino e Dra. Suzana Ursi, do Departamento de Botânica, Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (USP).

TABELA 2: LINHAGENS DE *Gracilaria birdiae* UTILIZADAS NO PRESENTE ESTUDO.

Abreviatura	Linhagem	Estádio reprodutivo	Estado de origem	Proveniência do material
VMCE	Vermelha	Gametófito feminino	Ceará	*Cultivo no mar
MECE	Marrom-esverdeada	Gametófito feminino	Ceará	*Cultivo no mar
VDCE	Verde	Gametófito feminino	Ceará	*Cultivo no mar
VMES	Vermelha	Gametófito feminino	Espírito Santo	*Cultivo no mar
VMFE	Vermelha	Gametófito feminino	Espírito Santo	População natural
VMMA	Vermelha	Gametófito masculino	Espírito Santo	População natural
VMTE	Vermelha	Tetrasporófito	Espírito Santo	População natural

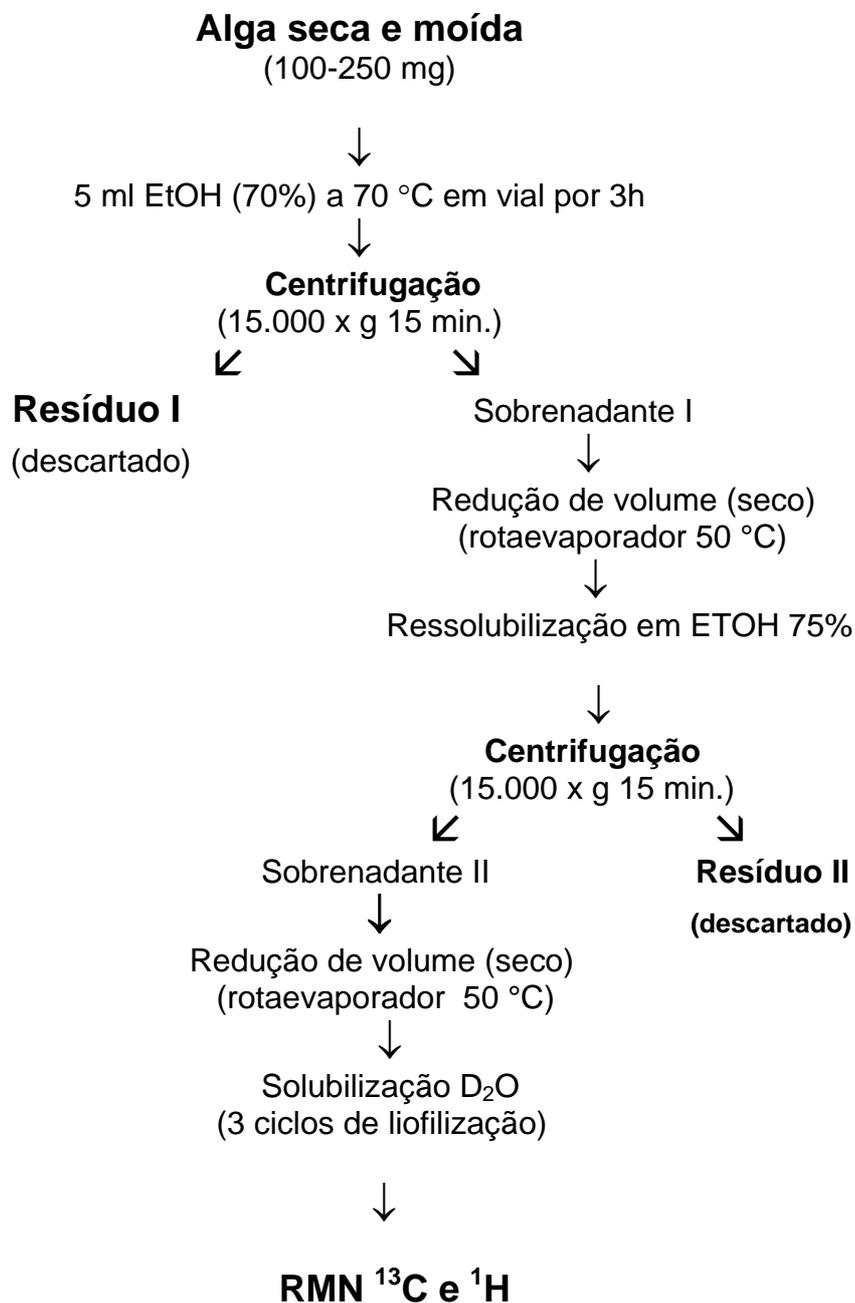
* cultivo realizado em Ubatuba, SP

3.2 EXTRAÇÃO DOS CARBOIDRATOS DE BAIXA MASSA MOLECULAR

3.2.1 Extração etanólica qualitativa dos CBMM

A alga seca e moída (100-250 mg) foi submetida à extração com álcool etílico (70% v/v) (5 ml) sob agitação em banho à temperatura de 70 °C por 3 h. O extrato etanólico obtido foi centrifugado a 15.000 x g por 15 min (KARSTEN et al.,1991), obtendo-se o sobrenadante que contém os carboidratos de baixa massa molecular (sobrenadante I). O sobrenadante I foi reduzido de volume em rotaevaporador à temperatura de 50 °C e ressolubilizado em etanol 75%, seguido de uma segunda centrifugação, realizada nas mesmas condições descritas acima. Esta segunda etapa de ressolubilização e centrifugação foi realizada na tentativa de eliminar ao máximo eventuais carboidratos de alta massa molecular que pudessem estar presente no extrato etanólico, obtendo-se desta maneira o sobrenadante II. Este material foi novamente levado a seco em rotaevaporador, à temperatura de 50°C, e solubilizado em D₂O (99,8%), seguindo-se ciclos de congelamento, liofilização e solubilização em D₂O (99,8%) (3 ciclos) para troca dos hidrogênios hidroxílicos das moléculas presentes na solução por deutério. Após estes processos de preparo e pré-purificação da amostra, seguiram-se as análises de RMN-¹³C e RMN-¹H. Estas etapas estão descritas no ESQUEMA I.

ESQUEMA I: EXTRAÇÃO* E PREPARO DE AMOSTRA PARA ANÁLISES DE RMN-¹³C E RMN-¹H.

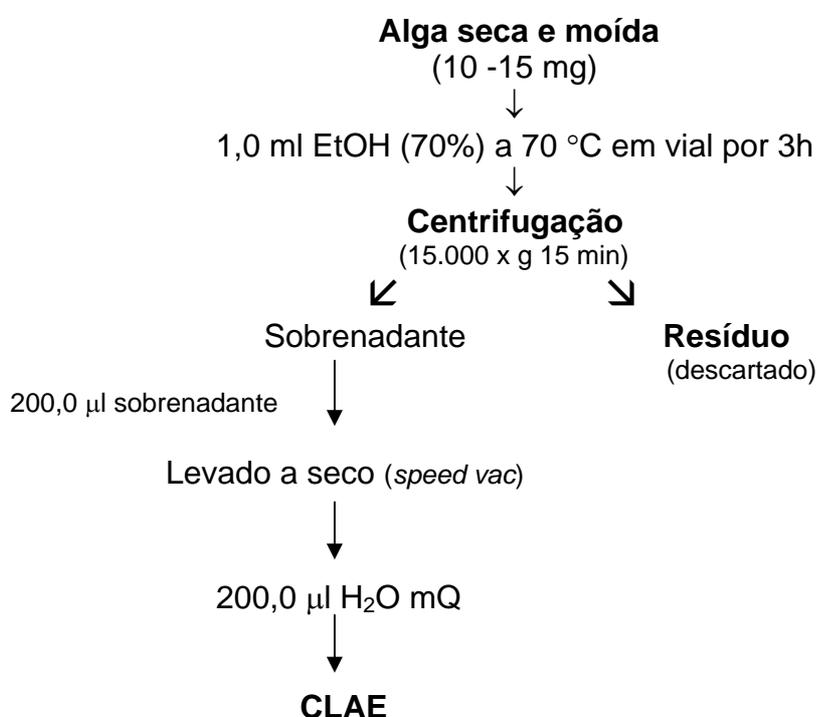


* Extração etanólica qualitativa (ETOH 70%).

3.2.2 Extração etanólica quantitativa dos CBMM

A alga seca e moída (10-15 mg exatamente) foi submetida à extração com álcool etílico (70% v/v) (1,0 ml) sob agitação, em banho à temperatura de 70 °C por 3 h. O extrato obtido foi centrifugado a 15.000 x g por 15 min (sobrenadante). Este extrato etanólico, que contém os carboidratos de baixa massa molecular, foi analisado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) segundo ASCENCIO (2002). Alíquotas de 200,0 µl do sobrenadante etanólico (sobrenadante) foram previamente levadas a seco em *speed vac* (Savant Speed Vac® PLUS SC210A). Os resíduos obtidos em *speed vac* foram solubilizados em 200,0 µl de H₂O mQ e analisados diretamente por CLAE. Estas etapas estão descritas no ESQUEMA II.

ESQUEMA II: EXTRAÇÃO* E PREPARO DE AMOSTRA PARA ANÁLISES POR CLAE.



* Extração etanólica quantitativa.

3.3 OBTENÇÃO DOS PADRÕES DE HETEROSÍDEOS E SORBITOL

Os padrões dos heterosídeos digeneasídeo e floridosídeo foram purificados através de técnicas cromatográficas preparativas de adsorção e filtração em gel como descrito por ASCENCIO (2002). Digeneasídeo foi obtido da alga *Bostrychia tenella* (J. V. Lamour.) J. Agardh, enquanto que floridosídeo foi obtido da alga *Acanthophora spicifera* (M. Vahl) Børgesen, ambas pertencentes à ordem Ceramiales (Rhodophyta). Já os padrões de sorbitol, manitol e galactitol foram adquiridos comercialmente (Sigma®).

3.3.1 Técnicas cromatográficas preparativas

3.3.1.1. Cromatografia de adsorção (Carvão-Celite 1:1)

A cromatografia de adsorção (WHISTLER; DURSO, 1950) foi realizada em coluna de vidro (6,5 x 1,2 cm d.i.) equipada com placa porosa, utilizando-se como fase estacionária uma mistura em partes iguais de carvão-Celite, tendo um volume total de aproximadamente 24,5 ml. A montagem deste sistema cromatográfico foi realizada da seguinte forma: primeiramente, uma camada fina de Celite foi adicionada e em seguida o volume da coluna foi preenchido com a fase estacionária. A amostra foi eluída sob pressão atmosférica utilizando-se inicialmente H₂O deionizada ultra pura (mQ), sendo coletadas frações de 10 ml. A eluição prosseguiu até que o eluato apresentasse reação negativa para cloretos pela reação com nitrato de prata (AgNO₃) e negativa para açúcares totais pelo método do fenol ácido sulfúrico (DUBOIS et al., 1956). A seguir, a amostra foi eluída em gradiente descontínuo de etanol a 25, 50, 75 e 100 %. De maneira similar a eluição aquosa, os açúcares totais foram monitorados pelo método de DUBOIS et al. (1956).

3.3.1.2 Cromatografia de Filtração em Gel

A cromatografia de filtração em gel foi realizada em coluna de vidro (100 x 1,5 cm d. i.) contendo BioGel P-2 (faixa de exclusão: 1800-100 Daltons) com volume total (V_t) de 176 ml e volume morto (V_0) de 54 ml. O V_0 foi determinado pela eluição de *Blue dextran* (componente com massa molecular acima do limite de inclusão do gel) acompanhado pela leitura do eluato aquoso em espectrofômetro (625 nm). O volume total da coluna foi medido através da adição de água na coluna até o nível determinado a ser preenchido pelo gel.

Utilizou-se H₂O deionizada mQ (pH 6,51) como eluente e a detecção dos açúcares foi feita pelo método de fenol ácido sulfúrico (DUBOIS et al., 1956).

3.4 QUANTIFICAÇÃO DOS HETEROSÍDEOS FLORIDOSÍDEO E DIGENEASÍDEO

A quantificação dos CBMM nas algas estudadas foi realizada de acordo com ASCENCIO (2002), a partir do extrato etanólico quantitativo utilizando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

3.4.1 Análises por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

As análises por cromatografia líquida de alta eficiência foram realizadas em aparelho da marca SHIMADZU com detector por índice de refração à temperatura de 40°C (RID 10A SHIMADZU). As amostras foram eluídas através de um sistema isocrático de bombeamento (SHIMADZU – LC10) utilizando como fase móvel solução de ácido sulfúrico (8 mmol) em H₂O mQ desgaseificada com gás hélio (He) a um fluxo de 0,6 ml.min⁻¹. A separação dos CBMM foi realizada em coluna REZEX – ROA (PHENOMENEX - Organic acid[®]) na temperatura de 65°C. As amostras

foram injetadas no aparelho através de injetor manual equipado com *loop* de 20,0 μl . Para os experimentos de padronização do método para polióis foi usada a coluna REZEX-RCM e a eluição do material foi realizada com H_2O mQ desgaseificada com gás hélio (He) a um fluxo de $0,6 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ e temperatura de 80°C . Estas duas colunas apresentam as mesmas dimensões (300 x 7,8 mm) e diâmetro de partículas (5 μm). Estas partículas, que compõem a fase estacionária, são formadas por co-polímeros de estireno divinilbenzeno sulfonado, porém a primeira coluna possui como cátion trocador o hidrogênio (forma H^+) e a segunda o chumbo (Pb^+).

3.4.2 Parâmetros de quantificação por CLAE

A quantificação dos CBMM foi realizada pelo método de padronização externa com três níveis de calibração e janela de tempo de 2%. Os padrões de cada carboidrato obtido como descrito no item 3.3 foram analisados separadamente para determinação do tempo de retenção individual. Após esta etapa, a curva de calibração foi determinada a partir de soluções padrão de cada carboidrato, onde cada solução apresentava uma mistura de floridosídeo, digeneasídeo e sorbitol nas concentrações de 75, 150 e 300 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, para cada carboidrato. Os valores de cada carboidrato são expressos em quantidade de matéria em relação à massa seca de cada espécie ($\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$). Todas as dosagens foram realizadas em triplicatas a partir de três extrações independentes.

3.5 ANÁLISES DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

Os espectros de ressonância magnética nuclear foram obtidos em espectrômetro da marca BRUKER, série Avance, modelo DRX 400, incorporado a Transformada de Fourier. As amostras, solubilizadas em 0,5 ml de água deuterada,

foram colocadas em tubos de 5 mm de diâmetro e analisadas à temperatura de 25, 40 ou 50 °C.

3.5.1 Técnicas de ressonância magnética nuclear monodimensionais

3.5.1.1 Ressonância magnética nuclear de ^{13}C (RMN- ^{13}C)

Os espectros de ressonância magnética nuclear de ^{13}C foram obtidos na frequência base de 100,16 MHz, em espectrômetro da marca BRUKER, série Avance, modelo DRX 400. Utilizou-se o intervalo de 0,1 s entre os pulsos para as aquisições dos sinais, sendo feitas, em média, 5 K aquisições. As amostras foram preparadas como descrito no item 3.2.1 e solubilizadas em 0,5 ml de D_2O (99,8%). As análises foram realizadas em tubos de 5 mm de diâmetro com a temperatura variando de 25 a 50°C de acordo com necessidade de cada experimento. Os deslocamentos químicos foram expressos em ppm utilizando-se a acetona como padrão interno (30,200 ppm) para os carbonos primários ($-\text{CH}_3$).

3.5.1.2 Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN- ^1H)

Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN- ^1H) foram obtidos em frequência de 400,13 MHz em espectrômetro BRUKER, série Avance, modelo DRX 400. As amostras foram extraídas como especificado no item 3.2.1, e redissolvidas em 0,5 ml de D_2O (99,8%). Essas soluções foram submetidas a ciclos de liofilização e ressolubilização em D_2O (99,8%) (3 vezes) para troca dos hidrogênios hidroxílicos ligados às moléculas por deutério. As amostras foram então colocadas em tubo de 5 mm de diâmetro e analisadas à temperatura de 50 °C. Foram realizados 64 *scans* para cada amostra analisada. Os deslocamentos

químicos foram expressos em ppm utilizando a acetona como padrão interno (2,224 ppm) para os hidrogênios ligados aos carbonos primários (-CH₃).

3.6 ESPECTROMETRIA DE MASSA

As análises de espectrometria de massa foram realizadas por ESI-MS (*Eletrospray Ionization – Mass Spectroscopy*), utilizando espectrômetro MICROMASS QUATTRO LC. Para determinação da massa molecular dos heterosídeos obtidos (floridosídeo e digeneasídeo), as amostras foram dissolvidas em água deionizada ultra-pura (mQ), sendo introduzidas no aparelho por injeção direta em fluxo de acetonitrila de 0,1 ml.min⁻¹. As seleções dos íons foram feitas por um quadrupolo, utilizando uma janela de massa de 10-1300 *m/z*. Foram utilizados parâmetros para a obtenção de íons no modo negativo (íons moleculares [M]⁻ ou [2M⁻+Na]⁻) para digeneasídeo e modo positivo (íons moleculares [M+Na]⁺) para floridosídeo.

3.7 TRATAMENTO DO DIGENEASÍDEO COM RESINA CATIÔNICA (DOWEX 50-X8)

Para obter o padrão de digeneasídeo na forma de um único sal, a amostra foi tratada com uma resina catiônica na forma de sal de potássio. A resina utilizada (DOWEX 50-X8) possui base de poliestireno, com grupo funcional sulfônico. Foi montada uma coluna com tal resina e então tratada com KOH 1mol/l, para garantir que seus grupos funcionais estivessem ligados ao potássio, seguido de lavagem com H₂O mQ até pH 6,51. A amostra foi então aplicada na coluna e eluída com H₂O mQ (0,2 ml.min⁻¹). Após este tratamento, a amostra foi levada a seco e utilizada para as análises de complexação com íons vanadilo.

3.8 PREPARO DA AMOSTRAS DOS COMPLEXOS DIGENEASÍDEO-ÍON VANADILO PARA ANÁLISES POR RMN-¹³C

Para a realização das análise de RMN-¹³C dos experimentos de complexação entre a molécula de digeneasídeo e íons vanadilo, 50 mg de digeneasídeo (forma de sal de potássio) foram dissolvidas em 1,8 ml de solução de íon vanadilo (VO), obtendo-se uma solução na equimolar de íon vanadilo-digeneasídeo na concentração de 0,1 M. A solução de íon vanadilo 0,1 M foi preparada a partir de sulfato de vanadil em solução de ácido nítrico (HNO₃) 0,4 M como previamente descrito por MERCÊ et al. (1999). Em seguida o pH da solução vanadilo-Digeneasídeo foi ajustada pela adição de solução deuterada de KOH 1,0 M e 0,1 M. Estas soluções foram obtidas pela dissolução de KOH em D₂O 99,9 %. Desta forma foram obtidas várias amostras em diferentes valores de pH (2,76 à 6,86). Os espectros de RMN-¹³C foram obtidos à temperatura de 25°C como descrito no item 3.5.1.1. Os respectivos espectros obtidos foram calibrados a partir do carbono anomérico da molécula de digeneasídeo em 98,4 ppm.

3.9 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados obtidos na quantificação por CLAE dos CBMM dos diferentes espécimes de algas estudados foram submetidos a análises estatísticas (ANOVA/MANOVA) através do programa STATISTICA (Stat Soft) 5.5 99, sendo variáveis dependentes a concentração de floridosídeo, digeneasídeo e sorbitol, e variáveis independentes especificadas para cada experimento. A comparação das médias e análise de correlação linear foi realizada utilizando o método de *Tukey HDS test* (P<0,05) como teste de significância.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 OBTENÇÃO DOS PADRÕES DE DIGENEASÍDEO E FLORIDOSÍDEO

Os padrões dos heterosídeos digeneasídeo e floridosídeo foram obtidos de acordo com a metodologia descrita por ASCENCIO (2002).

O heterosídeo digeneasídeo foi purificado a partir da alga vermelha *Bostrychia binderii* (Ceramiales, Rhodophyta). A alga seca e moída (60 g) foi submetida à extração sob refluxo com metanol-água (85:15 v/v) a 60°C por 4 h. Após a extração, o material foi centrifugado e o sobrenadante metanólico levado a seco em rotoevaporador a 40°C. O resíduo foi solubilizado em água deionizada e submetido à cromatografia de adsorção em carvão:Celite (1:1) usando como eluente água deionizada ultra pura (mQ). O eluato aquoso foi levado a seco, solubilizado em 1 ml de água mQ e submetido à cromatografia de filtração em gel (Bio-Gel[®] P-2). O material foi eluído com água mQ a um fluxo de 0,2 ml/min e fracionado em tubos a cada 2,5 ml. Frações contendo digeneasídeo puro foram obtidas entre o volume de 60 a 80 ml de eluição. O monitoramento da presença de carboidratos em ambas cromatografias foi realizado pelo método do fenol ácido sulfúrico (DUBOIS et al., 1956).

As FIGURAS 6 e 7 mostram, respectivamente, os espectros de RMN-¹³C e ESI-MS do padrão de digeneasídeo obtido.

O heterosídeo floridosídeo foi purificado a partir da alga vermelha *A. spicifera* (Ceramiales, Rhodophyta). A alga seca e moída (50 g) foi submetida à extração com etanol-água (70:30 v/v) a 70°C por 3 h. Após centrifugação, o sobrenadante etanólico foi levado a seco em rotoevaporador a 40°C, solubilizado em água mQ e submetido à cromatografia de adsorção em carvão-Celite (1:1). O material foi eluído da coluna com água deionizada, seguida de eluição em gradiente descontínuo de

etanol (25, 50, 75 e 100%). Floridosídeo puro foi obtido na fração eluída com etanol 25%, a qual foi levada a seco em *speed vac*. As FIGURAS 8 e 9 mostram, respectivamente, o espectro de RMN-¹³C e ESI-MS do padrão de floridosídeo obtido, com índice de pureza maior que 98%.

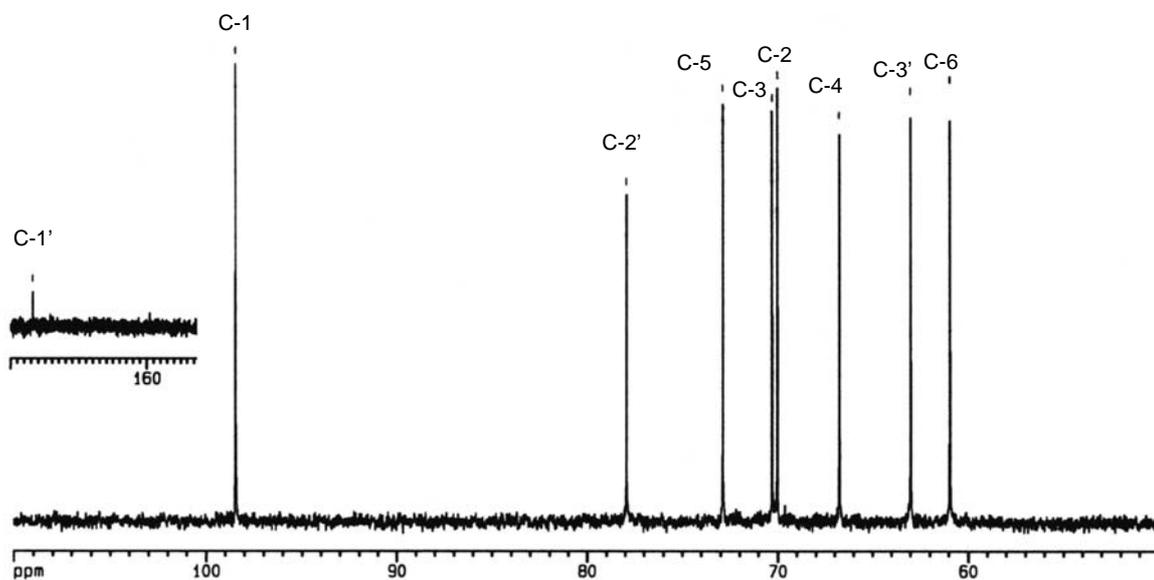
Os assinalamentos dos deslocamentos químicos (ppm) dos núcleos de ¹³C e ¹H para os heterosídeos floridosídeo e digeneasídeo os quais estão descritos na TABELA 3 (ASCENCIO, 2002; ASCENCIO et al., 2006).

TABELA 3: ASSINALAMENTO DE RMN-¹³C E ¹H PARA A MOLÉCULA DE DIGENEASÍDEO E FLORIDOSÍDEO.

Átomos	Digeneasídeo (ppm)		Floridosídeo (ppm)	
	¹³ C	¹ H	¹³ C	¹ H
1	98,5	4,88	97,8	5,15
2	70,0	4,08	68,5	3,82
3	70,3	3,93	69,3	3,90
4	66,8	3,67	69,1	3,99
5	72,9	3,74	70,9	4,09
6	61,0	3,77 e 3,89	61,5	3,74
1'	176,9	-----	61,2	3,76
2'	78,0	4,20	78,8	3,81
3'	63,0	3,76 e 3,83	60,4	3,78

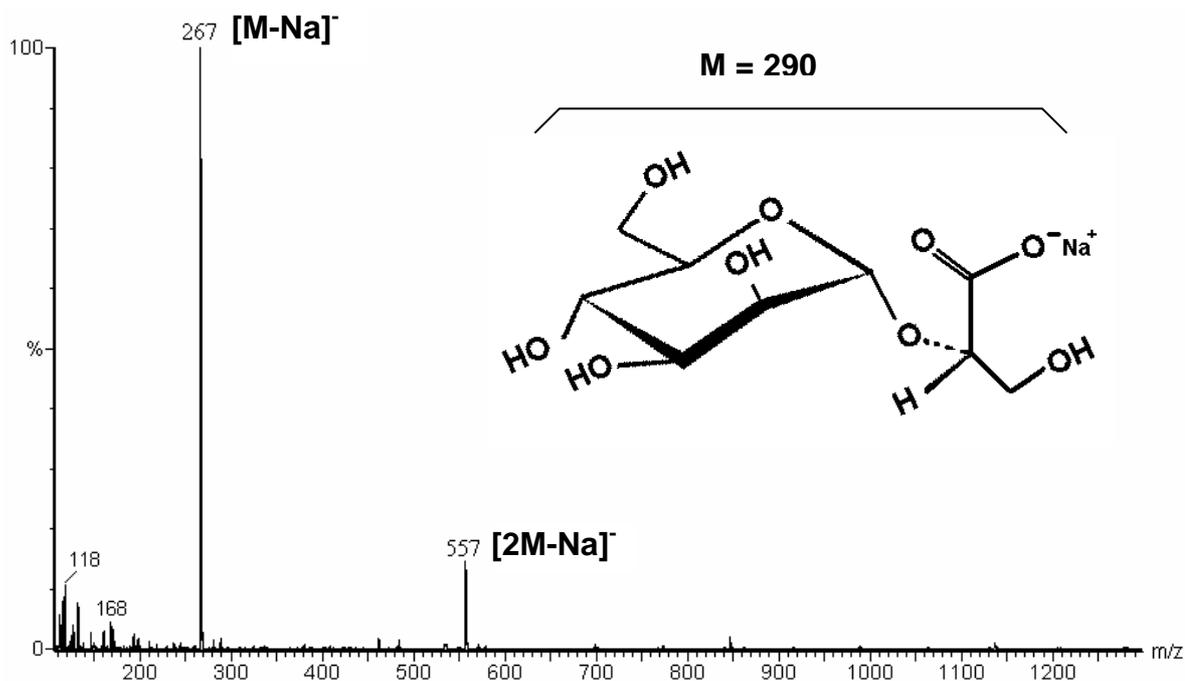
Átomos de 1' a 3' são referentes à porção do ácido glicérico do digeneasídeo e glicerol do floridosídeo.

FIGURA 6: ESPECTRO DE RMN-¹³C CORRESPONDENTE AO PADRÃO DE DIGENEASÍDEO PURIFICADO DA ALGA *B. binderii*.



*C-1'= 176,9: sinal referente ao carbono carboxílico da molécula de digeneasídeo.

FIGURA 7: ESPECTRO DE ESI-MS CORRESPONDENTE AO PADRÃO DE DIGENEASÍDEO PURIFICADO DA ALGA *B. binderii*.



M = 290: Massa molecular do digeneasídeo como sal de sódio.

FIGURA 8: ESPECTRO DE RMN-¹³C CORRESPONDENTE AO PADRÃO DE FLORIDOSÍDEO PURIFICADO DA ALGA *A. spicifera*.

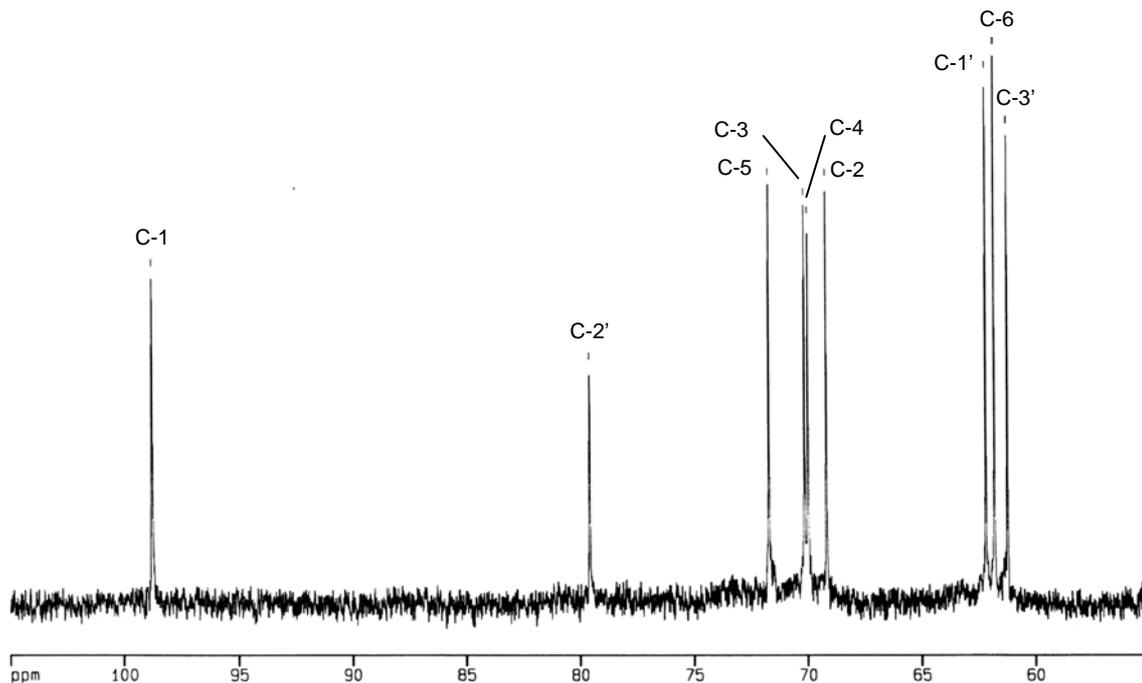
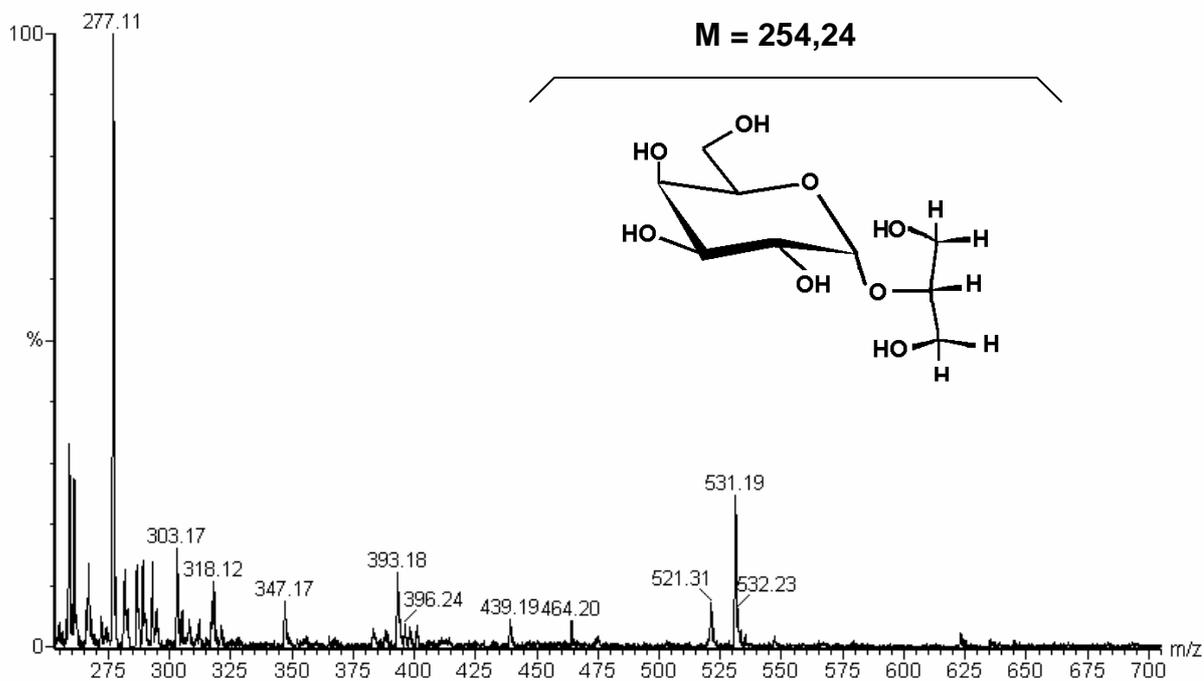


FIGURA 9: ESPECTRO DE ESI-MS* CORRESPONDENTE AO PADRÃO DE FLORIDOSÍDEO PURIFICADO DA ALGA *A. spicifera*.



*M = 254,24: massa molecular do floridosídeo

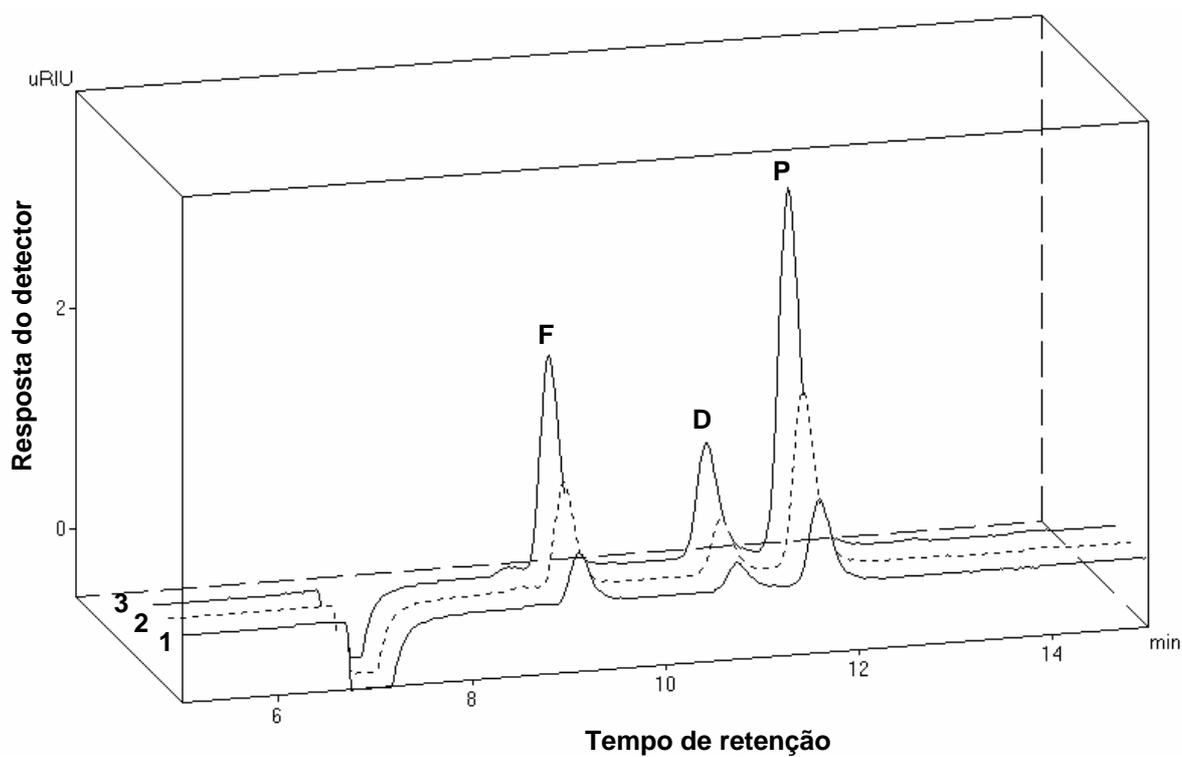
4.2 VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE QUANTIFICAÇÃO POR CLAE

Para produzir dados confiáveis em relação à quantificação dos CBMM, a primeira etapa deste trabalho foi à validação do método de quantificação (ASCENCIO, 2002). Desta forma, foram utilizadas para este fim CBMM de espécies de algas: *Acanthophora spicifera* que apresenta digeneasídeo e floridosídeo (ASCENCIO, 2002) e *Bostrychia tenella* que apresenta digeneasídeo e polióis (KARSTEN et al., 1992). Utilizando padrões previamente purificados em nosso laboratório (item 4.1), foi possível estabelecer uma curva de calibração para estes carboidratos. A FIGURA 10 mostra os cromatogramas dos padrões de digeneasídeo (9,10 min), floridosídeo (10,70 min) e polióis (11,57 min) analisados por uma coluna de troca iônica (Rezex - ROA) para os três níveis de calibração de cada carboidrato (75, 150 e 300 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$).

Como a coluna de separação anteriormente mencionada não apresenta resolução entre os polióis, fez-se necessário a utilização de uma coluna para monossacarídeos (Rezex - RCM). Os cromatogramas dos padrões de manitol (26,59 min), galactitol (dulcitol) (32,45 min) e sorbitol (34,96 min) para os três níveis de calibração anteriormente descritos são mostrados na FIGURA 11.

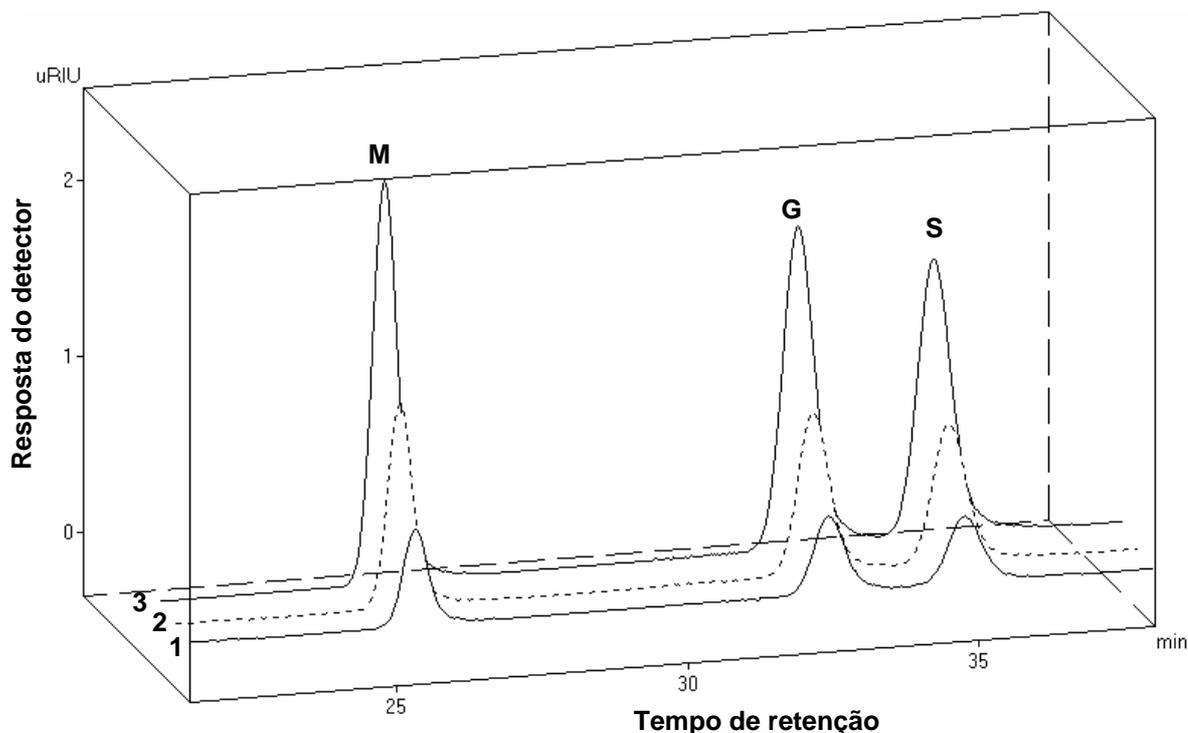
Nos cromatogramas das FIGURAS 10 e 11, é possível observar diferenças entre as áreas dos heterosídeos (floridosídeo e digeneasídeo), e entre os polióis para uma mesma concentração. Este fato é devido a diferenças na resposta ao detector por índice de refração para cada carboidrato, evidenciando a necessidade de se estabelecer curvas de calibração independentes para cada carboidrato em análise. Desta forma, foi possível justificar a escolha do método de quantificação por padronização externa, uma vez que este método permite corrigir tais diferenças em relação ao detector.

FIGURA 10: ANÁLISE POR CLAE DOS TRÊS NÍVEIS DE CALIBRAÇÃO DOS CBMM UTILIZANDO A COLUNA REZEX - ROA*.



*Os cromatogramas 1, 2 e 3 são referentes a concentração de 75, 150 e 300 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, respectivamente; **F** – floridosídeo, **D** – digeneasídeo e **P** – poliol (sorbitol); μRIU : micro unidades de índice de refração.

FIGURA 11: ANÁLISE POR CLAE DOS TRÊS NÍVEIS DE CALIBRAÇÃO DOS POLIÓIS UTILIZANDO A COLUNA REZEX – RCM*.



*Os cromatogramas 1, 2 e 3 são referentes à concentração de 75, 150 e 300 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, respectivamente; **M** – manitol, **G** – galactitol e **S** – sorbitol; μRIU : micro unidades de índice de refração.

4.2.1 Linearidade e exatidão do método

Após o estabelecimento dos níveis de calibração, foi avaliada a linearidade do método no intuito de se verificar a proporcionalidade entre a área observada no cromatograma (resposta do detector) e a concentração de cada carboidrato. Os dados obtidos através da equação da curva para cada nível de calibração mostram uma relação linear entre a resposta do detector por índice de refração e a concentração dos carboidratos analisados (coeficientes de correlação maiores que 0,99 para os três níveis de calibração). Estes dados indicam que o método utilizado

apresenta exatidão para as concentrações testadas. Os resultados para as duas colunas de separação testadas, Rezex-ROA e Rezex-RCM, estão expressos nas TABELAS 4 e 5, respectivamente.

TABELA 4: ANÁLISE DA LINEARIDADE ENTRE A CONCENTRAÇÃO DOS CARBOIDRATOS E RESPOSTA DO DETECTOR (RI) ANALISADOS NA COLUNA DE SEPARAÇÃO REZEX-ROA.

Analito	Concentração ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)	r^2	Equação da curva
Digeneasídeo	75 – 250	0.999	$y = 1220718x - 18845$
Floridosídeo	75 – 250	0.998	$y = 735946x - 10621$
Sorbitol	75 – 250	0.998	$y = 2352135x - 34734$

r^2 : coeficiente de correlação linear de Pearson; x: concentração ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$); y: área do pico.

TABELA 5: ANÁLISE DE LINEARIDADE ENTRE A CONCENTRAÇÃO DOS CARBOIDRATOS E RESPOSTA DO DETECTOR (RI) ANALISADOS NA COLUNA DE SEPARAÇÃO REZEX-RCM.

Analito	Concentração ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)	r^{2a}	Equação da curva ^b
Manitol	75 – 300	1.000	$y = 2535781x - 11070$
Galactitol	75 – 300	1.000	$y = 2570037x - 13154$
Sorbitol	75 – 300	1.000	$y = 2421473x - 20540$

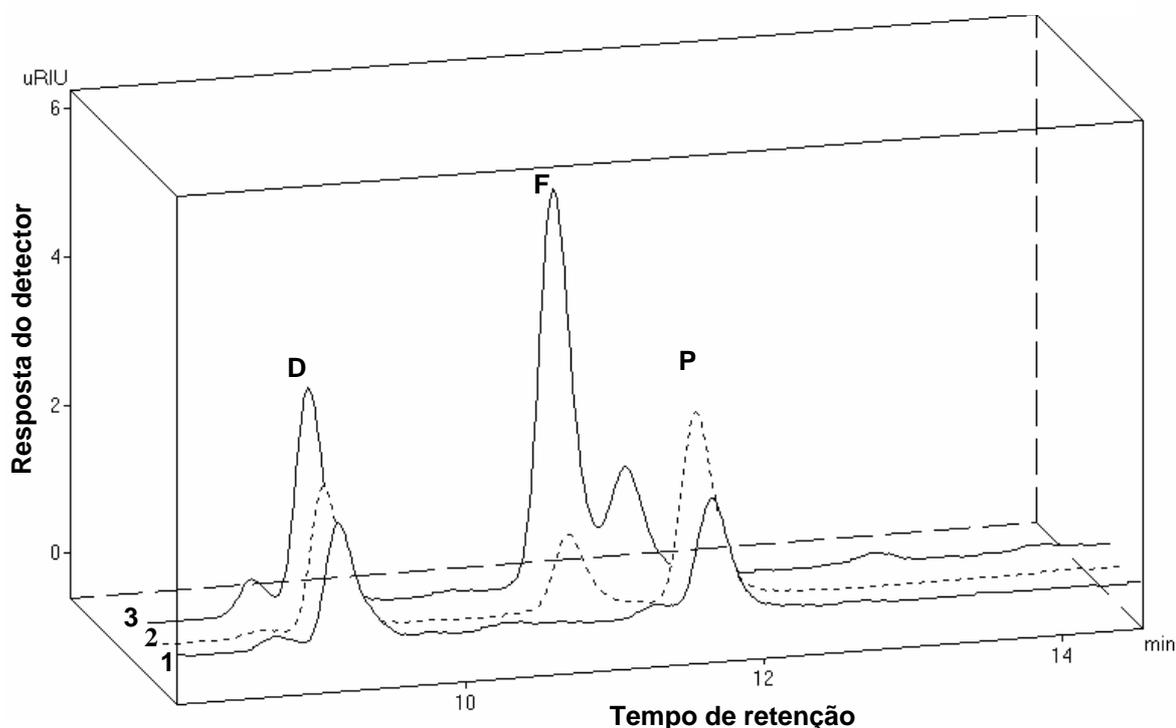
r^2 : coeficiente de correlação linear de Pearson; x: concentração ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$); y: área do pico.

4.2.2 Precisão e reprodutibilidade do método

A avaliação da precisão e reprodutibilidade do método foi realizada através da quantificação dos CBMM nas espécies de alga vermelha *A. spicifera* e *B. tenella*. Estas algas foram escolhidas devido à composição dos seus CBMM (ASCENCIO, 2002; KARSTEN et al., 1992) e pela disponibilidade do material em nosso laboratório. Desta forma, foram submetidas à extração etanólica quantitativa, seguindo o protocolo de preparo de amostra descrito no item 3.2.2. Através da sobreposição dos cromatogramas dos padrões e de cada alga, obtidos por separação dos carboidratos na coluna Rezex-ROA (FIGURA 12), podemos observar a presença dos heterosídeos floridosídeo e digeneasídeo para a alga *A. spicifera*, enquanto que para a alga *B. tenella* foi observado a presença de digeneasídeo e polióis, confirmando os dados anteriormente publicados (ASCENCIO, 2002; KARSTEN et al., 1992). Os dados quantitativos estão descritos na TABELA 6.

Devido à presença de polióis na alga *B. tenella*, fez-se necessário a análise desta alga utilizando a coluna de separação Rezex-RCM, para identificar a presença de determinados polióis.

FIGURA 12: ANÁLISE POR CLAE DOS CBMM DAS ALGAS *A. spicifera* e *B. tenella* UTILIZANDO A COLUNA REZEX – ROA EM COMPARAÇÃO COM PADRÕES*.



*cromatograma 1: *B. tenella*; cromatograma 2: padrão de CBMM; cromatograma 3: *A. spicifera*. D- digeneasídeo; F – floridosídeo; P – polióis; μ RIU: micro unidades de índice de refração.

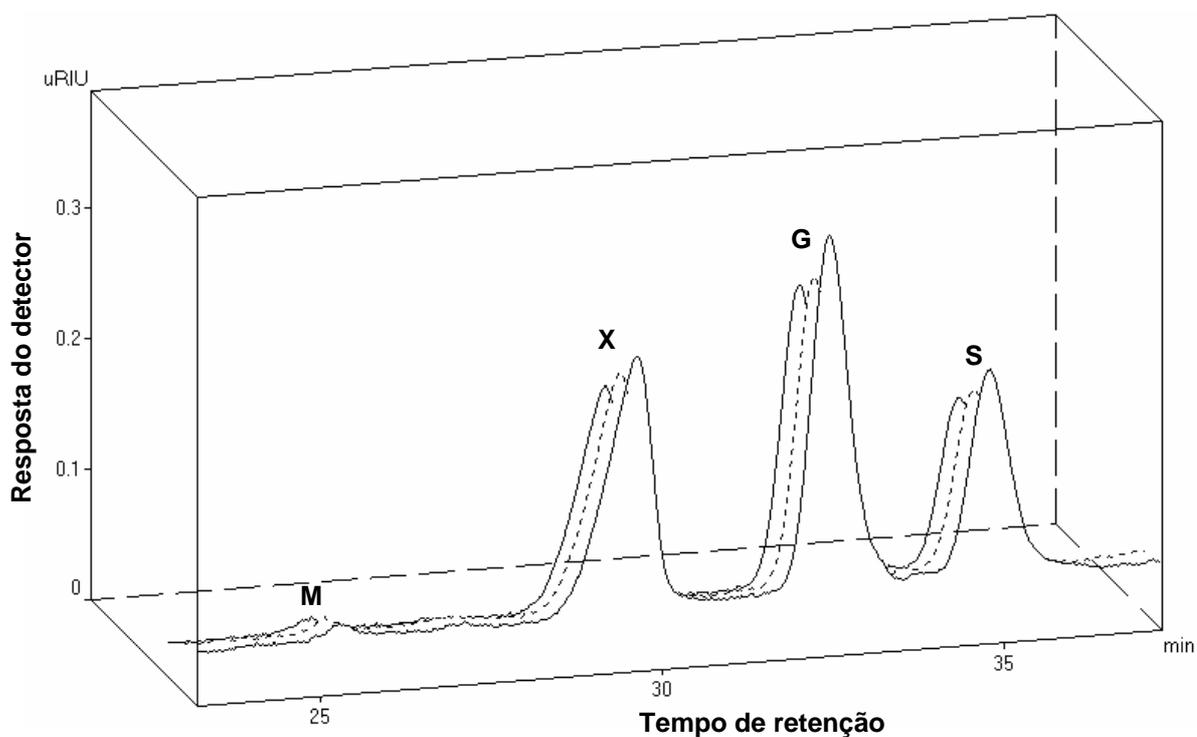
TABELA 6: ANÁLISE POR CLAE DOS CBMM OBTIDOS DE *A. spicifera* e *B. tenella* UTILIZANDO COLUNA REZEX-ROA*.

Alga	CLAE (μ moles.g ⁻¹)		
	Digeneasídeo	Floridosídeo	Polióis Total
<i>A. spicifera</i>	85,50 (1,634)	315,72 (8,003)	nd
<i>B. tenella</i>	41,35 (1,779)	nd	36,58 (2,009)

Os resultados são médias (desvio padrão) de três determinações independentes; nd – não detectado.

Através das análises por CLAE utilizando a coluna Rezex-RCM para separação dos carboidratos presentes nos extratos etanólicos quantitativos obtidos da alga *B. tenella* foi possível caracterizar a presença de três polióis: manitol, galactitol e sorbitol. Estes resultados podem ser observados na sobreposição dos cromatogramas obtidos de três repetições simultâneas de cada extração (FIGURA 13) e seus dados quantitativos estão descritos na TABELA 7.

FIGURA 13: ANÁLISE POR CLAE DOS CBMM DA ALGA *B. tenella* UTILIZANDO A COLUNA REZEX – RCM*.



*cromatogramas de três repetições simultâneas; **M** – manitol, **X**- composto não identificado, **G** – galactitol e **S** – sorbitol; μ RIU: micro unidades de índice de refração.

TABELA 7: ANÁLISE POR CLAE DA ALGA *B. tenella* UTILIZANDO A COLUNA DE REZEX-RCM.

Alga	Poliol ($\mu\text{moles.g}^{-1}$)			
	Manitol	Galactitol	Sorbitol	Polióis total
<i>B. tenella</i>	2.38 (0.049)	19.45 (1.451)	15.10 (0.838)	36.93 (1.390)

Os resultados são médias (desvio padrão) de três determinações independentes.

Como já era esperado, o valor obtido da somatória das concentrações dos três polióis encontrados na alga *B. tenella* analisados utilizando a coluna de separação Rezex-RCM, são muito próximos dos resultados encontrados para os polióis totais desta mesma alga quando analisados utilizando a coluna de separação Rezex-ROA (ver TABELAS 6 e 7). Além disso, foi detectada a presença de pequenas concentrações do alditol manitol na alga *B. tenella*, sendo que este carboidrato não havia sido relatado nos dados publicados por KARSTEN et al. (1992).

Estes resultados demonstram que ambos os métodos são precisos e apresentam boa reprodutibilidade, assegurando resultados confiáveis em relação à identificação e quantificação dos CBMM para as algas estudadas neste trabalho.

4.3 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS CBMM DAS LINHAGENS MARROM E VERDE DA ALGA *Hypnea musciformis*

4.3.1 Avaliação dos CBMM da alga *H. musciformis* cultivada em diferentes condições de fotoperíodo e temperatura

As linhagens Marrom e Verde da alga *Hypnea musciformis* cultivadas em diferentes condições de fotoperíodo e temperatura foram submetidas à extração etanólica quantitativa (item 3.2.2) e analisados por CLAE conforme descrito por ASCENCIO (2002) e validado no presente trabalho.

Em todos os espécimes de *H. musciformis* estudados foi detectada a presença de dois heterosídeos (floridosídeo e digeneasídeo) e sorbitol. Estes resultados evidenciam a necessidade de uma revisão quanto ao uso do heterosídeo digeneasídeo como marcador quimiotaxonômico de espécies de algas pertencentes à ordem Ceramiales, uma vez que *H. musciformis*, que pertence à ordem Gigartinales, biossintetiza digeneasídeo. Este é o primeiro relato da presença conjunta de floridosídeo e digeneasídeo em uma espécie da ordem Gigartinales.

Além disso, foram produzidos dados quantitativos da concentração de floridosídeo, digeneasídeo e sorbitol para as linhagens Marrom (TABELA 8) e Verde (TABELA 9) de *H. musciformis* cultivadas em diferentes condições de fotoperíodo e temperatura (descritas no item 3.1.2.5), simulando possíveis situações sazonais.

Os dados quantitativos obtidos foram submetidos a análises estatísticas de variância, tendo como variáveis independentes: 1-fotoperíodos (14:10 de 10:14); 2-temperatura (20, 25 e 30°C); 3-linhagens (Marrom e Verde); e variáveis dependentes: concentração de floridosídeo (CONCF), concentração de digeneasídeo (CONCD) e concentração de sorbitol (CONCS).

TABELA 8: CONCENTRAÇÃO DE CBMM PRESENTES NA LINHAGEM MARROM DE *H. musciformis* QUANDO SUBMETIDA A DIFERENTES CONDIÇÕES DE CULTIVO.

Fotoperíodo (L/E)	Temperatura (°C)	Floridosídeo $\mu\text{moles.g}^{-1}$	Digeneasídeo $\mu\text{moles.g}^{-1}$	Sorbitol ^b $\mu\text{moles.g}^{-1}$
14:10	20	175,79 (13,7)	17,02 (0,59)	8,01 (0,28)
14:10	25	91,24 (3,86)	9,95 (0,62)	9,62 (0,17)
14:10	30	279,31 (12,1)	61,19 (4,67)	8,92 (1,49)
10:14	20	155,40 (8,65)	15,47 (0,52)	8,48 (0,19)
10:14	25	61,22 (2,25)	11,85 (0,23)	7,74 (0,78)
10:14	30	298,90 (13,4)	58,63 (3,23)	9,14 (0,37)

L/E = horas de luz / horas de escuro; os resultados são médias (desvio padrão) de três determinações independentes.

TABELA 9: CONCENTRAÇÃO DE CBMM PRESENTES NA LINHAGEM VERDE DE *H. musciformis* QUANDO SUBMETIDA A DIFERENTES CONDIÇÕES DE CULTIVO.

Fotoperíodo (L/E)	Temperatura (°C)	Floridosídeo $\mu\text{moles.g}^{-1}$	Digeneasídeo $\mu\text{moles.g}^{-1}$	Sorbitol ^b $\mu\text{moles.g}^{-1}$
14:10	20	152,59 (6,57)	17,82 (0,42)	8,59 (0,10)
14:10	25	57,48 (9,19)	8,54 (1,31)	9,59 (0,30)
14:10	30	115,68 (7,80)	22,48 (1,47)	6,70 (0,69)
10:14	20	163,25 (2,53)	17,23 (0,44)	8,06 (0,43)
10:14	25	42,11 (2,93)	11,21 (0,84)	7,47 (0,54)
10:14	30	197,96 (14,2)	40,30 (2,32)	7,60 (0,30)

L/E = horas de luz / horas de escuro; os resultados são médias (desvio padrão) de três determinações independentes.

4.3.1.1 Heterosídeo Floridosídeo

A) Linhagem Marrom de *H. musciformis*

Quando comparadas as concentrações de floridosídeo (TABELA 8) para esta alga nas diferentes condições de temperaturas testadas para o fotoperíodo 14:10 (L/E), são observadas diferenças estatisticamente significativas entre as três temperaturas ($p < 0,001$). Estas diferenças também se repetem para o fotoperíodo 10:14 ($p < 0,001$).

Já a comparação dos dados obtidos na mesma temperatura, porém em fotoperíodos diferentes mostram que existe diferença estatisticamente significativa na concentração de floridosídeo apenas para a temperatura de 25°C ($p = 0,0203$), onde para esta temperatura a linhagem Marrom de *H. musciformis* acumula menos floridosídeo quando o período de luz é menor.

Estes resultados sugerem que a variável temperatura influencia na biossíntese de floridosídeo em ambos fotoperíodos para a linhagem Marrom de *H. musciformis*, e que o seu efeito pode ser considerado mais significativo do que a variação no fotoperíodo.

Segundo YOKOYA et al. (2003), a linhagem Marrom de *H. musciformis* apresenta maior taxa de crescimento nas temperaturas de 20 e 25°C, tendo na temperatura de 20°C seu crescimento mais expressivo. Estes resultados foram obtidos de experimentos realizados aplicando-se um fotoperíodo 14:10 (L/E). Levando-se em conta que floridosídeo pode servir de fonte de carbono para a síntese da parede celular em Rhodophyta (LI et al., 2002), podemos levantar a hipótese de que nas temperaturas de maior taxa de crescimento o consumo de floridosídeo seria maior, uma vez que este carboidrato estaria sendo desviado para a síntese de parede celular.

Esta hipótese explicaria o aumento na concentração de floridosídeo na alga para a temperatura de 30°C, uma vez que nesta temperatura o consumo de floridosídeo para a síntese de parede celular seria menor, o que condiz com uma menor taxa de crescimento. Por outro lado, concentrações maiores de floridosídeo na temperatura de 20°C, quando comparadas com a temperatura de 25°C poderia ser explicada por um aumento na biossíntese deste heterosídeo pela enzima Floridosídeo fosfato sintase, a qual pode apresentar uma atividade catalítica maior para esta temperatura, uma vez que a 20 °C *H. musciformis* apresenta uma maior taxa de crescimento.

B) Linhagem Verde de *Hypnea musciformis*

Da mesma maneira que observado para a linhagem de cor Marrom, os dados obtidos para a concentração de floridosídeo (TABELA 9) na linhagem Verde de *H. musciformis* nas diferentes temperaturas testadas para o fotoperíodo 14:10, apontam diferenças significativas nas três temperaturas ($p < 0,002$). Diferenças que também se repetem para o fotoperíodo 10:14 ($p < 0,005$).

Interessantemente, diferente da linhagem Marrom, ocorre uma inversão na concentração de floridosídeo nas temperaturas extremas (20 e 30°C), sendo que para linhagem Verde de *H. musciformis*, analisando o fotoperíodo 14:10, a concentração de floridosídeo é menor na temperatura de 30°C que a 20°C. Além disso, a comparação dos dados entre os fotoperíodos 14:10 e 10:14 mostra diferença significativa na concentração de floridosídeo apenas para a temperatura de 30°C ($p = 0,0001$).

Interessantemente, os dados de taxa de crescimento da linhagem Verde de *H. musciformis* não demonstram diferenças entre as temperaturas de 20, 25 e 30°C (YOKOYA et al., 2003). Levando-se em consideração que a linhagem Verde

apresenta concentrações mais baixas de ficoeritrina e concentrações mais altas de ficocianina e aloficocianina quando comparada com a linhagem Marrom (YOKOYA et al., 2003), diferenças significativas na concentração dos componentes fotossintéticos (heterosídeos) deveriam ser encontradas para a variável fotoperíodo. Porém, esta diferença ocorre apenas para a temperatura de 30°C, o que reforça a sugestão de que a temperatura influencia no metabolismo de floridosídeo de maneira mais evidente. Outrossim, seria a hipótese de que a biossíntese de floridosídeo nas condições testadas poderia estar parcialmente comprometida pela ausência dos pigmentos acessórios (ficoeritrina), e que portanto, o fotoperíodo 14:10 seria uma condição de estresse de luz para a alga, já que neste fotoperíodo a alga recebe 4 h adicionais de luz. Esta situação estaria minimizada para o fotoperíodo 10:14, onde a síntese do floridosídeo seria menos comprometida pelo estresse luminoso (fotoperíodo), e não influenciada pela temperatura, o que poderia justificar uma maior concentração deste heterosídeo na alga nestas condições.

C) Comparação da biossíntese do heterosídeo floridosídeo entre as linhagens Marrom e Verde de *Hypnea musciformis*

Os dados obtidos para a concentração de floridosídeo nas linhagens Marrom e Verde (TABELAS 8 e 9) da alga *H. musciformis* mostram que a biossíntese deste heterosídeo é estatisticamente diferente para estas linhagens de cor ($p = 0,001$). Além disso, a média na concentração deste carboidrato é sempre maior para a linhagem Marrom, independente da temperatura e fotoperíodo. Esta diferença poderia estar relacionada com a taxa de crescimento, já que para a linhagem Verde não há diminuição do crescimento em função da temperatura, o que justificaria uma menor concentração de floridosídeo, uma vez que este carboidrato estaria sendo consumido na síntese de parede celular da alga. Este fato mostra que a biossíntese

deste heterosídeo também é influenciada pela variável Linhagem. Estes dados podem ser visualizados nas FIGURAS 14 e 15.

Avaliando a influência da variável fotoperíodo sobre a biossíntese de floridosídeo entre as duas linhagens de cor, é possível verificar que para a linhagem Marrom, a concentração deste heterosídeo é maior quando a alga recebe um período maior de exposição à luz, enquanto que para a linhagem Verde esta situação se inverte (FIGURA 16). Este fato reforça a hipótese da influência dos pigmentos acessórios na biossíntese destes carboidratos. Dados semelhantes foram observados para linhagens de cor selvagens de *H. musciformis* (ASCENCIO et al., 2002).

Analisando-se a influência das três variáveis independentes sobre a biossíntese do floridosídeo para a alga *H. musciformis* (Figura 14) é possível observar que na temperatura de 20°C maior taxa de crescimento para as duas linhagens, sem diferenças estatísticas (YOKOYA et al., 2003) a concentração de floridosídeo é estatisticamente igual para as duas linhagens ($p = 0,1400$) em ambos fotoperíodos ($p = 0,2723$). No entanto, à medida que aumentamos a temperatura do cultivo, o metabolismo deste carboidrato também sofre modificações entre as linhagens, porém, apenas a linhagem Verde apresenta diferenças que são influenciadas pelo fotoperíodo (temperatura de 30°C, $p = 0,001$). Estes dados reforçam a hipótese de relação entre a taxa de crescimento da alga e as concentrações citoplasmáticas de floridosídeo.

Além disso, os resultados obtidos demonstram claramente que as duas linhagens Verde e Marrom de *H. musciformis* apresentam funções fisiológicas diferenciadas em relação ao metabolismo de floridosídeo, o que pode servir como fator decisivo para a adaptação da espécie nas diferentes regiões tropicais da costa brasileira, uma vez que estão sujeitas a variações de temperaturas e luminosidade.

Outrossim, os dados auxiliam no entendimento das variações sazonais das concentrações destes carboidratos em espécimes selvagens de algas vermelhas.

FIGURA 14: INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA NA BIOSÍNTESE DE FLORIDOSÍDEO NAS LINHAGENS MARROM E VERDE DE *H. musciformis*.

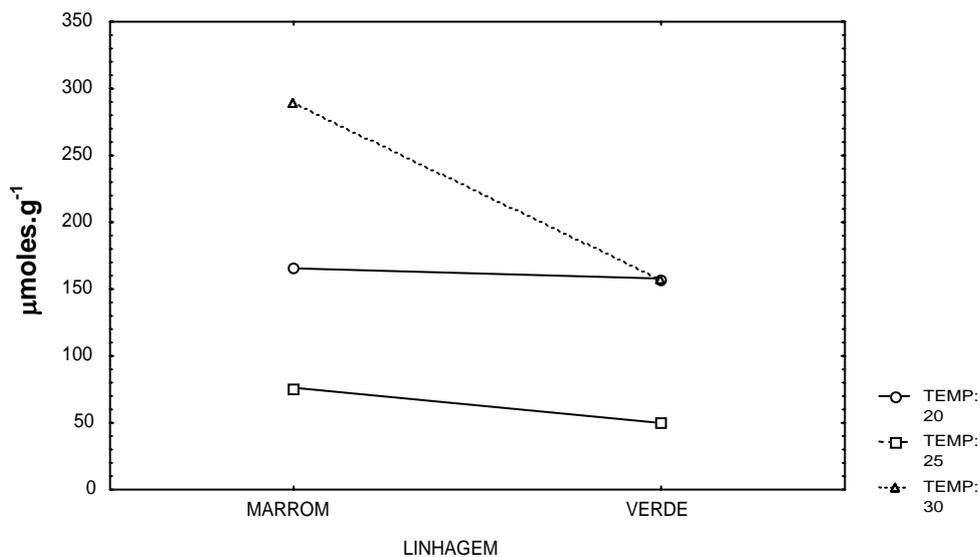


FIGURA 15: INFLUÊNCIA DO FOTOPERÍODO NA BIOSÍNTESE DE FLORIDOSÍDEO NAS LINHAGENS MARROM E VERDE DE *H. musciformis*.

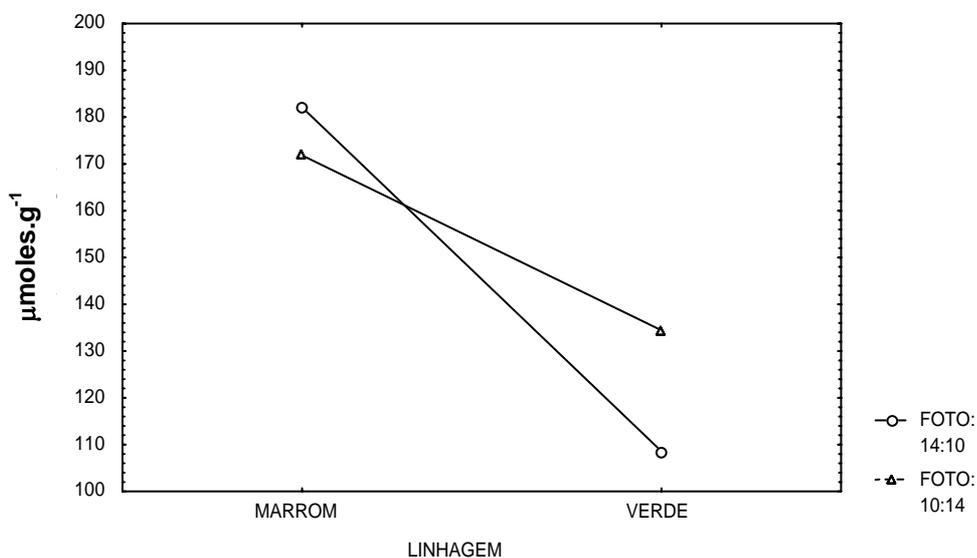
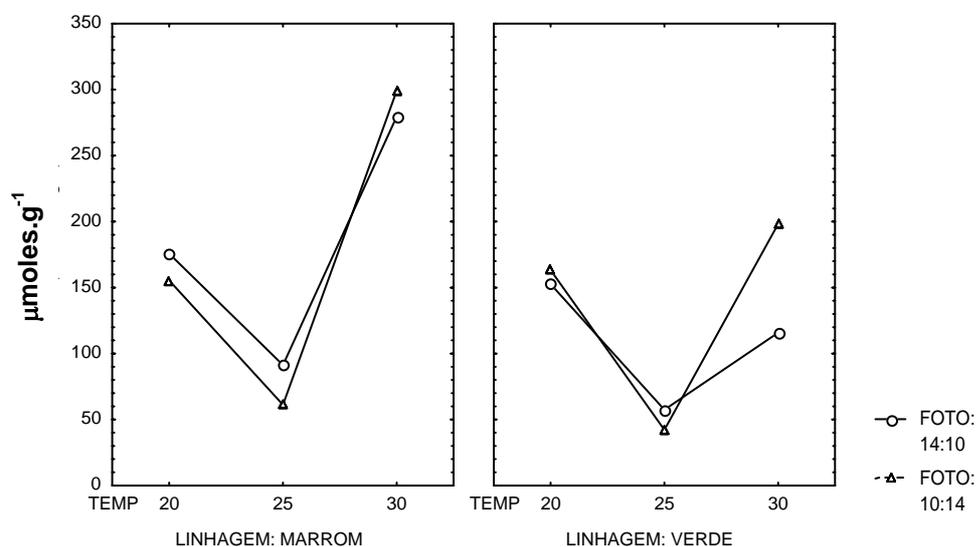


FIGURA 16: INFLUÊNCIA DO FOTOPERÍODO E TEMPERATURA NA BIOSÍNTESE DE FLORIDOSÍDEO NAS LINHAGENS MARROM E VERDE DE *H. musciformis*.



Desta forma, os resultados obtidos para as linhagens Verde e Marrom de *H. musciformis* em relação à biossíntese de floridosídeo quando submetida ao cultivo sob diferentes condições de fotoperíodo e temperatura, apontam que possivelmente as que levam a um maior acúmulo citoplasmático deste carboidrato seriam: Fotoperíodo (10:14 L/E), temperatura de 30°C e utilizando a linhagem Marrom.

KARSTEN (1999), relata variações na concentração de floridosídeo para espécies de *Porphyra* (Rhodophyta) analisadas em diferentes épocas do ano. Este autor atribui estas variações a diferenças na luminosidade média da época da coleta e a possíveis variações na salinidade da água do mar, porém não mencionam a influência da temperatura. Por outro lado, os resultados obtidos neste trabalho demonstram claramente a influência desta variável na biossíntese de floridosídeo para a alga *H. musciformis*, demonstrando, portanto, ser um fator de suma

importância para análises comparativas da biossíntese deste carboidrato em algas marinhas.

4.3.1.2 Heterosídeo Digeneasídeo

A) Linhagem Marrom de *H. musciformis*

Quando comparadas às concentrações de digeneasídeo na linhagem Marrom (TABELA 8) de *H. musciformis* nas diferentes temperaturas testadas para o fotoperíodo 14:10, são observadas diferenças significativas entre as três temperaturas ($p < 0,005$). Porém, esta diferença não se repete quando comparadas as três temperaturas do fotoperíodo 10:14, onde para esta variável a concentração de digeneasídeo é diferente apenas na temperatura de 30°C ($p = 0,0001$), enquanto que para comparações entre as temperaturas 20 e 25°C demonstram valores sem diferenças significativas ($p = 0,4861$).

Já a comparação dos dados obtidos para a concentração de digeneasídeo para a mesma temperatura, porém em diferentes fotoperíodos (14:10 e 10:14) mostram que não existem diferenças estatisticamente significativas na concentração deste heterosídeo para as temperaturas testadas (20°C, $p = 0,9948$; 25 °C, $p = 0,9824$; 30 °C, $p = 0,8762$). Estes resultados sugerem que a variável temperatura influencia na biossíntese de digeneasídeo para a linhagem Marrom de *H. musciformis* independentemente da variável fotoperíodo.

Não se tem na literatura relatos sobre a via enzimática de síntese de digeneasídeo, tampouco evidências de que este carboidrato pode servir como fonte de carbono para síntese de parede celular de algas marinhas. Desta forma, não é possível atribuir comparações relacionadas a este assunto. Porém, é evidente a semelhança no perfil de distribuição de digeneasídeo e floridosídeo para os diferentes tratamentos testados, com diferenças expressivas apenas em relação às

unidades de concentração. Este fato pode sugerir uma participação deste heterosídeo na biossíntese da parede celular através de uma via enzimática alternativa, a qual poderia estar relacionada a uma isomerase, uma vez que a unidade monossacarídica da molécula de digeneasídeo é a manose, enquanto que o principal monossacarídeo da parede celular das algas vermelhas é a galactose.

B) Linhagem Verde de *H. musciformis*

Quando comparadas às concentrações de digeneasídeo na linhagem Verde (TABELA 9) de *H. musciformis* nas diferentes temperaturas de cultivo testadas para o fotoperíodo 10:14 (L/E), são observadas diferenças significativas entre as três temperaturas ($p < 0,005$). Porém, para o fotoperíodo 14:10 a biossíntese de digeneasídeo é estatisticamente igual nas temperaturas extremas (20 e 30°C, $p = 0,1696$).

Já a comparação dos dados obtidos para a concentração de digeneasídeo na mesma temperatura, porém em diferentes fotoperíodos (14:10 e 10:14) mostram que existe diferença significativa apenas para a temperatura de 30°C ($p = 0,0001$). Estes resultados sugerem que a variável independente temperatura, influencia a biossíntese de digeneasídeo para a linhagem Verde da alga *H. musciformis* no fotoperíodo 10:14. Além disso, contempla a hipótese de que uma maior exposição à luz deste espécime, constituindo um “estresse luminoso”, contribui para uma diminuição citoplasmática deste metabólito, mesmo sobre influências da variável temperatura.

Da mesma maneira que para o heterosídeo floridosídeo, discutido para esta mesma linhagem, uma possível explicação para as diferenças citadas acima seria a deficiência de alguns pigmentos acessórios nesta linhagem como a ficoeritrina, já descrito anteriormente. Assim sendo, poderia ocorrer um efeito compensatório na

biossíntese de digeneasídeo para esta linhagem, a qual estaria sendo influenciada pela temperatura na condição de menor exposição à luz (fotoperíodo 10:14 e 30°C), justificando o resultado encontrado.

C) Comparação da biossíntese do heterosídeo digeneasídeo entre as linhagens Marrom e Verde de *H. musciformis*

Os dados obtidos para a concentração de digeneasídeo entre as linhagens Marrom e Verde (TABELAS 8 e 9) desta alga mostram que a biossíntese deste heterosídeo também é estatisticamente diferente para estas linhagens de cor ($p = 0,0001$). Porém, os dados da FIGURA 17 mostram que a biossíntese deste carboidrato é influenciada apenas na temperatura de 30°C para as duas linhagens, onde ocorre um maior acúmulo deste heterosídeo na linhagem Marrom. Por outro lado, os dados estatísticos da FIGURA 18 demonstram um discreto aumento na concentração de digeneasídeo em função de uma maior exposição à luz (fotoperíodo 14:10) para a linhagem Marrom, enquanto que para a linhagem Verde esta condição de luminosidade leva a uma baixa concentração deste composto na alga. Estes dados reforçam a hipótese da influência dos pigmentos acessórios na biossíntese deste heterosídeo quando a alga é submetida a uma maior exposição à luz. Além disso, estes dados estão de acordo com os resultados encontrados para o floridosídeo, sendo mais um indicativo de sua participação na constituição dos polissacarídeos que compõem a parede celular das algas vermelhas.

FIGURA 17: INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA NA BIOSSÍNTESE DE DIGENEASÍDEO NAS LINHAGENS MARROM E VERDE DE *H. musciformis*.

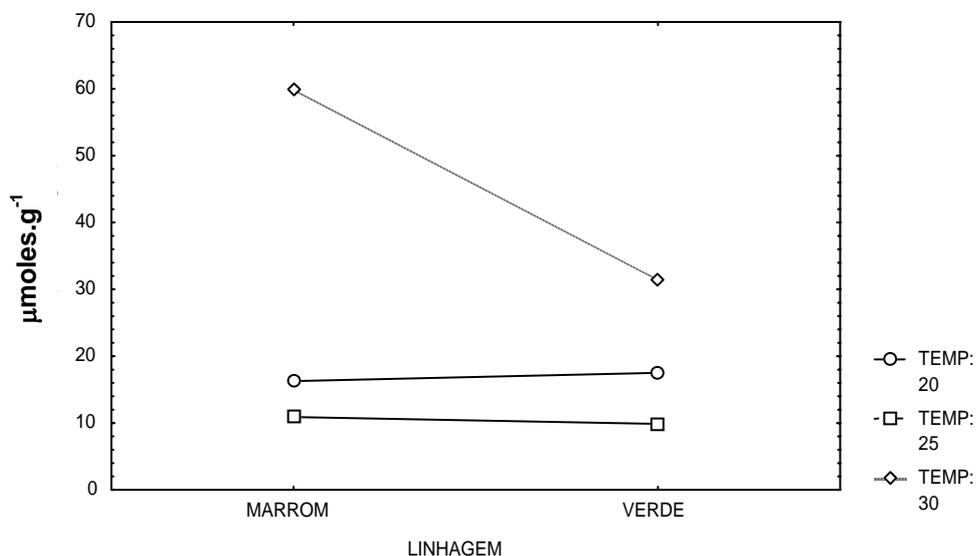
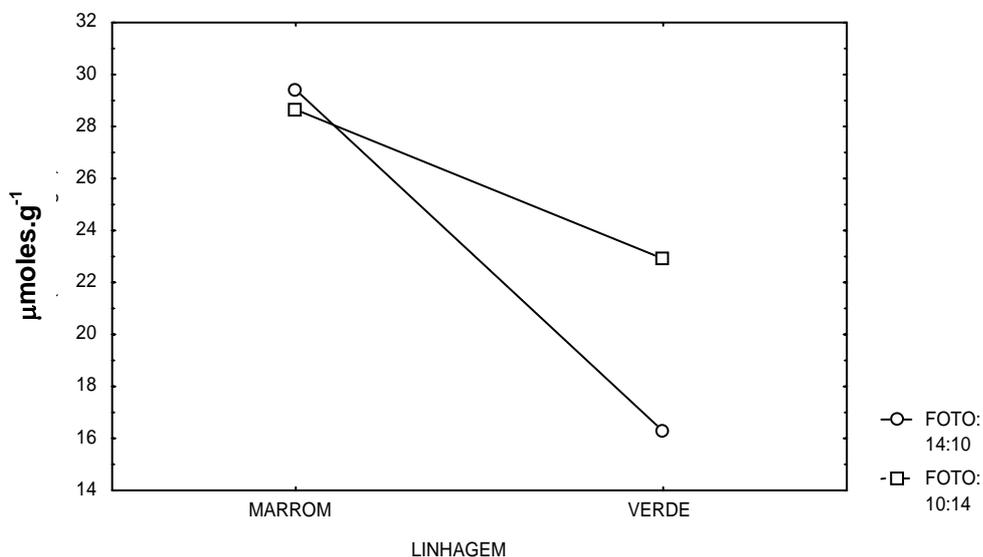


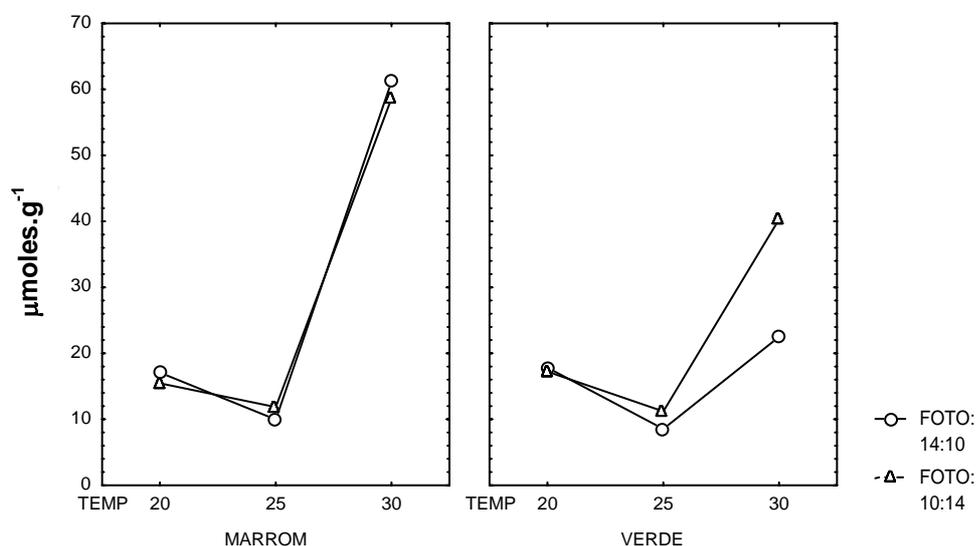
FIGURA 18: INFLUÊNCIA DO FOTOPERÍODO NA BIOSSÍNTESE DE DIGENEASÍDEO NAS LINHAGENS MARROM E VERDE DE *H. musciformis*.



Desta forma, apesar da pequena influência do fotoperíodo sobre a biossíntese de digeneasídeo para a linhagem Marrom, ainda que estatisticamente

não significativa ($p = 0,8762$), os dados indicam que as condições que levam a um maior acúmulo citoplasmático deste carboidrato na alga *H. musciformis* seriam: Fotoperíodo 14:10 (L/E), temperatura de 30°C utilizando a linhagem Marrom. Estes dados são melhores compreendidos através da análise da FIGURA 19.

FIGURA 19: INFLUÊNCIA DO FOTOPERÍODO E TEMPERATURA NA BIOSÍNTESE DE DIGENEASÍDEO NAS LINHAGENS MARROM E VERDE DE *H. musciformis*.



4.3.1.3 Alditol Sorbitol

Analisando-se os dados de concentração obtidos para este carboidrato nas duas variantes de cor Verde e Marrom de *H. musciformis* (TABELAS 8 e 9) nas diferentes condições de cultivos testadas, observa-se que este carboidrato apresenta uma distribuição mais homogênea entre os espécimes testados (7,7 a 9,5 µmoles.g⁻¹). Além disso, a concentração deste carboidrato é de 5 a 30 vezes

menor que a concentração de floridosídeo e até 6 vezes menor que a concentração de digeneasídeo, dependendo do tratamento.

Porém, é de grande importância ressaltar que este é o primeiro relato na literatura da presença de sorbitol na espécie de alga vermelha *H. musciformis*. Segundo KARSTEN (1994), KIRST (1980a) e KIRST (1980b), este composto aparentemente atua na manutenção da pressão osmótica e de turgescência, porém estes autores afirmam que este mecanismo ainda não está bem estabelecido. Outro fator importante atribuído aos alditóis, seria seu rápido aproveitamento como substrato para a fase escura da fotossíntese (KREMER, 1976).

Os polióis dulcitol e sorbitol têm sua presença bem estabelecida em espécies de algas vermelhas pertencentes ao gênero *Bostrychia*, ordem Ceramiales, onde em geral encontram-se em concentrações que podem variar de 2,9 a 165 $\mu\text{moles.g}^{-1}$ entre espécies deste gênero (KARSTEN et al., 1992). Em geral, espécies desta ordem biossintetizam principalmente digeneasídeo. Porém, existem na literatura relatos de algas pertencentes a ordem Ceramiales sintetizando apenas floridosídeo (BARROW, et al., 1995) e sintetizando floridosídeo e digeneasídeo (ASCENCIO, 2002). Desta forma, a presença deste carboidrato em uma alga pertencente a ordem Gigartinales pode indicar possíveis mudanças evolutivas na adaptação do metabolismo dos CBMM entre as diferentes ordens de Rhodophyta.

A) Linhagem Marrom de *H. musciformis*

Quando comparadas às concentrações de sorbitol (TABELA 8) nesta alga nas diferentes temperaturas testadas para o fotoperíodo 14:10 e 10:14 (L/E), não são observadas diferenças significativas entre as três temperaturas. No entanto, comparações entre os fotoperíodos mostram que apenas para a temperatura de 25°C, a concentração de sorbitol é estatisticamente diferente ($p = 0,0276$), sendo

menor para o fotoperíodo 10:14 (L/E). Este fato poderia ser explicado por um maior consumo de sorbitol na etapa escura da fotossíntese, uma vez que para este fotoperíodo a alga recebe 4 h a menos de luz. Estes dados estariam de acordo com os resultados de KREMER (1976), demonstrando que este carboidrato é facilmente metabolizado na etapa escura da fotossíntese, porém esta diferença não é observada para as demais temperaturas, não sendo portanto uma explicação confirmada.

B) Linhagem Verde de *H. musciformis*

Diferentemente da linhagem Marrom de *H. musciformis*, a concentração de sorbitol apresentada pela linhagem Verde é estatisticamente diferente no fotoperíodo 14:10 (L/E) entre as temperaturas de 20 e 30°C ($p = 0,0261$); e 25 e 30°C ($p = 0,0003$). Por outro lado, estas diferenças não ocorrem para o fotoperíodo 10:14 (L/E). Semelhante a linhagem Marrom, é observada diferença entre os fotoperíodos 14:10 e 10:14 (L/E) para a temperatura de 25°C ($p = 0,0086$), porém, novamente estas diferenças não se estendem para as demais temperaturas, o que não gera dados conclusivos para interpretação destes resultados.

C) Comparação da biossíntese de sorbitol entre as linhagens Marrom e Verde de *H. musciformis*

As comparações entre os dados obtidos para a concentração de sorbitol entre as linhagens Verde e Marrom da alga *H. musciformis* mostram que não há diferenças significativas para esta variável. Este fato sugere que para esta espécie, a biossíntese de sorbitol não está relacionada com a concentração citoplasmática das ficobiliproteínas (ficoeritrina, ficocianina e aloficocianina).

4.3.2 Avaliação dos CBMM da alga *H. musciformis* cultivada em diferentes condições de salinidade

As linhagens Marrom e Verde desta alga cultivadas em diferentes salinidades (item 3.1.1.6.2) foram submetidas à extração etanólica quantitativa (item 3.2.2) e analisados por CLAE conforme método descrito por ASCENCIO (2002) e validado no presente trabalho.

Os dados quantitativos da concentração destes CBMM para as linhagens Marrom e Verde de *H. musciformis* cultivadas em diferentes condições de salinidade estão descritos na TABELA 10. Os resultados obtidos foram submetidos a análises estatísticas de variância, tendo como variáveis independentes: 1 - linhagens (Verde e Marrom); 2 - salinidades (25, 35 e 45 ups); e variáveis dependentes: concentração de floridosídeo (CONCF), concentração de digeneasídeo (CONCD) e concentração de sorbitol (CONCS).

Desta forma, tornou-se possível a análise de interação da concentração dos CBMM para a alga *H. musciformis* cultivada sob diferentes condições de salinidade, gerando dados comparativos para prováveis parâmetros ambientais que influenciam a biossíntese dos CBMM.

TABELA 10: CONCENTRAÇÃO DOS CBMM DA LINHAGEM MARROM DA ALGA *H. musciformis* SUBMETIDA A DIFERENTES CONDIÇÕES SALINIDADE.

Salinidade (ups)	Linhagem	Floridosídeo $\mu\text{moles.g}^{-1}$	Digeneasídeo $\mu\text{moles.g}^{-1}$	Sorbitol $\mu\text{moles.g}^{-1}$
25	Marrom	63,29 (10,6)	14,47 (1,10)	10,59 (0,30)
35	Marrom	108,17 (8,58)	13,83 (0,08)	10,32 (1,17)
45	Marrom	366,29 (27,1)	11,94 (0,72)	9,01 (0,52)
25	Verde	38,33 (6,69)	9,43 (0,38)	9,46 (0,72)
35	Verde	26,05 (2,28)	6,93 (0,54)	9,35 (0,70)
45	Verde	313,77 (33,2)	16,53 (2,91)	9,60 (1,16)

ups = unidade de salinidade; os resultados são médias (desvio padrão) de três determinações independentes.

4.3.2.1 Heterosídeo floridosídeo

Os dados obtidos para a concentração de floridosídeo nas diferentes salinidades testadas para as linhagens Marrom e Verde de *H. musciformis* demonstram um aumento na concentração deste carboidrato no citoplasma da alga em função do aumento na salinidade. Porém, para as duas linhagens, os dados obtidos demonstram diferenças estatisticamente significativas apenas para a salinidade de 45 ups ($p < 0,0001$). Segundo YOKOYA et al. (2003), espécimes da linhagem Verde de *H. musciformis* mostram maiores taxas de crescimento em relação a linhagem Marrom entre as salinidades de 5 a 25 ups ($p < 0,001$). Já em salinidades entre 45 e 50, maiores taxas de crescimento são observadas para a linhagem Marrom. Estes autores relatam ainda que as maiores taxas de crescimento para as linhagens Verde e Marrom foram observadas em salinidades entre 20-

40 ups e 25-35 ups, respectivamente, diminuindo significativamente em salinidades acima de 45 ups.

Levando-se em conta que a diferença na concentração de floridosídeo para as duas linhagens de cor de *H. musciformis* é encontrada apenas para a salinidade de 45 ups, coincidindo com a salinidade que esta alga apresenta a menor taxa de crescimento, e que floridosídeo pode servir de fonte de carbono para a síntese da parede celular em Rhodophyta (LI et al., 2002), levanta-se a hipótese de que em altas salinidades o consumo de floridosídeo seria menor, uma vez que este carboidrato não estaria sendo desviado para a síntese de parede celular, o que ocasionaria seu acúmulo no citoplasma da alga. Desta forma, duas situações poderiam ocorrer para contribuir com tal observação: 1) em altas salinidades, o heterosídeo floridosídeo estaria sendo direcionado para manter a pressão osmótica do citoplasma da alga, não podendo assim ser fonte de carbono para a síntese de parede celular, o que acarretaria em uma menor taxa de crescimento das plantas; 2) o aumento na força iônica do meio de cultivo em virtude da salinidade poderia comprometer o sistema enzimático de síntese de polissacarídeos da parede celular da alga, o que ocasionaria um acúmulo de floridosídeo no citoplasma das células, uma vez que este metabólito não estaria sendo consumido e, conseqüentemente, ocasionaria uma menor taxa de crescimento da planta.

4.3.2.2 Heterosídeo digeneasídeo

Diferentemente do heterosídeo floridosídeo, os dados obtidos para a concentração de digeneasídeo na alga *H. musciformis* mostram que para a linhagem Marrom, a concentração deste carboidrato não difere significativamente entre as três condições de salinidade testadas. Porém, para a linhagem Verde,

diferenças significativas na concentração de digeneasídeo são observadas entre as condições de salinidade de 25 e 45 ups ($p = 0,0004$) e, 35 e 45 ups ($p = 0,0001$).

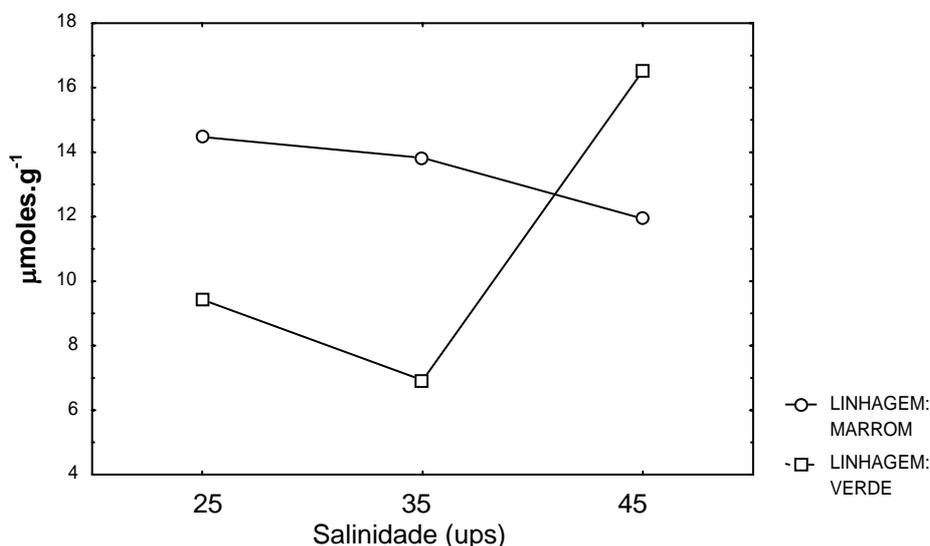
Estes dados demonstram claramente que para a linhagem Marrom, o heterosídeo digeneasídeo não está envolvido em processos da regulação da pressão osmótica, o que está de acordo com os dados publicados por KARSTEN et al. (1995) para a alga *Bostrychia tenuissima* (Ceramiales, Rhodophyta). Além disso, não há alteração da concentração deste carboidrato em função da diminuição da taxa de crescimento da alga para as diferentes condições de salinidades testadas. Desta forma, podemos concluir que para esta linhagem de cor, o metabolismo deste carboidrato não é afetado pela salinidade, diferente dos dados encontrados para outras variáveis (temperatura e fotoperíodo) discutidos anteriormente.

Um fato muito interessante nos resultados apresentados por YOKOYA et al. (2003) é que para os tratamentos de salinidade em ordem crescente de concentração (variação de 5 ups entre os tratamentos), a taxa de crescimento da linhagem Verde de *H. musciformis* é sempre maior que para a linhagem Marrom entre as salinidades de 5 a 25 ups. Já para a salinidade de 30 ups, ambas linhagens apresentam taxas de crescimento similares. Porém, em salinidades entre 35 e 50 ups, esta situação se inverte, coincidindo com um decréscimo progressivo da taxa de crescimento para ambas linhagens.

Interessantemente, em todos os experimentos testados no presente trabalho, os dados obtidos demonstram sempre uma maior concentração dos heterosídeos floridosídeo e digeneasídeo para a linhagem de cor Marrom de *H. musciformis*. Entretanto, a análise estatística (FIGURA 20) dos dados para os ensaios na salinidade de 45 ups mostram uma inversão na concentração de digeneasídeo, onde a linhagem Verde apresenta uma concentração maior deste carboidrato em relação à Marrom ($p = 0,0117$). Estes dados indicam que há diferenças bioquímicas no metabolismo de digeneasídeo entre as variantes de cor e que estas diferenças

podem influenciar no crescimento desta espécie em regiões sujeitas a variações de salinidade. Além disso, estes resultados reforçam a hipótese da influência dos pigmentos acessórios ficoeritrina, ficocianina e aloficocianina na biossíntese de digeneasídeo, discutidos anteriormente.

FIGURA 20: INFLUÊNCIA DA SALINIDADE NA BIOSÍNTESE DO DIGENEASÍDEO NAS LINHAGENS MARROM E VERDE DE *H. musciformis*.



Analisando-se os dados de concentração obtidos para o alditol sorbitol nas duas variantes de cor (Verde e Marrom) de *H. musciformis* nas diferentes condições de salinidades testadas não foram observadas diferenças significativas. Desta forma, os dados obtidos indicam que para esta espécie, o alditol sorbitol não participa da manutenção da pressão osmótica em relação a variações na salinidade do meio. Este fato pode explicar a baixa concentração nesta espécie quando comparada com as concentrações de floridosídeo e digeneasídeo.

Dados da literatura mostram que espécies de algas vermelhas pertencentes ao gênero *Bostrychia*, ordem Ceramiales, biossintetizam apenas alditóis e digeneasídeo, onde estes compostos são os principais responsáveis pela manutenção da pressão osmótica e de turgescência (KARSTEN et al., 1992). Por outro lado, os dados obtidos no presente trabalho mostram que para *H. musciformis* estes carboidratos não atuam como reguladores osmóticos. Assim, a presença destes carboidratos em baixas concentrações em uma alga pertencente à ordem Gigartinales, aliado a grande variação na composição dos CBMM entre as espécies de Rhodophyta, reforça a hipótese de possíveis mudanças evolutivas na adaptação do metabolismo dos CBMM da alga *H. musciformis*, o que pode estar relacionado a sua ampla distribuição geográfica.

4.4 VARIAÇÃO INTRAESPECÍFICA DOS CBMM PRODUZIDOS PELA ALGA *Gracilaria birdiae* Plastino & E. C. Oliveria (GRACILARIALES).

4.4.1 Variação intraespecífica dos CBMM em diferentes estádios reprodutivos de *G. birdiae*.

Os diferentes estádios reprodutivos de algas pertencentes ao gênero *Gracilaria* são encontrados durante o ciclo de vida isomórfico da alga onde ocorre a alternância entre os estádios reprodutivos tetrasporofítico (diplóide) e gametofítico (haplóide). Assim sendo, foram realizadas análises qualitativas e quantitativas para os três estádios reprodutivos encontrados para a linhagem vermelha desta alga, obtidos de população natural. São eles: Tetrasporófito (VMTE), gametófito feminino (VMFE) e Gametófito masculino (VMMA).

4.4.1.1 Análises qualitativas por RMN de ^{13}C e ^1H dos diferentes estádios reprodutivos de *G. birdiae*.

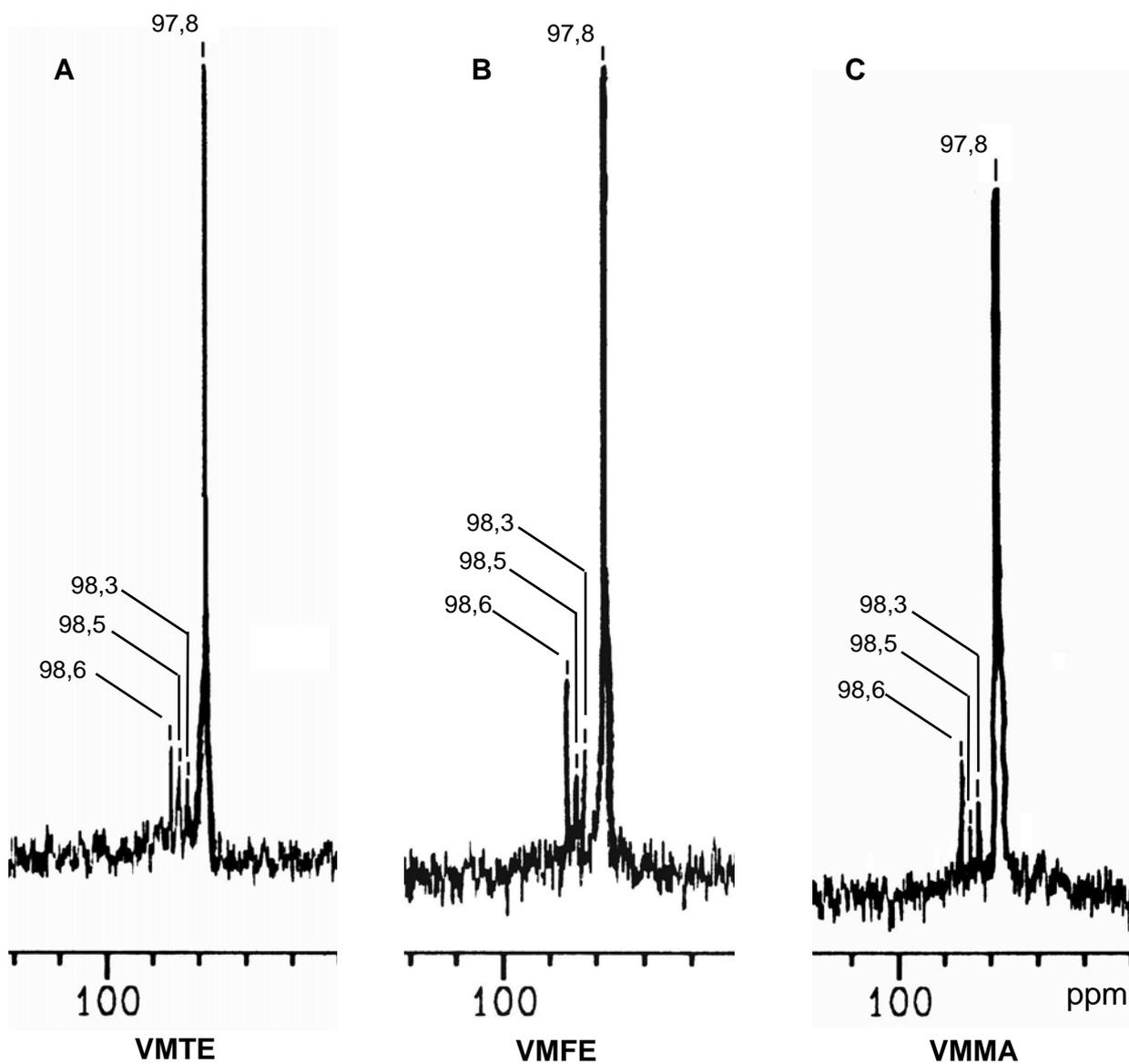
Os espectros de RMN de ^{13}C (FIGURA 23) obtidos a partir de extração etanólica qualitativa (item 3.2.1) mostram-se muito semelhantes para os três estádios reprodutivos testados. Na análise da região anomérica destes espectros (FIGURA 21) foi possível observar 4 sinais distintos. Os sinais em 97,8 e 98,5 ppm podem ser atribuídos aos carbonos anoméricos dos heterosídeos floridosídeo e digeneasídeo, respectivamente. Interessantemente, dois novos sinais foram observados em 98,6 e 98,3 ppm. Estes sinais são sugestivos da presença de D- e L-isofloridosídeos, respectivamente, e estão de acordo com os assinalamentos propostos por KARSTEN et al. (1993), onde os sinais atribuídos por estes autores estão deslocados 1,0 ppm para campo mais baixo.

Da mesma forma, os espectros de RMN de ^1H (FIGURA 22) mostram-se semelhantes para os diferentes estádios reprodutivos de *G. birdiae*, podendo ser observados os sinais em 5,15 e 4,88 ppm referentes aos hidrogênios ligado ao carbono anomérico das moléculas de floridosídeo e digeneasídeo, respectivamente. Estes assinalamentos estão de acordo com os sinais atribuídos a estas moléculas por ASCENCIO (2002).

Os relatos na literatura da presença de D- e L-isofloridosídeos são referentes a algas pertencentes à sub-classe Bangioideae, ordem Bangiales e distribuídos entre os gêneros *Porphyra* e *Bangia* (MENG; ROSELL; SRIVASTAVA, 1987). De acordo com estes autores, sinais referentes a D- e L-isofloridosídeos nos espectros de RMN de ^1H apresentam-se como dupletos com deslocamentos químicos em 4,93 e 4,94 ppm, respectivamente. No entanto, quando ocorre a presença destes compostos em uma mesma amostra, ocorre uma sobreposição de sinais e conseqüente formação de um tripleto. Este fato ocorre devido a proximidade dos

deslocamentos químicos destas moléculas. Desta forma, os sinais em 4,94/4,93 ppm apresentados na forma de tripletes nos espectros de RMN de ^1H para os diferentes estádios reprodutivos da alga *G. birdiae* (FIGURA 23), aliados aos assinalamentos de RMN de ^{13}C confirmam a presença de isofloridosídeos nesta espécie. Estes dados demonstram que a composição dos CBMM entre os três estádios do ciclo de vida desta alga são qualitativamente iguais, e que a alga *G. birdiae* apresenta quatro tipos de heterosídeos: digeneasídeo, floridosídeo, D- e L-isofloridosídeo. Este é o primeiro relato na literatura da presença dos quatro heterosídeos em uma única espécie e o primeiro relato da presença de isofloridosídeos em espécie pertencente à ordem Gracilariales. A presença de ambos heterosídeos floridosídeo e digeneasídeo em espécies de *Gracilaria* foi descrito por WILCOX et al. (2001) (*Gracilaria digeneas*) e ASCENCIO (2000) (*Gracilaria cervicornes* (Turner) J. Agardh).

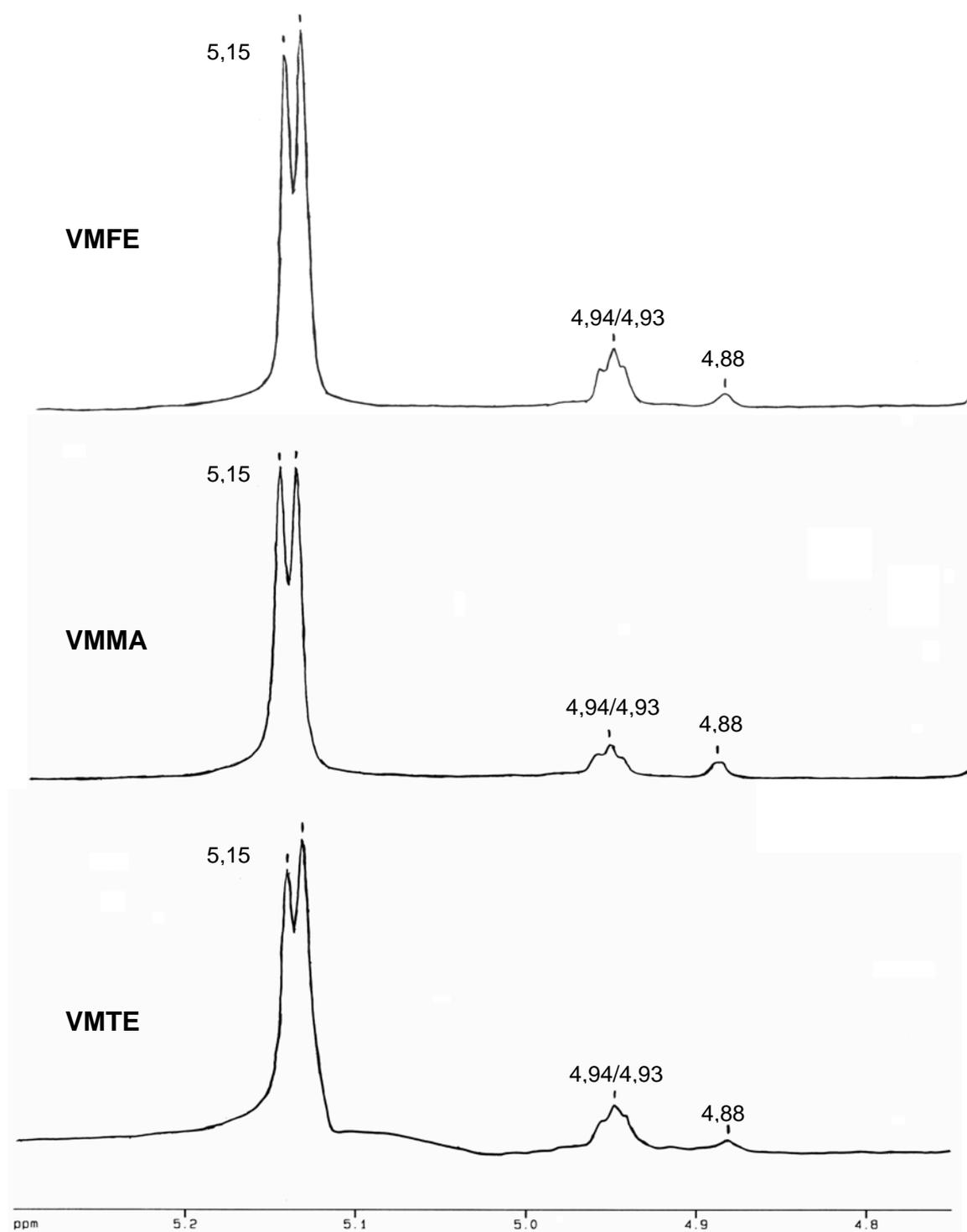
FIGURA 21: REGIÃO ANOMÉRICA DOS ESPECTROS DE RMN-¹³C* OBTIDOS PARA OS DIFERENTES ESTÁDIOS REPRODUTIVOS DA LINHAGEM VERMELHA DE *G. birdiae*.



*Deslocamentos químicos referentes aos carbonos anoméricos de: D-isofloridosídeo (98,6 ppm); digeneasídeo (98,5 ppm); L-isofloridosídeo (98,3 ppm); floridosídeo (97,8 ppm).

A: Tetrasporófito (VMTE); B: Gametófito feminino (VMFE); C: Gametófito masculino (VMMA).

FIGURA 22: ESPECTROS DE RMN-¹H OBTIDOS PARA OS DIFERENTES ESTÁDIOS REPRODUTIVOS DA LINHAGEM VERMELHA DE *G. birdiae*.



*Deslocamentos químicos referentes aos hidrogênios anoméricos de: floridosídeo (5,15 ppm); sobreposição dos sinais referentes a L-isofloridosídeo (4,94 ppm) e D-isofloridosídeo (4,93 ppm); digeneasídeo (4,88 ppm).

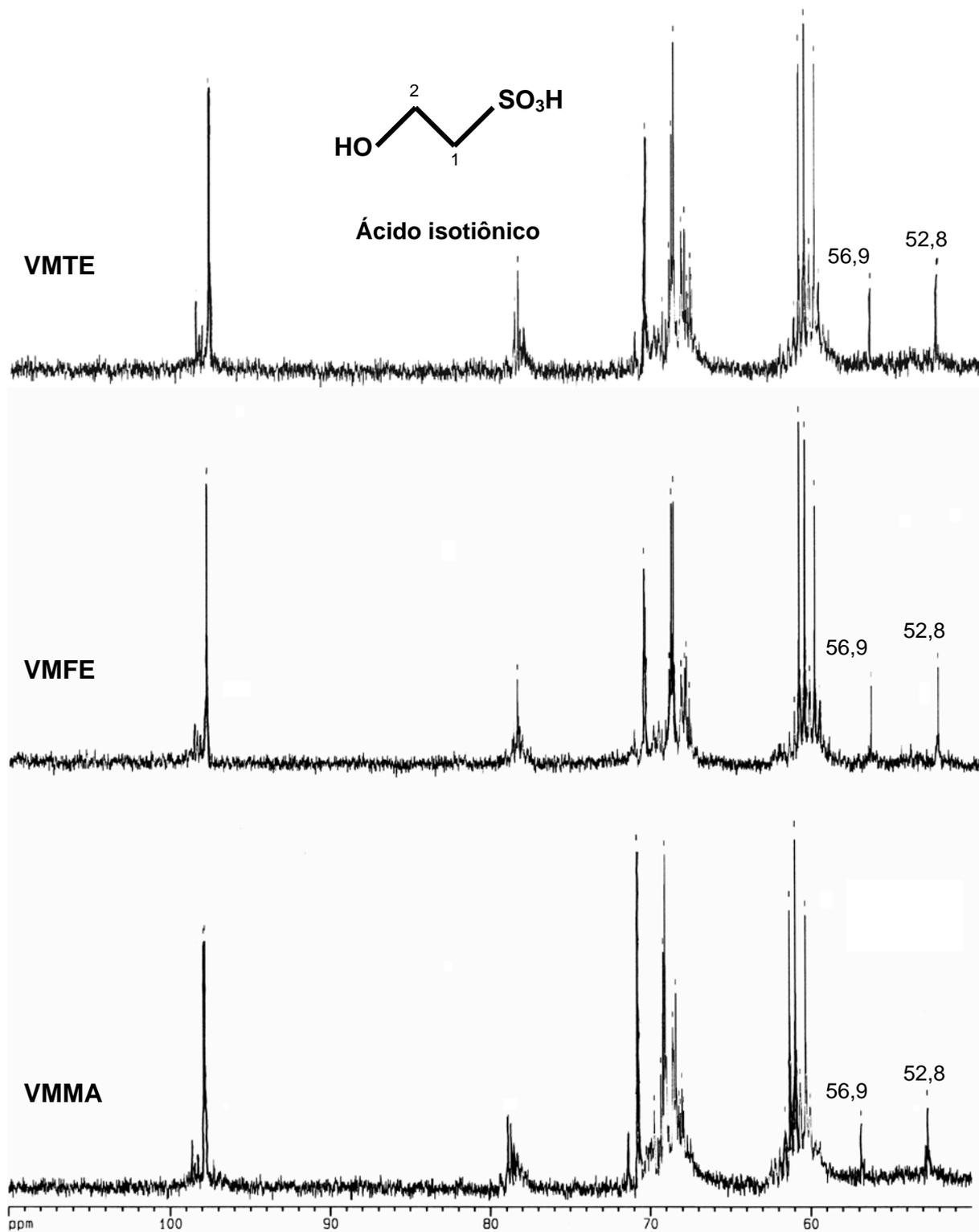
VMFE: Gametófito feminino; VMMA: Gametófito masculino; VMTE: Tetrasporófito.

Além dos assinalamentos dos heterosídeos, dois sinais bem evidentes são observados em campo mais alto (56,9 e 52,8 ppm) para os espectros de RMN ^{13}C dos três estádios reprodutivos de *G. birdiae* (FIGURA 23) Estes sinais são sugestivos da presença de ácido isotiônico nestes espécimes e estão de acordo com os assinalamentos propostos por BARROW; KARSTEN; KING (1993).

O ácido isotiônico é amplamente distribuído em espécies animais (HOSKIN, 1971). Em algas, sua presença tem sido descrita apenas para algumas espécies, sendo sua função fisiológica alvo de muita discussão. As algas estudadas são pertencentes às ordens Ceramiales e Gigartinales (BARROW et al. 1993; HOLST et al. 1994; BROBERG et al.,1998). Recentemente, SIMON-COLIN et al. (2002) descreveram a presença do ácido isotiônico para a alga *Grateloupia doryphora* (Home) Montagne, a qual pertence a ordem Cryptonemiales, família Halymeniaceae, sendo o primeiro relato da presença deste composto em espécie de alga pertencente a esta ordem.

Segundo KARSTEN et al. (1999) o uso de marcadores químicos tem sido muito útil como caráter quimiotaxonômico na sistemática. Desta forma, os dados apresentados neste trabalho podem contribuir para a distribuição sistemática em Rhodophyta.

FIGURA 23: ESPECTROS DE RMN-¹³C OBTIDOS PARA OS DIFERENTES ESTÁDIOS REPRODUTIVOS DA LINHAGEM VERMELHA DE *G. birdiae*.



*Deslocamentos químicos referentes aos carbonos 1 (52,8 ppm) e 2 (56,9 ppm) da molécula do ácido isotiônico.

4.4.1.2 Análises quantitativas por CLAE dos CBMM em diferentes estádios reprodutivos de *G. birdiae*.

Em relação às análises quantitativas dos CBMM nos diferentes estádios reprodutivos da alga *G. birdiae*, a metodologia empregada permitiu a quantificação apenas dos heterosídeos digeneasídeo e floridosídeo. Estes dados estão expressos na TABELA 11. Para as análises estatísticas de variância, foram consideradas variáveis independentes os estádios reprodutivos (tetrasporófito, gametófito feminino e gametófito masculino) e variáveis dependentes quanto a concentração de digeneasídeo e floridosídeo.

TABELA 11: CONCENTRAÇÃO DOS CBMM EM DIFERENTES ESTÁDIOS REPRODUTIVOS DE *G. birdiae*.

ABREVIATURA	ESTÁDIO REPRODUTIVO	DIGENEASÍDEO $\mu\text{moles.g}^{-1}$	FLORIDOSÍDEO $\mu\text{moles.g}^{-1}$
VMTE	Tetrasporófito	11,08 (0,80)	912,80 (42,43)
VMFE	Gametófito feminino	21,06 (1,18)	782,40 (36,91)
VMMA	Gametófito masculino	10,69 (0,76)	742,32 (12,93)

Os resultados são médias (desvio padrão) de três determinações independentes.

Os dados quantitativos demonstram variações tanto na concentração de digeneasídeo quanto floridosídeo entre os estádios reprodutivos estudados. Além disso, a concentração de floridosídeo é até 82 vezes maior que a concentração digeneasídeo (VMTE), mostrando também variações na relação floridosídeo/digeneasídeo.

Os dados obtidos para a concentração de floridosídeo (TABELA 11) nos diferentes estádios reprodutivos de *G. birdiae* demonstram que não há diferenças significativas entre os estádios reprodutivos haplóides feminino (VMFE) e masculino (VMMA) ($P = 0,5859$). Por outro lado, tanto VMFE ($p = 0,0009$) quanto VMMA ($p = 0,0002$) apresentam concentrações citoplasmáticas de floridosídeo estatisticamente diferentes em relação ao estágio reprodutivo diplóide (VMTE), sendo este o estágio reprodutivo que acumula maior concentração deste carboidrato.

Diferentemente, quando avaliada a concentração de digeneasídeo, observa-se diferenças significativas entre os estádios haplóide e diplóide, onde as diferenças ocorrem entre VMFE e VMMA ($p = 0,0001$) e VMFE e VMTE ($p = 0,0002$), sendo o estágio reprodutivo haplóide feminino o que acumula maior concentração deste carboidrato, representando o dobro da concentração encontrada para os demais estádios. Chama a atenção o fato de que a concentração de digeneasídeo seja igual entre estádios reprodutivos haplóides masculino e diplóide ($p = 0,9845$).

Estudos *in vitro* de taxas de crescimento da alga *G. birdiae* em meio Von Stosch demonstram que o estágio reprodutivo haplóide feminino apresenta taxas de crescimento superior aos estádios haplóide masculino e diplóide tetrasporofítico (URSI; PLASTINO, 2001). Apesar dos estudos *in vitro* serem aceitos como bons indicativos dos fenômenos observados na natureza deve-se considerar que, no ambiente natural, outros fatores poderiam influenciar e as diferenças na concentração de digeneasídeo observadas para os estádios reprodutivos de *G. birdiae* poderiam ser acentuadas ou minimizadas. Mesmo assim, os dados obtidos para o heterosídeo digeneasídeo sugerem sua participação no processo de desenvolvimento desta alga.

Estes dados demonstram que há diferenças quantitativas dos heterosídeos floridosídeo e digeneasídeo entre os diferentes estádios reprodutivos da alga *G.*

birdiae, o que sugere que estes carboidratos possam desempenhar funções fisiológicas diferentes, não apenas como as já estabelecidas na literatura como a manutenção da pressão de turgor. Além disso, este é o primeiro relato na literatura que avalia a concentração destes glicosídeos em diferentes estádios reprodutivos de algas pertencentes ao gênero *Gracilaria*, o que aliados a futuros estudos de taxa de crescimento poderia esclarecer a participação destes carboidratos na formação da parede celular em Rhodophyta proposta por LI et al. (2002).

4.4.2 Variação intraespecífica dos CBMM em diferentes linhagens de cor de *G. birdiae* obtidas de cultivo em mar.

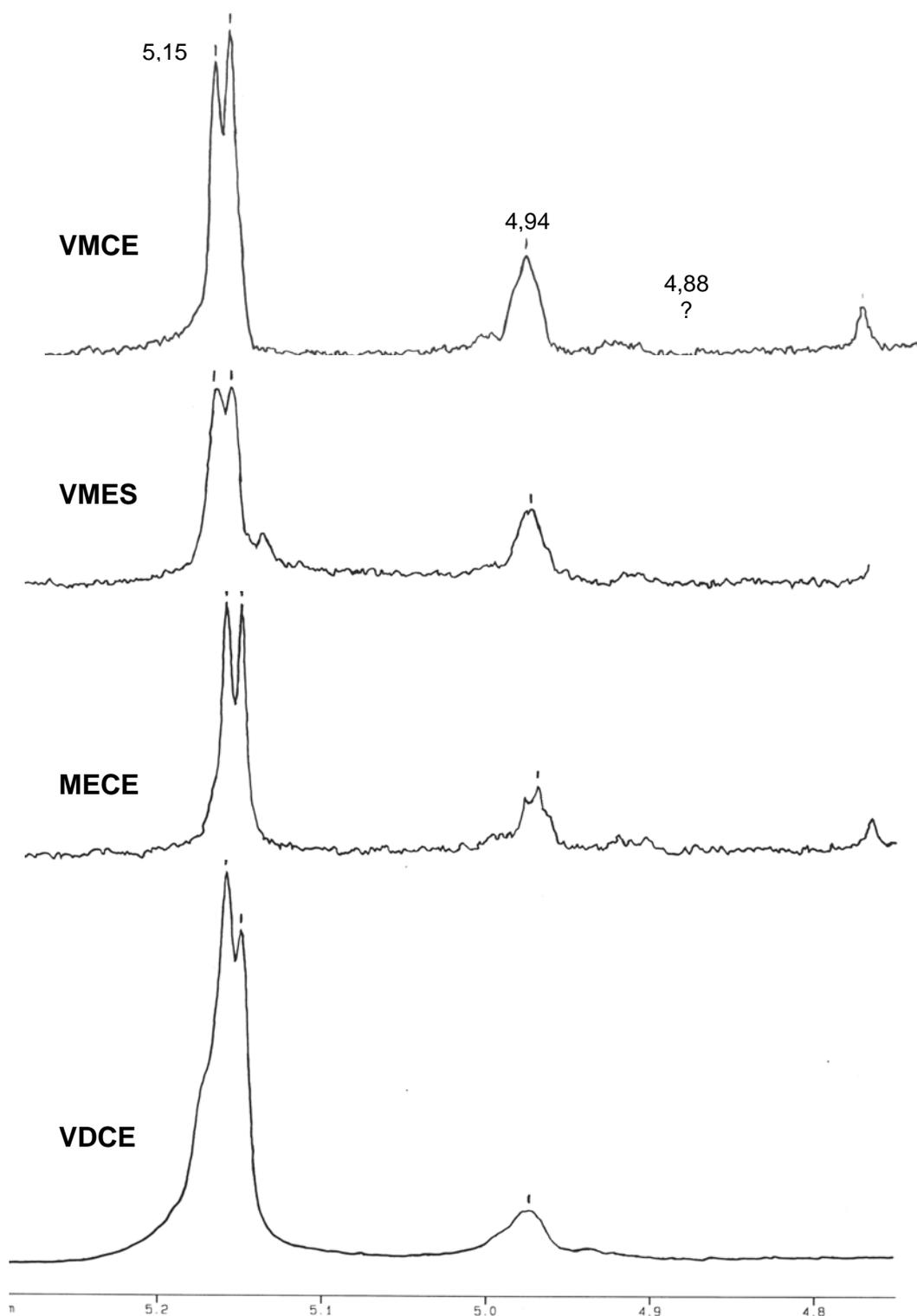
Diferentes linhagens de cor da alga *G. birdiae* no estágio reprodutivo haplóide (gametófito feminino) e originários de dois estados diferentes (Ceará e Espírito santo) foram estudadas. Dados sobre a gênese das variantes de cor estão detalhados em materiais e métodos (item 3.1.2). Desta forma, foram realizadas análises qualitativas e quantitativas para quatro variantes de cor, sendo três originários do estado do Ceará (VMCE – vermelho; VDCE – verde; MECE – marrom esverdeado) e uma linhagem de cor vermelha originária do estado do Espírito Santo (VMES).

4.4.2.1 Análises qualitativas por RMN de ^1H das diferentes linhagens de cor da alga *G. birdiae*.

Os espectros de RMN de ^1H obtidos a partir de extração etanólica qualitativa (item 3.2.1) apresentam algumas semelhanças, podendo ser observado o sinal em 5,15 ppm, referente ao hidrogênio ligado ao carbono anomérico das moléculas de floridosídeo e sinais não bem definidos em 4,94 ppm, sugestivos da presença de D-

e L-isofloridosídeos. Estes assinalamentos estão de acordo com os sinais atribuídos a estas moléculas por ASCENCIO (2002) e MENG; ROSELL; SRIVASTAVA (1987), respectivamente. Em relação à molécula de digeneasídeo, os espectros de RMN de ^1H obtidos não apresentam sinais evidentes na região de 4,88 ppm, não sendo possível detectar tal molécula por esta técnica nas amostras analisadas (FIGURA 24).

FIGURA 24: ESPECTROS DE RMN-¹H* OBTIDOS PARA AS DIFERENTES LINHAGENS DE COR DA ALGA *G. birdiae*.



*Deslocamentos químicos referentes aos hidrogênios anoméricos de: floridosídeo (5,15 ppm); sobreposição dos sinais referentes a L- e D-isofloridosídeo (4,94 ppm).
VMCE: vermelha originária do Ceará; VMES: vermelha originária do Espírito Santo; MECE: marrom esverdeada originária do Ceará; VDCE: verde originária do Ceará.

4.4.2.2 Análises quantitativas por CLAE dos CBMM em diferentes linhagens de cor de *G. birdiae* (gametófito feminino).

Em relação às análises quantitativas dos CBMM nas diferentes linhagens de cor da alga *G. birdiae*, novamente a metodologia empregada permitiu a quantificação apenas dos heterosídeos digeneasídeo e floridosídeo. Estes dados estão expressos na TABELA 12. Para as análises estatísticas de variância, foram consideradas variáveis independentes as linhagens de cor (VMCE - vermelha Ceará; VDCE – verde Ceará; MECE – marrom esverdeada Ceará; VMES – vermelha Espírito Santo) e variáveis dependentes quanto a concentração de digeneasídeo e floridosídeo.

TABELA 12: CONCENTRAÇÃO DOS CBMM EM DIFERENTES LINHAGENS DA ALGA *G. birdiae* (GAMETÓFITO FEMININO).

ABREVIATURA	ESTADO DE ORIGEM	DIGENEASÍDEO $\mu\text{moles.g}^{-1}$	FLORIDOSÍDEO $\mu\text{moles.g}^{-1}$
VMCE	Ceará	6,83 (0,20)	191,02 (8,77)
VDCE	Ceará	Nd	96,00 (7,10)
MECE	Ceará	6,86 (0,26)	184,23 (13,84)
VMES	Espírito Santo	8,11 (0,17)	595,92 (41,69)

Os resultados são médias (desvio padrão) de três determinações independentes; nd: não detectado.

Os dados quantitativos demonstram variações tanto na concentração de digeneasídeo quanto floridosídeo entre as linhagens de cor estudadas. Além disso, não foi detectada a presença do heterosídeo digeneasídeo na linhagem verde (VDCE).

A análise estatística da concentração de floridosídeo (TABELA 12) nas diferentes linhagens de cor da alga *G. birdiae* demonstram variações em função tanto da linhagem como da origem destes espécimes. Para as plantas originárias do estado do Ceará percebe-se uma baixa concentração citoplasmática em relação aos espécimes de origem no estado do Espírito Santo tanto para plantas de cultivo quanto plantas de campo (VMES e VMFE, respectivamente). Chama a atenção de que os espécimes estudados podem apresentar funções fisiológicas (taxa de crescimento, entre outros) diferenciadas em função da sua origem. Este fato pode ser observado em função da concentração de floridosídeo, já que a linhagem VMCE apresenta concentração deste carboidrato significativamente menor que VMES ($p = 0,0001$) e a diferença entre os espécimes estão tão somente no local de origem das plantas utilizadas para o cultivo.

Também são encontradas diferenças significativas na concentração de floridosídeo entre as linhagens de cor VMCE e VDCE ($p = 0,0122$) e VDCE e MECE ($p = 0,0211$), demonstrando a influencia dos pigmentos acessórios no metabolismo deste carboidrato. Além disso, semelhante ao encontrado neste trabalho para a alga *H. musciformis*, linhagens de cor verde apresentam menores concentrações de floridosídeo em relação às demais linhagens. Segundo URSI e PLASTINO (2001) variantes de cor verde de *Gracilaria birdiae* obtidas de cultivo *in vitro* (meio de Von Stosch) apresentam taxas de crescimento inferiores às apresentadas por variantes de cor vermelha. Estes autores atribuem este fato a uma deficiência fotossintética da variante de cor verde, uma vez que esta apresenta concentrações de pigmentos bastante inferiores aos encontrados para a variante de cor vermelha, considerando estes dados ferramentas importantes para estudos relacionados ao aparelho fotossintético desta espécie. Tendo em vista que a biossíntese de floridosídeo está diretamente relacionada ao ciclo de Calvin, a baixa concentração deste carboidrato

neste espécime também poderia ser atribuída à deficiência fotossintética desta variante de cor.

Em relação ao heterosídeo digeneasídeo, não foi possível detectar a presença deste carboidrato para a linhagem de cor verde (VDCE). Este fato pode estar relacionado as baixas concentrações deste carboidrato nesta linhagem em função da influencia dos pigmentos fotossintéticos ou até mesmo ausência de sua síntese. Por outro lado, a concentração de digeneasídeo nas outras linhagens de cor analisadas encontra-se em valores próximos ao encontrados para as plantas de campo, não havendo diferenças significativas entre as linhagens de cor originárias de uma mesma região geográfica (VMCE e MECE) e linhagens originárias de regiões geográficas diferentes (VMCE e VMES). Este fato demonstra que para a alga *G. birdiae*, o metabolismo do digeneasídeo não seria influenciado por esta variável.

Desta forma, os dados produzidos no presente trabalho em relação à variação intraespecífica dos CBMM produzidos por *G. birdiae* enriquecem o conhecimento a cerca do desempenho fisiológico desta alga na natureza, o que pode auxiliar na seleção de linhagens mais produtivas, bem como fornece subsídios para discussões mais detalhadas em relação às possíveis vantagens adaptativas das diferentes linhagens de cor desta espécie. Outrossim, a determinação da concentração dos heterosídeos poderia funcionar como ferramenta na seleção de plantas destinadas ao cultivo em mar, onde dados de concentração destes carboidratos poderiam ser indicativos da performance da taxa de crescimento dos espécimes analisados. Como vantagem, estaria o fato de ser uma técnica rápida, confiável, de baixo custo e que utiliza pouco material, além de não estar sujeita às variáveis dos experimentos de cultivo *in vitro*.

4.5 VARIAÇÃO INTRAESPECÍFICA DOS CBMM PRODUZIDOS POR LINHAGENS DE COR VERDE E VERMELHA DA ALGA *Gracilaria domingensis*.

Duas linhagens de cor (verde – GDVD; vermelha – GDVM) desta alga no estágio reprodutivo haplóide (gametófito feminino) foram submetidas a análises quantitativas dos CBMM. Os espécimes estudados foram obtidos a partir de cultivo em laboratório conforme item 3.1.2.1. Os dados de concentração dos CBMM estão expressos na TABELA 13. Para as análises estatísticas de variância, foram consideradas variáveis independentes as linhagens (verde e vermelha) e variáveis dependentes a concentração de digeneasídeo e floridosídeo.

TABELA 13: CONCENTRAÇÃO DOS CBMM EM DIFERENTES LINHAGENS DE COR DA ALGA *G. domingensis*.

ABREVIATURA	ESTÁDIO REPRODUTIVO	DIGENEASÍDEO $\mu\text{moles.g}^{-1}$	FLORIDOSÍDEO* $\mu\text{moles.g}^{-1}$
GDVD	Gametófito feminino	20,80 (1,56)	354,56 (5,76)
GDVM	Gametófito feminino	25,35 (1,71)	224,74 (3,30)

Os resultados são médias (desvio padrão) de três determinações independentes; GDVD: *G. domingensis* verde; GDVM: *G. domingensis* vermelha.

A análise estatística dos dados obtidos (TABELA 13) demonstram variações significativas tanto na concentração de digeneasídeo ($p = 0,02753$) quanto floridosídeo ($p = 0,00003$) entre as linhagens estudadas. Semelhante aos dados encontrados para a alga *H. musciformis* descritos neste trabalho. A linhagem de cor verde da alga *G. domingensis* é a que apresenta menor concentração de floridosídeo.

Por outro lado, apesar de apresentarem pequenas diferenças, embora estatisticamente significativa ($p = 0,02753$), a linhagem de cor Vermelha apresenta concentrações citoplasmática de digeneasídeo maior que a linhagem Verde (TABELA 13).

Estudos realizados por GUIMARÃES e PLASTINO (1999) demonstram que não há diferenças na ultraestrutura e organização celular das linhagens de cor verde e vermelha de *G. domingensis*. Além disso, GUIMARÃES (2000), analisando a produção e estrutura química das agaranas produzidas pelas linhagens verde e vermelha de *G. domingensis*, não encontrou diferenças referentes ao rendimento e estrutura química entre as diferentes linhagens estudadas. Apesar de serem constituídas por unidades repetitivas, [β -D-galactopiranosose, ligadas glicosidicamente através da posição 3 (unidade A) e α -galactopiranosose, ligadas glicosidicamente através da posição 4 (unidade B)], onde o monossacarídeo principal é a galactose, monossacarídeo da molécula de floridosídeo, a semelhança dos resultados descritos acima, sugerem que este heterosídeo não está envolvido na biossíntese das agaranas produzidas pela alga *G. domingensis*. Esta hipótese se baseia nas diferenças de concentração deste glicosídeo encontradas para as diferentes linhagens estudadas e as semelhanças de rendimento e estrutura das agaranas descritas na literatura. Por outro lado, não há dados sobre a taxa de crescimento das linhagens verde e vermelha estudadas, o que não descarta o envolvimento do floridosídeo na síntese de parede celular, como proposto por LI et al. (2002).

4.6 AVALIAÇÃO DA FORMAÇÃO DE COMPLEXOS ENTRE A MOLÉCULA DE DIGENEASÍDEO E ÍON VANADILO (V^{IV}) EM DIFERENTES VALORES DE pH.

4.6.1 Análises por RMN- ^{13}C dos complexos digeneasídeo-vanádio (DIG-VO).

A primeira etapa de trabalho para o estudo por RMN- ^{13}C da complexação de digeneasídeo (DIG) e o íon vanadilo (VO^{2+}) foi a determinação dos valores de pH das diferentes soluções de digeneasídeo a serem analisadas. O valor de pH encontrado para a água deuterada (D_2O) pura foi 7,0, enquanto que a solução de digeneasídeo neste solvente apresentou valor de pH de 8,68. Já a solução eqüimolar de digeneasídeo e o cátion vanadilo apresentou pH de 2,76. Esta diminuição do pH é devida ao preparo da solução do íon vanadilo que contém ácido nítrico (item 3.8). No sentido de se avaliar possíveis variações dos deslocamentos químicos nas análises por RMN- ^{13}C em função de variações do pH das soluções, foram realizadas análises de digeneasídeo em D_2O em pH 8,68 (DIGK-8,68) e 2,76 (DIGK-2,76), sendo que esta última teve seu pH ajustado por solução de ácido nítrico 0,1 mol/l.

Avaliando-se a variação dos deslocamentos químicos em função do pH nos espectros de RMN- ^{13}C das amostras DIGK-8,68 e DIGK-2,76, observa-se um deslocamento para campo mais alto de 0,4 ppm do sinal referente ao carbono C-1' da molécula de digeneasídeo em função da diminuição do pH. Este fato se deve ao grupo funcional carboxílico deste carbono (C-1'), o qual em pH 2,76 apresenta-se protonado ocasionando, conseqüentemente, tal deslocamento químico. Este efeito ainda se estende para os carbonos C-2' e C-3', onde o sinal de cada carbono é

deslocado 0,5 ppm também para campo mais alto do espectro. Desta forma, as comparações dos deslocamentos químicos de ^{13}C da molécula de digeneasídeo e seus possíveis complexos com o íon vanadilo foram baseadas nos valores encontrados para os deslocamentos químicos da molécula de digeneasídeo em solução de pH 2,76 (DIGK-2,76).

Deslocamentos químicos com variações de 0,1 ppm não foram consideradas, uma vez que podem ser devido a variações experimentais durante as análises por RMN- ^{13}C . A calibração dos espectros foi feita pelo deslocamento químico do carbono anomérico da molécula de digeneasídeo (C-1) em 98,4 ppm. As demais condições analíticas estão descritas no item 3.5.1.1.

De posse destes dados foram então preparadas soluções equimolares de digeneasídeo e vanadilo, as quais tiveram seu pH ajustado por solução deuterada de KOH. Desta forma, foram obtidas 6 amostras (DIG-VO) cujos valores de pH variaram entre 2,76 a 6,86. A avaliação da complexação do digeneasídeo com o íon vanadilo através de RMN- ^{13}C foi baseada nas diferenças de deslocamentos químicos dos átomos de carbono da molécula de digeneasídeo entre as diferentes amostras analisadas. A TABELA 14 mostra os assinalamentos de RMN- ^{13}C da molécula de digeneasídeo e suas possíveis formas complexadas com o íon vanadilo em soluções de diferentes valores de pH.

TABELA 14: ASSINALAMENTOS DOS SINAIS DE RMN-¹³C (ppm) DA MOLÉCULA DE DIGENEASÍDEO E DE SEUS COMPLEXOS COM O ÍON VANADILO EM SOLUÇÕES DE DIFERENTES VALORES DE pH.

Carbono	DIGK pH 8,68	DIGK pH 2,76	DIG-VO pH 2,76	DIG-VO pH 3,47	DIG-VO pH 4,20	DIG-VO pH 4,60	DIG-VO pH 5,41	DIG-VO pH 6,86
C-1	98,4	98,4	98,4	98,4	98,4	98,4	98,4	98,4
C-2	69,9	69,6	69,7	69,9	70,0	70,0	70,0	70,0
C-3	70,2	70,0	70,1	70,2	70,2	70,3	70,3	70,2
C-4	66,7	66,4	66,5	66,7	66,7	66,7	66,7	66,7
C-5	72,7	72,7	72,8	72,9	72,9	72,9	72,8	72,9
C-6	60,8	60,6	60,7	60,8	60,9	60,9	60,9	60,9
C-1'	176,8	176,4	175,8	-----	176,7	176,8	176,8	176,8
C-2'	77,9	76,4	76,8	-----	77,7*	77,9	77,8	77,9
C-3'	62,9	62,4	62,6	-----	62,9*	62,9	62,9	62,9

* sinais de menor intensidade no espectro de ¹³C; Cs: α-D-manopiranosil; C's: ác. glicérico.

A análise de RMN-¹³C da solução equimolar de digeneasídeo-vanadilo (DIG-VO) em pH 2,76 (FIGURA 25) apresenta um deslocamento químico do carbono C-1' de 0,6 ppm para campo mais alto em comparação com a amostra DIGK pH 2,76. Esta variação pode ser atribuída à complexação do íon vanadilo com a porção carboxílica da molécula do digeneasídeo. Além disso, deslocamentos químicos de 0,4 e 0,2 ppm para campo mais baixo são observados para os carbonos C-2' e C-3', respectivamente. Estas variações demonstram claramente a interação entre DIG e VO²⁺ confirmando a capacidade deste heterosídeo de formar complexos com o íon

vanadilo. Fica evidente ainda que a porção da molécula responsável pela interação carboidrato-metal neste valor de pH é a porção glicérica, não havendo evidências de interação entre as hidroxilas da porção α -D-manopiranosil, uma vez que não há diferenças significativas nos deslocamentos químicos dos carbonos desta porção da molécula. Desta forma, os dados de RMN- ^{13}C sugerem que a complexação da molécula de digeneasídeo com o íon vanadilo em pH 2,76 apresenta especificação ligante:metal (L:M) 4:1. Conforme modelo proposto por VERCHÈRE et al. (1998) (FIGURA 5), o qual estabelece formas de complexação, este tipo de interação poderia assumir uma geometria espacial bipiramidal quadrada. Um modelo proposto para a geometria espacial para o complexo DIG-VO em pH 2,76 está exposto na FIGURA 26.

FIGURA 25: ESPECTRO DE RMN- ^{13}C OBTIDO DA SOLUÇÃO EQUIMOLAR DE DIGENEASÍDEO / ÍON VANADILO EM pH 2,76.

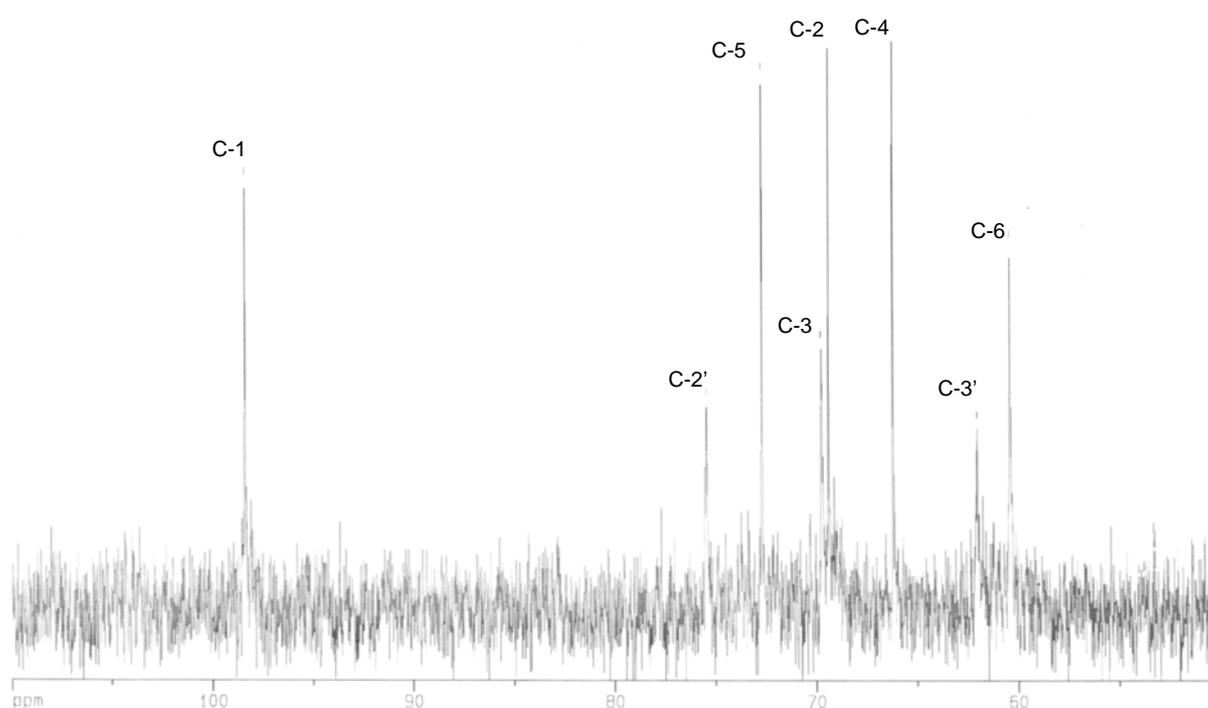
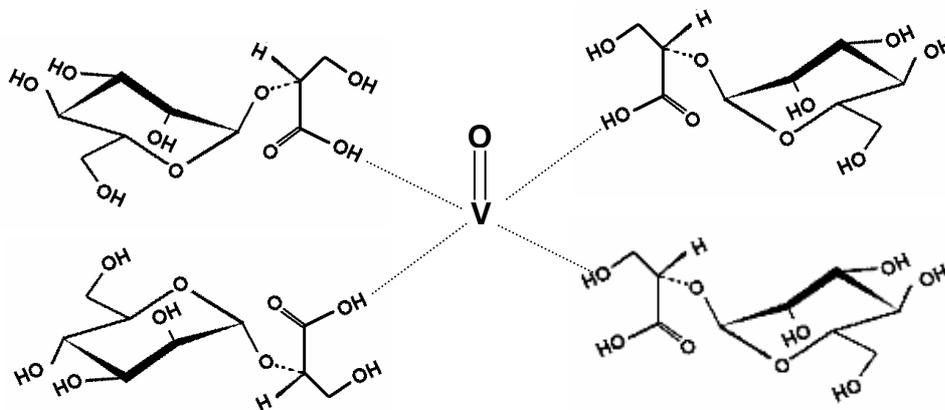


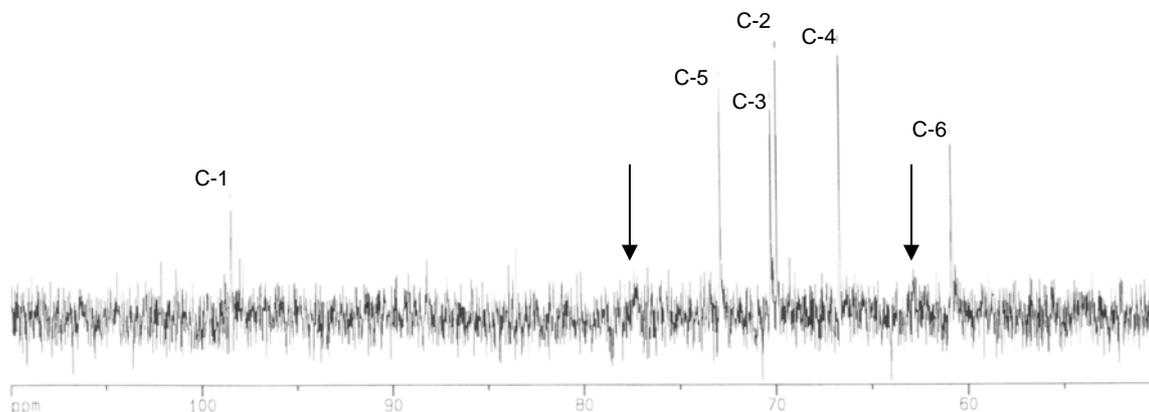
FIGURA 26: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS ESTRUTURAS PROPOSTAS PARA OS POSSÍVEIS COMPLEXOS DE VANÁDIO (V^{IV}) COM DIGENEASÍDEO EM pH 2,76.



Modelo de complexação 4:1 (ligante:metal).

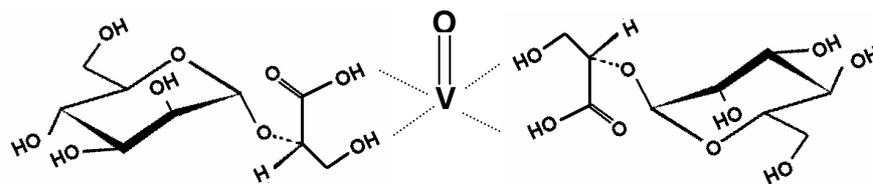
Já o espectro de RMN- ^{13}C (FIGURA 27) da amostra DIG-VO pH 3,47 o que se observa é o desaparecimento por completo dos sinais referentes à porção glicérica da molécula. Esta anulação dos sinais dos carbonos C-1', C-2' e C-3' pode ser atribuída a um efeito paramagnético obtido pela complexação do íon vanadilo com as hidroxilas dos carbonos C-1' e C-3'. Novamente não foram observados deslocamentos químicos significativos para a porção açúcar da molécula de digeneasídeo, indicando que a interação metal-ligante ocorre apenas pela porção glicérica também para soluções de pH 3,47. Desta forma, os dados de RMN- ^{13}C sugerem uma nova especiação L:M para os complexos DIG-VO em pH 3,47, onde neste valor de pH a relação L:M seria de 2:1, podendo assumir também uma geometria espacial bipiramidal quadrada. O modelo de complexação L:M 2:1 proposto para o complexo DIG-VO em pH 3,47 está exposto na FIGURA 28.

FIGURA 27: ESPECTRO DE RMN-¹³C OBTIDO DA SOLUÇÃO EQUIMOLAR DE DIGENEASÍDEO / ÍON VANADILO EM pH 3,47.



As setas indicam o desaparecimento dos sinais referentes a C-2' e C-3', respectivamente.

FIGURA 28: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS ESTRUTURAS PROPOSTAS PARA OS POSSÍVEIS COMPLEXOS DE VANÁDIO (V^{IV}) COM DIGENEASÍDEO EM pH 3,47.



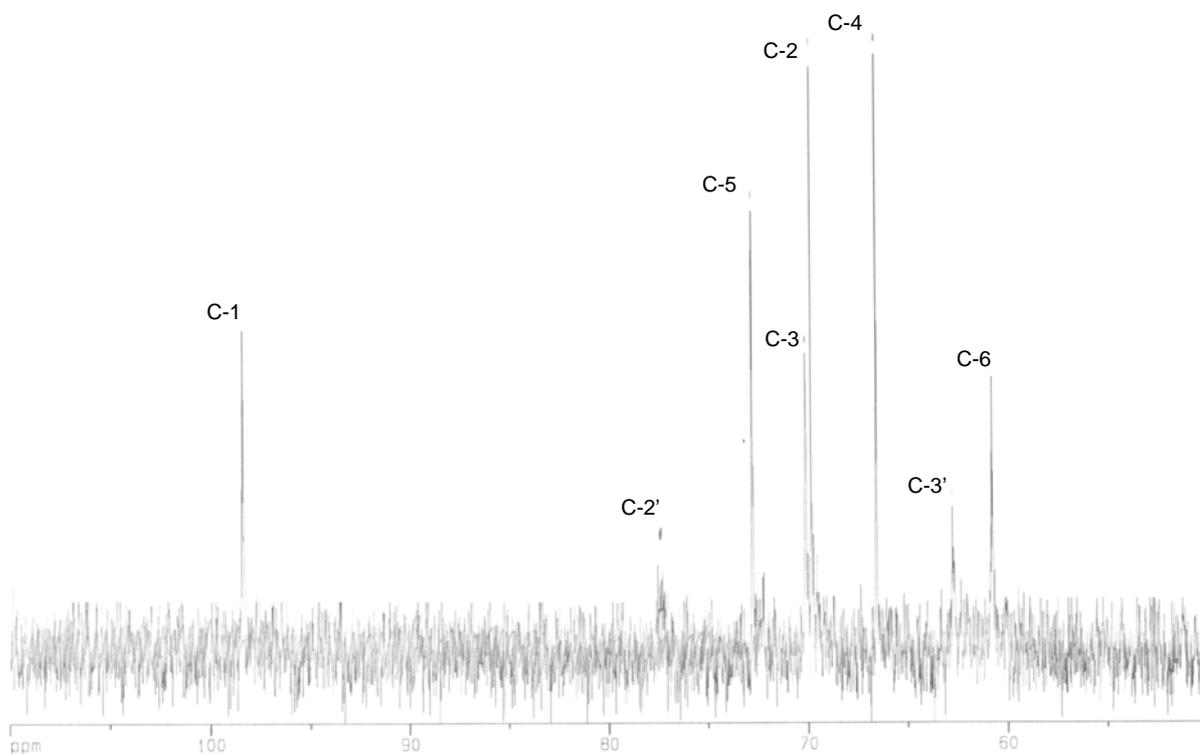
Modelo de complexação 2:1 (ligante:metal).

Interessantemente, os dados obtidos para análises de RMN-¹³C (FIGURA 29) dos complexos DIG-VO em soluções de pH 4,20 (DIG-VO pH 4,20) demonstram deslocamentos químicos evidentes apenas para os carbonos C-2' (1,3 ppm) e C-3'

(0,5 ppm), ocorrendo agora para campos mais baixos do espectro. Além disso, os sinais referentes a estes carbonos apresentam-se com menor intensidade no espectro. Este fato pode estar relacionado ao efeito, agora inverso, da variação do pH e também da complexação do íon vanadilo com a hidroxila do carbono C-3' da molécula do digeneasídeo. Já o grupamento carboxílico não é capaz de se complexar com o íon VO^{2+} , pois nesse valor de pH o grupamento carboxila apresenta-se ionizada. Assim sendo, os dados de RMN- ^{13}C sugerem um outro tipo de especiação L:M para os complexos DIG-VO em pH 4,20, onde neste valor de pH a relação L:M seria de 4:1, podendo assumir também uma geometria espacial bipiramidal quadrada. O modelo de complexação L:M 4:1 proposto para o complexo DIG-VO em pH 4,20 está exposto na FIGURA 30.

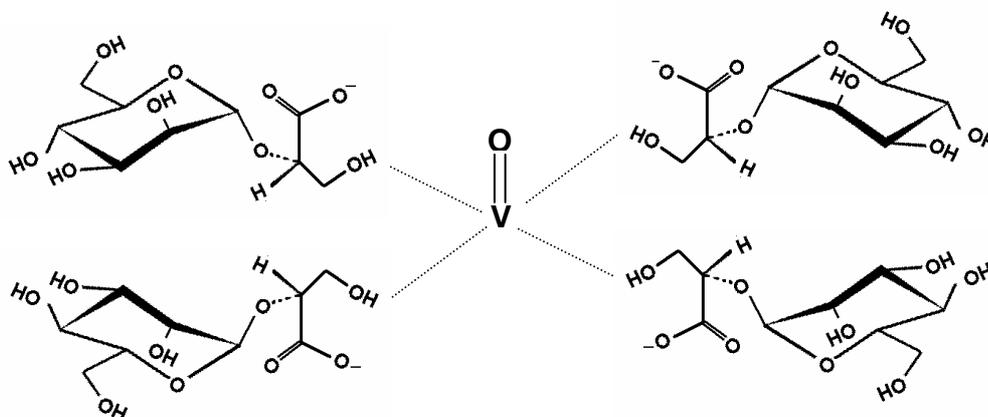
Dados semelhantes são obtidos para análises de RMN- ^{13}C das soluções de pH 4,60 para os complexos DIG-VO, porém neste valor de pH não há diminuição significativa da intensidade dos sinais referentes aos carbonos C-2' e C-3' como ocorre para a amostra analisada em pH 4,20. Além disso, fica evidente que a presença do próton no grupamento carboxílico é essencial para a interação do carbono C-1' com o íon vanadilo.

FIGURA 29: ESPECTRO DE RMN-¹³C OBTIDO DA SOLUÇÃO EQUIMOLAR DE DIGENEASÍDEO / ÍON VANADILO EM pH 4,20.



*sinais com menor intensidade no espectro.

FIGURA 30: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS ESTRUTURAS PROPOSTAS PARA OS POSSÍVEIS COMPLEXOS DE VANÁDIO (V^{IV}) COM DIGENEASÍDEO EM pH 4,20.



Modelo de complexação 4:1 (ligante:metal).

Em amostras analisadas em pH acima de 5,41 (DIG-VO pH 5,41 e DIG-VO pH 6,86), os dados de RMN-¹³C mostram que os deslocamentos químicos dos carbonos da molécula de digeneasídeo são semelhantes aos encontrados para amostras não complexadas (DIGK pH 8,68), o que indica que em valores de pH acima de 5,41 a complexação deste heterosídeo e o íon vanadilo (VO²⁺) não ocorre.

5 CONCLUSÕES

- Validação do Método de quantificação dos CBMM por CLAE

Foi realizada a validação do método de quantificação dos CBMM por CLAE, sendo observado alta sensibilidade e reprodutibilidade, onde o método apresenta precisão e exatidão. Além disso, durante este processo foi detectada a presença de manitol na alga *Bostrychia tenella*, além dos polióis sorbitol e galactitol. Este é o primeiro relato da presença de manitol em espécie pertencente à família Rhodomelaceae.

- Análise dos CBMM em *Hypnea musciformis*

Foram encontrados ambos heterosídeos (floridosídeo e digeneasídeo) em todos os espécimes de *H. musciformis* estudados. Este resultado sugere uma revisão quanto ao uso do heterosídeo digeneasídeo como marcador quimiotaxonômico de espécies pertencentes à ordem Ceramiales. Também foi detectada presença de sorbitol para estes espécimes, sendo este o primeiro relato na literatura da presença deste alditol na espécie *H. musciformis*.

Os dados obtidos a partir dos espécimes de cultivo em laboratório permitiram a elaboração de uma discussão a respeito da influência das variáveis ambientais na biossíntese dos CBMM. Estes dados sugerem que, apesar de apresentarem vias biossintéticas diferentes, floridosídeo e digeneasídeo são similarmente influenciados por variações do ambiente externo (temperatura, fotoperíodo). A principal hipótese deste trabalho esta focalizada na utilização do heterosídeo floridosídeo como precursor da síntese de parede celular, estando portanto relacionado com as taxas de crescimento dessa alga. Além disso, os dados obtidos permitem evidenciar a influência dos pigmentos acessórios como ficoeritrina, ficocianina e aloficocianina na

biossíntese de metabólitos secundários, tendo em vista as diferenças na concentração dos CBMM encontradas entre as linhagens de cor dos espécimes estudados.

Em relação aos experimentos de salinidade, apenas o heterosídeo floridosídeo demonstra apresentar atividade osmorreguladora, estando sua concentração diretamente aumentada em função do aumento da salinidade do meio de cultura.

- Análise dos CBMM em *Gracilaria birdiae*

Foi detectada a presença de floridosídeo, L-isofloridosídeo, D-isofloridosídeo e digeneasídeo para a espécie *G. birdiae* (Gracilariales), sendo o primeiro relato da presença conjunta destes heterosídeos em uma espécie de Rhodophyta, mostrando diferenças quantitativas na concentração dos heterosídeos floridosídeo e digeneasídeo para os diferentes estádios reprodutivos (haplóide e diplóide) e também para as variantes de cor. Também pode ser observada a influência dos pigmentos fotossintetizantes (clorofila *a* e ficobiliproteínas) na biossíntese dos heterosídeos floridosídeo e digeneasídeo para esta espécie em função das diferenças encontradas na concentração destes carboidratos nas linhagens de cor estudada e também em função da origem do espécime.

Foi detectada via RMN-¹³C a presença do ácido isotiônico para todos os espécimes de *G. birdiae* estudados.

- Análise dos CBMM em *Gracilaria domingensis*

Foi detectada a presença de ambos heterosídeos, floridosídeo e digeneasídeo, para as duas linhagens de cor (Verde e Vermelho) de *G. domingensis*. Os dados obtidos demonstram diferenças quantitativas significativas na concentração destes carboidratos entre as diferentes linhagens estudadas. O conhecimento do papel fisiológico dos CBMM em diferentes espécies de algas marinhas é de fundamental importância para o manejo e desenvolvimento de estratégias de cultivo. Com base nos dados apresentados novos experimentos podem ser elaborados para avaliar outros critérios na biossíntese de floridosídeo e digeneasídeo e poderão ser utilizados para reforçar a hipótese de que possíveis mudanças evolutivas na adaptação do metabolismo dos CBMM em Rhodophyta pode estar relacionado à ampla distribuição geográfica de espécies pertencentes a esta Divisão.

Com a elucidação da fisiologia destes carboidratos em algas marinhas, a quantificação dos CBMM pode servir como ferramenta para seleção de espécimes de interesse comercial para o cultivo em diferentes regiões geográficas, sujeitas a variações externas como luminosidade, temperatura e salinidade.

- Análise da complexação de digeneasídeo e o cátion vanadilo (VO^{2+})

O heterosídeo digeneasídeo forma diferentes complexos com o cátion vanadilo em função do pH da solução. Os dados de RMN- ^{13}C demonstram que a porção da molécula responsável pela interação carboidrato-metal é a porção glicérica, não havendo evidências de interação entre as hidroxilas da porção α -D-manopiranosil. Desta forma, os dados de RMN- ^{13}C sugerem que complexação da

molécula de digeneasídeo com o íon vanadilo em pH 2,76 apresenta especiação ligante:metal (L:M) 4:1, em pH 3,47 especiação (L:M) 2:1 e em pH 4,20 especiação (L:M) 4:1.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANGYAL, S. J. Complexing of polyols with cations. **Tetrahedron**, Kindlington, v. 30, p. 1695- , 1974.

ANGYAL, S. J.; GREEVES, D.; MILLS, J. A. Complexes of carbohydrates with metal cations - conformations of alditols in aqueous solution. **Australian Journal of Chemistry**, Kidlington, v. 27, p. 1447-1456, 1974a.

ANGYAL, S. J.; GREEVES, D.; PICKLES, V. A. The stereochemistry of complex formation of polyols with borate and periodate anions, and with metal cations, **Carbohydrate Research**, Kidlington, 35, p. 165-173, 1974b.

ARMISEN, R. Word-wide use and importance of *Gracilaria*. **Journal of Applied Phycology**, Lawrence, v. 7, p. 231-243, 1995.

ASCENCIO, S. D. **Extração, quantificação e caracterização química de carboidratos de baixa massa molecular de algas vermelhas (Rhodophyta)**. Curitiba, 2002. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná. 100 pp, 2002. Orientador: Prof. Dr. Miguel Daniel Nosedá.

ASCENCIO, S. D.; FUJII, M. T.; ORSATO, A.; DUARTE, M. E. R.; NOSEDA, M. D. Carboidratos de baixa massa molecular isolados de espécies da família Rhodomelaceae (Ceramiales, Rhodophyta). In: IX Reunião da Sociedade Brasileira de Ficologia (Aracruz-ES). **Anais...** p. 63, 2002.

ASCENCIO, S. D.; ORSATO, A.; FRANCA, R. A.; DUARTE, M. E. R.; NOSEDA, M. D. Digeneaside, complete ¹H and ¹³C spectral assignment by 1D and 2D NMR, HPLC and ESI-MS analyses. **Carbohydrate Research.**, Oxford, 2006. *no prelo*.

AUGIER, J. The biochemistry of a North American algae *Tuomeya fluviatilis*. **Comptes Rendus Hebdomadaires des Seances del Academie des Sciences**, Paris, v. 239, p. 87-89, 1954.

BARROW, K. D.; KARSTEN, U.; KING, R. J. Isothionic acid from the marine red alga *Ceramium flaccidum*. **Phytochemistry**, Oxford, v. 34, p. 1429-1430, 1993.

BARROW, K. D.; KARSTEN, U.; KING, R. J.; WEST, J. A. Floridoside in the genus *Laurencia* (Rhodomelaceae: Ceramiales) - a chemosystematic study. **Phycologia**, Lawrence, v. 34, n. 4, p. 279-283, 1995.

BIRD, K. T.; DAWES, C. J.; ROMEO, J. T. Light quality effects on carbon metabolism and allocation in *Gracilaria verrucosa*. **Marine Biology** Berlin, v. 64, p. 219-233, 1981.

BOESEKEN, J. The use of the boric acid of the determination of the configuration of carbohydrates. **Advances in Carbohydrate Chemistry**, New York, 4, p. 189-207, 1949.

BOUVENG, H.; LINDBERG, B.; WICKBERG, B. Low-molecular Carbohydrates in Algae. **Acta Chemical Scandinava**, Copenhagen, v. 9, p. 807-809, 1955.

BROBERG, A.; KENNE, L.; PEDERSEN, M. *In situ* identification of major metabolites in the red alga *Gracilaria lemaneiformis* using high resolution magic angle resonance spectroscopy. **Planta**, New York, v. 206, p. 300-307, 1998.

BURGER, K; NAGY, L. In: Biocoordination Chemistry: coordination equilibria in biologically active systems. New York, editora Ellis Horwood, 1990, p. 236- 283.

CALDEIRA, M. M.; RAMOS, M. L.; OLIVEIRA, N. C.; GIL, V. M. S. Complexes of vanadium (V) with α -hydroxycarboxylic acids studied by ^1H , ^{13}C and ^{51}V nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Canadian Journal of Chemistry**, Ottawa, v. 65, p. 2434-2440, 1986.

CANTOS, G.; BARBIERI, L. C.; IACOMINI, M.; GORIN, P. A. J.; TRAVASSOS, R. L. Synthesis of antimony complexes of yeast manan and derivatives and their effect on *Leishmania*-infected macrophages. **Biochemical Journal**, London, v. 289, p. 155-160, 1993.

CARAVAN, P.; GELMINI, L.; GLOVER, N.; HERRING, F. G.; LI, H.; MCNEILL, J. H.; RETTING, S. J.; SETYAWATI, I. A.; SHUTER, E.; SUN, Y.; TRACEY, A. S.; YUEN, V. G.; ORVIG, C. Reaction chemistry of BMOV. Bis (maltolato)oxovanadium(IV)- A potent Insulin Mimetic Agent. **Journal of the American of Chemical Society**, Washington, v. 117, p.12759-12770, 1995.

CLARK, R. J. H. **Vanadium**. BAILAR, C. Jr., et al. In: **Comprehensive Inorganic Chemistry**. New York, Pergamon, 1973. v. 3, p. 491-551.

COHEN, N.; HALBERSTAM, M.; SHLIMOVICH, P.; CHANG, C. J.; SHAMOON, H.; ROSSETTI, L. Oral vanadyl sulfate improves hepatic and peripheral sensitivity in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. **Journal of Clinical Investigation**, Ann Arbor, v. 95, p. 2501-2509, 1995.

COLIN, H.; AUGIER, J. Metabolism of Carbohydrates and Organic Acids in Plants (Exclusive of Bacteria and Fungi) **Comptes Rendus Hebdomadaires des Seances del Academie des Sciences**, Paris, v. 209, p. 1450, 1939.

COLIN, H.; GUÉGUEM, E. La constutution du principe sucré de *Rhododymenia palmata*. **Comptes Rendus Hebdomadaires des Seances del Academie des Sciences**, Paris, v. 191, p. 163, 1930.

COSTA, V. L.; PLASTINO, E. M. Histórico de vida de espécimens selvagens e variantes cromáticas de *Gracilaria* sp. (Gracilariales, Rhodophyta). **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 24, p. 491-500, 2001.

COTTON, F. A.; WILKINSON, G. **Advanced Inorganic Chemistry**. 5th, John Wiley & Sons, New York, p. 665-679, 1988.

CRAIGIE, J. S.; JURGENS, A. Structure of agars from *Gracilaria tikvahiae*. Rhodophyta: Location of 4-D-methyl-L-galactose and sulphate. **Carbohydrate Polymers**, Shannon, v. 11, p. 265-278, 1989.

CRAIGIE, J. S.; WEN, Z. C.; VAN DER MEER, J. P. Interspecific, intraspecific and nutritionally-determined variations in the compositions of agar from *Gracilaria* spp. **Botanica Marina**, Berlin, v. 27, p. 55-61, 1984.

CRAIGIE, J. S.; WEN, Z. C. Effects of temperature and tissue age on gel strength and composition of agar from *Gracilaria tikvahiae* (Rhodophyceae). **Canadian Journal Botânica**, Ottawa, v. 62, p. 1665-1670, 1984.

CRANS, C. D.; SCHELBLE, S. M.; THEISEN, L. A. Substituent effects in organic vanadate esters in imidazole-buffered aqueous solutions. **Journal of Organic Chemistry**, Washington, v. 56, p. 1266-1274, 1991.

CRANS, D. C. Chemistry and insulin-like properties of vanadium (IV) and vanadium (V) compounds. **Journal of Inorganic Biochemistry**, New York, v. 80, p. 123-131, 2000.

CRANS, D. C.; CHEN, H.; ANDERSON, O. P.; MILLER, M. M. Vanadium (V)-protein model studies: solid-state and solution structure. **Journal of the American Chemical Society**, Washington, v. 115, p. 6769-6776, 1993b.

CRANS, D. C.; FELTY, R. A.; ANDERSON, O. P.; MILLER, M. M. Structure and solution properties of a dimeric tetrahedral vanadium (V) chloride alkoxide complex. **Inorganic Chemistry**, Washington, v. 32, p. 247-248, 1993a.

CRANS, D. C.; HOLST, H.; KERAMIDAS, A. D.; REHDER, D. A slow exchanging vanadium (V) peptide complex: vanadium (V)-glycine-tyrosine. **Inorganic Chemistry**, Washington, v. 34, p. 2524-2534, 1995.

CRANS, D. C.; SHIN, P. Characterization of vanadium (V) Complexes in aqueous solutions: ethanolamine- and glycine-derived complexes. **Journal of the American Chemical Society**, Washington, v. 116, p. 1305-1315, 1994.

CROWE, J.; CROWE, L.; CARPENTER, J.; WISTROM, C. Stabilization of dry phospholipid bilayers and proteins by sugars. **Biochemical Journal**, London, v. 242, p. 1-10, 1987.

CUSI, K.; CUKIER, S.; DEFRONZO, R.; TORRES, M. Metabolic effects of treatment with vanadyl sulfate in NIDDM. **Diabetes**, Alexandria, v. 46, n. 1, p. 34A, 1997.

DAWES, C. J., LUISMA, A. O.; TRONO, G. C. Laboratory and field growth studies of commercial strains of *Eucheuma denticulatum* and *Kappaphycus alvarezii* in the Philippines. **Journal of Applied Phycology**, Lawrence, v. 6, p. 21-24, 1994.

DILL, K.; CARTER, R. D. ¹³C- Nuclear Magnetic Resonance-spectral studies of the interactions of metal ions with carbohydrates: use the relaxation probes. **Advances Carbohydrate Chemistry and Biochemistry**, San Diego, v. 47, p. 125- 166, 1989.

DJORDJEVIC, C.; VULETIC, N.; RENSLO, M. L.; PURYEAR, B.; ALIMARD, R. Peroxo heteroligand vanadates (V): synthesis, spectra-structure relationships, and stability toward decomposition. **Molecular and Cellular Biochemistry**, Netherlands, v. 153, n. (1-2), p. 25-29, 1995.

DUARTE, M. E. R.; TISCHER, C. A.; GORIN, P. A. J.; NOSEDA, M. D. Low-molecular-weight carbohydrates from red seaweeds. In: **Encontro de Usuários de Ressonância Magnética Nuclear**, 6., 1997. Angra dos Reis. p. 317-323.

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

DWEK, R. A. Glycobiology: towards understanding the function of sugars. **Chemical Reviews**, Washington, v. 96, p. 683-720, 1996.

EAGLE, H. Amino acid metabolism in mammalian cell cultures. **Science**, Washington, v. 130, p. 432, 1959.

EDWARDS, P. **Illustrated guide to the seaweeds and seagrasses in the vicinity of Port Arkansas, Texas**. Contr. Mar. Sc. Austin. v. 15, 228 p., 1970.

ESPINOZA-AVALOS, J.; HERNÁNDEZ-GARIBA, Y. E.; ZERTUCHE-GANZÁLEZ, J. A.; CASTILHO, M. E. M. Agar from two coexisting species of *Gracilaria* (Gracilariaceae) from the Mexican Caribbean. **Marine Biology**, Berlin, v. 29, p. 211-228, 2003.

ETCHEVERRY, S. B.; CORTIZO, A. M. Bioactivity of vanadium compounds on cells in culture. In: Nriagu, J. O. (ed.). **Vanadium in the environment**. Wiley, New York, p.359-494, 1998.

ETCHEVERRY, S. B.; CRANS, D. C.; KERAMIDAS, A. D.; CORTIZO, A. M. Insulin-mimetic action of vanadium compounds on osteoblast-like cells in culture. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, Orlando, v. 338, p. 7-14, 1997b.

ETCHEVERRY, S. B.; WILLIAMS, P. A. M.; BARON, E. J. Synthesis and characterization of oxovanadium (IV) complexes with saccharides. **Carbohydrate Research**, Kidlington, v. 302, p.131-138, 1997a.

FERNANDEZ, L. E.; VALIENTE, O. G.; MAINARDI, V.; BELLO, J. L.; VELEZ, H.; ROSADO, A. Isolation and characterization of an antitumor active agar-type polysaccharide of *Gracilaria domingensis*. **Carbohydrate Polymers**, Shannon, v. 190, p. 77-83, 1989.

GERALDES, C. F. G.; CASTRO, M. C. A. Interaction of vanadate with monosaccharides and nucleosides: a multinuclear NMR study. **Journal of Inorganic Biochemistry**, New York, v. 35, p. 79-93, 1989.

GOLDFINE, A. B.; SIMONSON, D. C.; FOLLI, F.; PATTI, M. E.; KAHN, C. R. Metabolic effects of sodium metavanadate in humans with insulin-dependent and noninsulin-dependent diabetes mellitus *in vivo* and *in vitro* studies. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, Bethesda, v, 80, p. 3311-3320, 1995.

GOULARD, F.; DIOURIS, M.; DESLANDES, E.; FLOCH, J. Y. Nucleotides, nucleoside sugars and UDP-glucose-4-epimerase activity in the *iotacarrageenophytes Solieria chordalis* and *Calliblepharis jubata* (Rhodophyceae). **European Journal Phycology**, London, v. 34, p. 21-25, 1999.

GUIMARÃES M. **Aspectos fisiológicos de *Gracilaria domingensis* (Gracilariales, Rhodophyta): subsídios para a manutenção do polimorfismo pigmentar**. São Paulo, 2000. Tese de Doutorado. Departamento de Botânica Universidade de São Paulo. Profa. Dra. Estela Maria Plastino.

GUIMARÃES, M.; PLASTINO, E. M. Plastid organization of color variants of the red macroalga *Gracilaria domingensis* (Gracilariales). **Acta Microscopica**, v. 8 (suplemento), p. 795-796, 1999.

HALBERSTAM, M.; COHEN, H.; SHLIMOVICH, P.; ROSSETTI, L.; SHAMOON, H. Oral vanadyl sulfate improves insulin sensitivity in NIDDM but not in obese nondiabetic subjects. **Diabetes**, Alexandria, v. 45, p. 659-666, 1996.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Free radicals reactive species and toxicology. In: Halliwell, B.; Gutteridge, J. M. C. (eds.), **Free Radicals in Biology and medicine**, Oxford University Press, New York, p. 544-616, 1999.

HAMBLEY, T. W.; JUDD, R. J.; LAY, P. A. Synthesis and crystal structure of a vanadium (V) complex with a 2-hydroxy acid ligand, $(\text{NH}_4)_2[\text{V}(\text{OC}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2\text{COO})(\text{O})_2]_2$: a structural model of both vanadium(V) transferrin and ribonuclease complexes with inhibitors. **Inorganic Chemistry**, Washington, v. 31, p. 343-345, 1992.

HOSKIN, F. C. G. Diisopropylphosphorofluoridate and Tabun: enzymatic hydrolysis and nerve function. **Science**, Oxon, v. 172, p. 1243-1245, 1971.

HOST, P. B.; NIELSEN, S. E.; ANTHONI, U. Isethionate in certain red algae. **Journal of Applied Phycology**, Lawrence, v. 6, p. 443-446, 1994.

HOYLE, M. D. Reproductive phenology and growth rates in two species of *Gracilaria* from Hawaii. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, Amsterdam, v. 33, p. 273-283, 1978.

KARSTEN, U. Seasonal variation in heteroside concentrations of field-collected *Porphyra* species (Rhodophyta) from different biogeographic regions. **New Phytology**, Cambridge, v. 143, p. 561-571, 1999.

KARSTEN, U.; BARROW, K. D.; KING, R. J. Floridoside, L-isofloridoside and D-isofloridoside in the red alga *Porphyra columbina* – Seasonal and osmotic effects. **Plant Physiology**, Rockville, v. 103, p. 485-491, 1993.

KARSTEN, U.; BARROW, K. D.; MOSTAERT, A. S.; KING, R. J.; WEST, J. A. ¹³C- and ¹H-NMR studies on digeneaside in the red alga *Calaglossa leprieurii*. A re-evaluation of its osmotic significance. **Plant Physiology Biochemical**, Paris, v. 32, n. 5, p. 669-676, 1994.

KARSTEN, U.; BOCK, C.; WEST, J. A. Low Molecular Weight Carbohydrate Patterns in Geographically Different Isolates of the Eulittoral Red Alga *Bostrychia tenuissima* from Australia. **Botanica Acta**, New York, v. 108, p. 321-326, 1995.

KARSTEN, U.; THOMAS, D. N.; WEYKAM, G.; DANIEL, C.; KIRST, G. O. A simple and rapid method for extraction and separation of low molecular weight carbohydrates from macroalgae using high-performance liquid chromatography. **Plant Physiology Biochemical**, Paris, v. 29, p. 373-378, 1991.

KARSTEN, U.; WEST, J. A.; ZUCCARELLO, G. C.; NIXDORF, O.; BARROW, K. D.; KING, R. J. Low molecular weight carbohydrate patterns in the Bangiophyceae (RHODOPHYTA). **Journal of Phycology**, Lawrence, v. 35, p. 967-976, 1999.

KARSTEN, U.; WEST, J. A.; ZUCCARELLO, G. Polyol content of *Bostrychia* and *Stictosiphonia* (Rhodomelaceae, Rhodophyta) from field and culture. **Botanica Marina**, New York, v. 35, p. 11-19, 1992.

KIRST, G. O. Low molecular weight carbohydrates and Ions in Rhodophyceae: quantitative measurement of floridoside and digeneaside. **Phytochemistry**, Oxford, v. 19, p. 1107-1110, 1980a.

KIRST, G. O. Salinity tolerance of eukaryotic marine algae. **Annual Review Plant Physiology**, Palo Alto, v. 41, p. 21-53, 1980b.

KREMER, B. P. Distribution of Alditols in the Genus *Bostrychia*. **Biochemical System Ecology**, Kidlington, v. 4, p. 139-141, 1976.

KREMER, B. P.; VOLG, R. Zur chemotaxonomischen bedeutung des [¹⁴C]-markierungsmusters bei rhodophyceen. **Phytochemistry**, Oxford, v. 14, p. 1309-1314, 1975.

LAHAYE, M.; ROCHAS, C. Chemical structure and physico-chemical properties of agar. **Hydrobiologia.**, v. 221, p. 137-148, 1991.

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

LI, S-Y.; LELLOUCHE, J-P.; SHABTAI, Y., ARAD (MALIS), S. Fixed carbon partitioning in the red microalga *Porphyridium* sp. (Rhodophyta). **Journal of Phycology**, Lawrence, v. 37, p. 289-297, 2001.

LI, S-Y.; SHABTAI, Y., ARAD, S. Floridoside as a carbon precursor for the synthesis of cell-wall polysaccharide in the red microalga *Porphyridium* sp. (Rhodophyta). **Journal of Phycology**, Lawrence, v. 38, p. 931-938, 2002.

LIGNELL, A.; PEDERSÉN, M. Agar composition as a fuction of morphology and growth rate. Studies on some morphological strains of *Gracilaria secundata* and *Gracilaria verrucosa* (Rhodophyta). **Botanica Marina**, New York, v. 32, p. 219-227, 1989.

MACARA, I. G. Vanadium - an element in search of role. **Trends in Biological Sciences**, Oxon, v. 5, p. 92-94, 1980.

MACCHIAVELLO, J. Culture of *Gracilaria* sp.: productivity and agar production. In: **Oliveira EC**, Kantsdyn, cultivation of seaweeds in Latin American, p.59-63, 1990.

MARINHO-SORIANO, E.; BOURRET E.; DE CASABIANCA, M.L.; MAURY, L. Agar from the reproductive and vegetative stages of *Gracilaria bursa-pastoris*. **Bioresource Technology**, v. 67, p. 1-5, 1999.

MARTELL, A. E.; MOTEKAITIS, R. J. **The Determination and Use of Stability Constants**; 2nd ed., New York, VCH, 1992.

MASUDA, M.;YAMAGISHI, Y.; CHIANG, M.; LEWMANOMONT, K.; XI, B. Overview of *Hypnea* (Rhodohpyta, Hypneaceae). In: **I. A. Abbott (ed.), Taxonomy of Economic Seaweeds**. California Sea Grant College System, La Jolla. V. 6, p.127-133, 1997.

MATSUHIRO, B.; RIVAS, P.; LAMBA, D. Polysaccharides from nuclear phases of *Gracilaria chilensis*. **Boletin de la Sociedad Chilena de Química**, Concepción, v. 39, p. 179-182, 1994.

MATTE, C.; MARQUIS, J-F.; BLANCHETTE, J.; GROS, P.; FAURE, R.; POSNER, B. I.; OLIVIER, M. Peroxovanadium-mediated protection against murine leishmaniasis: role of the modulation of nitric oxide. **European Journal of Immunology**, Weinheim, v. 30, p. 2555-22264, 2000.

MENG, J.; ROSELL, K. G.; SRIVASTAVA, L. M. Chemical characterization of floridoside from *Porphyra perforata*. **Carbohydrate Research**., Amsterdam, v. 161, p. 171-180, 1987.

MENG, J.; SRIVASTAVA, L. Partial purification and characterization of floridoside phosphate syntase from *Porphyra perforata*. **Phytochemistry**.,Oxford, v. 30, n. 6, p. 1763-1766, 1991.

MENG, J.; SRIVASTAVA, L. Variations in floridoside content and floridoside phosphate syntase in *Porphyra perforata* (Rhodophyta). **Journal of Phycology**, Lawrence, v. 29, p. 82-84, 1993.

MERCÊ, A. L. R.; LOMBARDI, S. C.; MANGRICH, A. S.; SZPOGANICZ, B.; REICHER, F.; SIERAKOWSKI, M. R. Equilibrium studies of galactomannan of *Cassia fastuosa* and *Leucaena leucocephala* and Cu⁺² using Potentiometry and EPR Spectroscopy. **Carbohydrate Polymers**, Shannon, v. 35, p. 13-20, 1998.

MERCÊ, A. L. R.; SPIR, I. H. Z.; SALMÓN, M. J. O.; GIANNONI, R. A.; MANGRICH, A. S. Model compounds of humic acid and oxovanadium cations. Potentiometric titration and EPR spectroscopy studies. **Journal Brazilian Chemistry Society**, São Paulo, v. 10, n. 6, p. 463-468, 1999.

MICERA, G.; DESSI, A.; KOZLOWSKI, H.; RADOMSKA, B.; URBANSKA, J. DECOCK, P. DUBOIS, B.; OLIVIER I. Oxovanadium (IV) and copper (II) coordination by D-galacturonic and D-glucuronic acids. **Carbohydrate Research**, Kidlington, v. 188, p. 25-34, 1989.

MICERA, G.; DESSI, A.; SANNA, D. Binding of oxovanadium (IV) to guanosine 5'-monophosphate. **Inorganic Chemistry**, Washington, v. 35, p. 6349-6352, 1996.

MICERA, G.; SANNA, D.; KISS, E.; GARRIBBA, E.; KISS, T. Oxovanadium (IV) complexes of phosphates of biological relevance: NAD⁺, NADP⁺ and thiamine mono- and diphosphate. **Journal of Inorganic Biochemistry**, New York, v. 75, p. 303-309, 1999.

MILLS, J. A. Association of polyhydroxy compounds with cations in solution. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Orlando, v. 6, n. 6, p. 418-421, 1961.

MINGHOU, J.; LAHAYE, M.; YAPHE, W. Structure of agar from *Gracilaria* spp (Rhodophyta) collected in the People's Republic of China. **Botanica Marina**, New York, v. 28, p. 521-528, 1985.

MIURA, A. C. Variegation found in *Porphyra*. **Journal of Phycology**, Lawrence, v. 13, (suppl) 45, 1977.

MORINVILLE, A.; MAYSINGER, D.; SHAVER, A. From Vanadis to Atrops: Vanadium compounds as pharmacological tools in cell death signalling. **Trends in Pharmacological Sciences**, Kidlington, v. 19, p. 452-460, 1998.

MUKHOPADHYAY, A.; KOLEHMAINEN, E.; RAO, C. P. Lanthanide-saccharide chemistry: synthesis and characterization of Ce(III)-saccharide complexes. **Carbohydrate Research**, Kidlington, 324, p. 30-37, 2000.

MURANO, E. Chemical structure and quality of agars from *Gracilaria*. **Journal Applied Phycology**, Lawrence, v. 7, p. 245-254, 1995.

NECHAY, B. R.; NANNINGA, L. B.; NECHAY, P. S. E. Role of vanadium in biology. **Federation Proceedings**, Bethesda, v. 45, p. 123-132, 1986.

PAINTER, T.J. Algal Polysaccharides. In ASPINALL G. **The polysaccharides**. v.2, p.195-285, 1983.

PAULA, E. J.; PEREIRA, R. T. L.; OHNO, M. Strain selection in *Kappaphycus alvarezii* var. *alvarezii* (Solieriaceae, Rhodophyta) using tetraspore progeny. **Journal Applied Phycology**, Lawrence, v. 11, p. 111-121, 1999.

PLASTINO, E. M.; GUIMARÃES, M.; MATIOLI, S. R.; OLIVEIRA, E. C. Codominant inheritance of polymorphic color variants of *Gracilaria domingensis* (Gracilariales, Rhodophyta). **Genetics and Molecular Biology**, v. 22, p. 105-108, 1999.

PLASTINO, E. M.; OLIVEIRA, E. C. *Gracilaria birdiae* (Gracilariales, Rhodophyta), a new species from the tropical South American Atlantic with a terene frond and deep spermatangial conceptacles. **Phycology**, Lawrence, v. 41, p. 389-396, 2002.

PLASTINO, E. M.; OLIVEIRA, E.C. Crossing experiments as an aid to the taxonomic recognition of the agarophyte alga *Gracilaria* (Rhodophyta, Gigartinales). In: **OLIVEIRA EC, KANTSDY N, Cultivation of Seaweeds in Latin American**. p.127-133, 1990.

PLASTINO, E.M.; URSI, S.; FUJII, M. T. Color inheritance, pigment characterization, and growth of a rare light green strain of *Gracilaria birdiae* (Gracilariales, Rhodophyta). **Phycological Research**, v. 52, p. 45, 2004.

QURESHI, M. A.; HILL, C. H.; HEGGEN, C. L. Vanadium stimulates immunological responses of chicks. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 68, p. 61-71, 1999.

RAMUS, J.; VAN DER MEER, J. P. A physiological test of the theory of complementary chromatic adaptation. I. Color mutants of a red seaweed. **Journal of Phycology**, Lawrence , v. 19, p. 86-91, 1983.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 248-259, 1996.

RAY Jr., W. J.; CRANS, D. C.; ZHENG, J.; BURGUER, J. W. ; DENG, H.; MAHROOF-TAHIR, M. Structure of the dimeric ethylene glycol-vanadate complex and other 1,2-diol-vanadate complexes in aqueous solution: vanadate-based transition-state analog complexes of phosphotransferases. **Journal American of the Chemical Society**, Washington, v. 117, p. 6015-6020, 1995.

REDHER, D.; HOLST, H.; QUAAS, R.; HINRICHS, W.; HAHN, U.; SAENGER, W. Binding of vanadate (V) to ribonuclease-T1 and inosine, investigated by ⁵¹V NMR spectroscopy. **Journal of Inorganic Biochemistry**, New York, v. 37, p.141-150, 1989.

REILLY, T. P.; BELLEVEUE, F. H III.; WORSTER, P. M.; SVESSON, C. K. Comparison of the *in vitro* cytotoxicity of hydroxylamine metabolites of sulfamethoxazole and dapsone. **Biochemical Pharmacology**, New York, v. 55, p. 803-808, 1998.

ROBERTS, W. L.; HARIPRASHAD, J.; RAINEY, P. M.; MURRAY, W. H. Pentavalent antimony conjugate therapy of experimental visceral leishmaniasis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Northbrook, v. 55, n. 4, p. 444-446, 1996.

ROTEM, A.; ROTH-BEJERANO, N.; ARAD, S. Effect of controlled environmental conditions on starch and agar contents of *Gracilaria* sp. (Rhodophyceae). **Journal of Phycology**, Lawrence, v. 22, p. 117-121, 1986.

SASADA, M.; PABST, M. J.; JOHNSTON, R. B. Jr. Activation of peritoneal macrophages by lypopolisaccharide alters the kinetic parameters of the superoxide-producing NADPH oxidase. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 258, n. 16, p. 9631-9635, 1983.

SHECHTER, Y. Insulin-mimetic effect of vanadate. Possible implications for future treatment of diabetes. **Diabetes**, Alexandria, v. 39, p. 1-5, 1990.

SIMON-COLIN, C.; KERVAREC, N.; PICHON, R.; DESLANDES, E. Complete ¹H and ¹³C spectral assignment of floridoside. **Carbohydrate Research**, Kidlington, 337, p. 279-208, 2002.

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

SREEDHARA, A.; NOBUYUKI, S.; PATWARDHAM, A.; RAO, C. P. One electron reduction of vanadate (V) by low-molecular-weight biocomponents like saccharides and ascorbic acid: effect of oxovanadium(IV) complexes on pUC18 DNA and on lipid peroxidation in isolated rat hepatocytes. **Biochemistry of Biophysical Research Communications**, Orlando, v. 224, p. 115-120, 1996.

SREEDHARA, A.; SRINIVASA, R.; RAO, C. P. Transition metal-saccharide interactions: synthesis and characterization of vanadyl saccharides. **Carbohydrate Research**, Kidlington, v. 264, p. 227-235, 1994.

TRACEY, A. S.; GRESSER, M. J. vanadium (V) oxyanions: interactions of vanadate with 1,1,1-tris(hydroxymethyl) ethane and with the buffer tris (hydroxymethyl) aminoethane. **Inorganic Chemistry**, Washington, v. 27, p. 2695, 1988.

TRACEY, A. S.; JASWAL, J. S.; GRESSER, M. J.; REHDER, D. Condensation reactions of aqueous vanadate with the common nucleosides. **Inorganic Chemistry**, Washington, v. 29, p. 4283-42-88, 1990.

TSIANI, E.; FANTUS, I. G. Vanadium compounds: biological actions and potential as pharmacological agents. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, New York, v. 8, n. 2, p. 50-57, 1997.

URSI, S.; PEDERSÉN, M.; PLASTINO, E. M.; SNOEIJIS, P. Intraspecific variation of photosynthesis, respiration and photoprotective carotenoids in *Gracilaria birdiae* (Gracilariales: Rhodophyta). **Marine Biology**, Berlin, v. 142, p. 997-1007, 2003.

URSI, S.; PLASTINO, E. M. Crescimento *in vitro* de linhagens de coloração vermelha e verde-clara de *Gracilaria* sp. (Gracilariales, Rhodophyta) em dois meios de cultura: análise de diferentes estádios reprodutivos. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 24, p. 587-594, 2001.

USOV, A. I. Sulfated polysaccharides of the red seaweeds. **Food Hydrocolloids**, v. 6, p. 9-23, 1992.

VAN DEN HOEK, C.; MANN, D. G.; JAHNS, H. M. **ALGAE An introduction to Phycology**. Cambridge: Cambridge University Press, 627 p., 1989.

VAN DER MEER, J. P. e BIRD, N. L. Genetics of *Gracilaria* sp. (Rhodophyceae, Gigartinales). 1. Mendelian inheritance of two spontaneous green variants. **Phycologia**, Lawrence, v. 16, p. 159-161, 1977.

VAN DER MEER, J. P. Genetics of *Gracilaria* sp. (Rhodophyceae, Gigartinales). v. Isolation and characterization of mutant strains. **Phycologia**, Lawrence, v. 18, p. 47-54, 1979.

VAN DER MEER, J. P. Genetics. In Cole, K. M.; SHEATH, R. G. (eds.), **Biology of the red algae**. Cambridge University Press, New York, p. 103-121, 1990.

VAN DER MEER, J. P. The inheritance of spontaneous pigment mutations in *Chondrus crispus* Stackh. (Rhodophyceae). **Nova Scotian Institute of Science**, Princeton, v. 31, p. 187-192, 1981.

VERCHÈRE, J. F.; CHAPELLE, S.; XIN, F.; CRANS, D. C. Metal-carbohydrate complexes in solution. **Progress in Inorganic Chemistry**, New York, v. 47, p. 837-945, 1998.

VERGOPOULOS, V.; PRIEBSCH, W.; FRITSCH, M.; REHDER, D. Binding of L-histidine to vanadium. Structure of *exo*-[VO₂{N-(2-oxidonaphthal)-His}]. **Inorganic Chemistry**, Washington, v. 32, 1844-1849, 1993.

WEBSTER Jr, L. T. Drogas usadas na quimioterapia de infecções por protozoários. **In: As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. GOODMAN & GILMAN, Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan S.A.1991, p. 667-668.

WHISTLER, R. L.; DURSO, D. F. Chromatographic Separation of Sugars on Charcoal, **Journal of American Chemical Society**., Washington, v. 72, p. 677-679, 1950.

WHITFIELD, D. M. Metal coordination to carbohydrate-structure and function. **Coordination of Chemistry Reviews**, Amsterdam, v. 122, p. 171- , 1993.

WHYTE, J. N. C. Proton magnetic resonance and mass spectrometric studies on derivatives of sodium 2-O- α -D-mannopyranosyl-D-glycerate and related compounds. **Canadian Journal Chemical**, Ottawa, v. 47, p. 4083-4086, 1969.

WILCOX, S. J.; BLOOR, S. J.; HEMMINGSON, J. A.; FURNEAUX, R. H.; NELSON, W. A. The presence of gigartinine in a New Zealand *Gracilaria* species. **Journal of Applied Phycology**, Netherlands, v. 13, p. 409-413, 2001.

WYNNE, M. J. **A checklist of benthic marine algae of the tropical and subtropical western Atlantic: second revision**. Berlin-Stuttgart: Nova Hedwigia, 2005. 152 p.

YANO, S.; OTSUKA, T. Sugar-metal ion interactions. **Metal Ions in Biological Systems**. New York, v. 32, p. 27-60, 1996.

YOKOYA, N. S. **Controle do crescimento e da morfogênese por auxinas e citocininas em três espécies de rodófitas: *Gracilariopsis tenuifrons*, *Grateloupia dichotoma* e *Solieria filiformis***. São Paulo, 202 p. 1996. Tese de Doutorado - Universidade de São Paulo. Orientador(a):

YOKOYA, N. S.; PLASTINO, E. M.; ARTEL, R. Physiological responses and pigment characterization of two colour strains of the carrageenophyte *Hypnea musciformis* (Rhodophyta). In Chapman, A. R. O., Anderson, R. J., Vreeland, V. J.; Davison, I. R. (Eds) **Proceedings of the XVIIth International Seaweed Symposium**. Oxford University Press, New York, p. 425-433, 2003.

YUEN, V. G.; CARAVAN, P.; GELMINI, L.; GLOVER, N.; MCNEILL, J. H.; SETYAWATI, I. A.; ZHOU, Y.; ORVIG, C. Glucose-lowering properties of vanadium compounds: comparison of coordination complexes with maltol or kojic acid as

ligands. **Journal of Inorganic Biochemistry**, New York, v. 68, n.2, p. 109-116, 1997.

ZHANG, B.; ZHANG, S.; WANG, K. Synthesis, characterization and crystal structure of cyclic vanadate complexes with monosaccharide derivatives having a free adjacent diol system. **Journal of the Chemical Society Dalton Transactions**, Washington, p. 3257-3263, 1996.