



BIOPROSPECÇÃO DE POLISSACARÍDEOS COM POTENCIAL ATIVIDADE BIOLÓGICA PRODUZIDOS POR MICROALGAS DULCÍCOLAS SUBTROPICAIS.

Maria, Lucas

Girollo, Danilo

Universidade Federal do Rio Grande. Av. Itália Km 8 Bairro Carreiros. Rio Grande - RS. CEP: 96.201 - 900. lucas.dasilvamarina@gmail.com

INTRODUÇÃO

As microalgas são seres vivos muito diversificados que incluem nove filos de organismos eucarióticos e dois filos de procarióticos. Estes organismos ocupam praticamente todos os tipos de ambientes da biosfera, tais como água doce, salgada, gelo, solos, rochas e cascas de árvores, ocorrendo nos ambientes mais extremos como regiões polares e desérticas graças as suas eficientes adaptações morfo-fisiológicas (Van den Hoek *et al.*, 1995). Do ponto de vista filogenético, incluem desde linhagens muito primitivas, como as euglenofíceas, até grupos modernos como algumas algas verdes (Van den Hoek *et al.*, 1995), configurando uma definição muito mais funcional do que propriamente taxonômica. Esta variedade de linhagens evolutivas, formas e mecanismos fisiológicos fazem das microalgas um grupo produtor de uma enorme variedade de compostos químicos com potencial aplicação nas indústrias alimentícia, cosmética, farmacêutica e até mesmo na produção de energia (Olaizola, 2003).

Aliada à larga potencialidade das microalgas como produtoras de compostos de interesse industrial, observa-se a facilidade no isolamento de muitos destes organismos de ambientes naturais e na sua manutenção em condições controladas de cultivo em coleções de culturas (Lourenço 2004). Visto que uma porcentagem muito pequena da biodiversidade brasileira deste grupo está sendo mantida em coleções de cultivo, a prospecção de espécies que detenham potenciais propriedades de interesse comercial é dificultada, ficando evidente a urgência na ampliação dos estudos de caracterização bioquímica de microalgas isoladas em sistemas aquáticos brasileiros, com vistas à identificação de compostos de interesse farmacológico e industrial. Por outro lado, o pouco conhecimento sobre a potencialidade da biodiversidade nacional de microalgas as identifica como um grande reservatório inexplorado de aplicações biotecnológicas (Piccardi *et al.*, 000) e encoraja estudos nesta linha de pesquisa. Dentre os metabólitos produzidos pelas microalgas, destacam-se os polissacarídeos tanto intra como extracelulares. São compostos importantes do ponto de vista quantitativo,

pois correspondem de 40 a 90% dos compostos orgânicos produzidos por estes organismos e qualitativamente representam um enorme espectro de compostos com composições e massas moleculares diferenciados (Myklestad, 1995). De modo geral pode-se separar os polissacarídeos das microalgas em três grandes grupos: reserva, estruturais e extracelulares. Os principais polissacarídeos intracelulares são os de reserva, geralmente formados por glucanos homogêneos, como o amido e suas variações das cianobactérias e rodófitas, bem como a crisolaminarina (Percival, 1979) típica das algas heterocontes (diatomáceas, crisofíceas, xantofíceas e outras). Os polissacarídeos estruturais, presentes principalmente nas paredes celulares, podem variar bastante em termos de composição dependendo do grupo taxonômico, como xilanos, mananos, ramnanos (Carlberg e Percival, 1977) e glicoproteínas variadas (Morita *et al.*, 1999), sendo um importante critério na definição de filos, classes e ordens de microalgas (Reviere, 2006).

Já os polissacarídeos extracelulares, que também podem ser bastante representativos do ponto de vista quantitativo (Paulsen e Vieira, 1994), possuem uma composição muito variável podendo formar compostos homogêneos como fucanos (Girollo e Vieira, 2002), mananos (Vieira *et al.*, 006), arabinogalactanos (Kiemle *et al.*, 007), bem como heteropolissacarídeos com 5 ou mais componentes (Girollo e Vieira, 2005). Este grupo de açúcares é menos conhecido, tanto em termos de composição e estrutura, como de suas funções biológicas para as próprias microalgas (Girollo *et al.*, 003). A falta de informações sobre estes aspectos dos polissacarídeos extracelulares na maioria das espécies de microalgas é relacionada à sua composição não ser claramente determinada pela filogenia, como no caso dos polissacarídeos de reserva e estruturais. Além disso, existem poucos estudos de caracterização destes polissacarídeos em grupos taxonômicos variados, evidenciando a necessidade de aprofundar tais estudos com o objetivo de elucidar se a excreção de polissacarídeos pelas microalgas, um processo comum a todas as espécies estudadas até o momento (Paulsen e Vieira, 1994), seria de fato uma característica espécie-específica.

pecífica (Myklestad, 1995).

Além das interessantes funções desempenhadas no meio extracelular por estes polissacarídeos, muitos destes compostos têm reconhecida atividade biológica (Olaizola, 2003). A grande variedade de frações com diferentes massas moleculares e composições variadas, produzidas pelas inúmeras espécies de microalgas ainda não estudadas, vislumbra uma possibilidade de descoberta de compostos bioativos quase inesgotável no nível de conhecimento em se encontra a comunidade científica atualmente. Dentre os polissacarídeos frequentemente observados em diversas espécies de microalgas, e que potencialmente teriam atividade biológica, destacam-se os fucanos, arabinanos, arabinogalactanos e ramnogalacturanos (Paulsen, 2001).

Os fucanos são polissacarídeos ricos em fucose e que têm um largo espectro de atividade biológica incluindo efeito anticoagulante, anti - inflamatório, imunoestimulador, anti - viral, anti - tumoral e anti - metástase (Cumashi *et al.*, 007). As principais fontes destes compostos são as macroalgas pardas (Classe Phaeophyceae), particularmente das Ordens Laminariales e Fucales (Cumashi *et al.*, 007), produtoras de um tipo de fucano conhecido como fucoidan, que além da alta proporção de fucose, conta também com alto grau de sulfatação. Também diversos grupos de invertebrados marinhos, como as holotúrias, produzem fucanos bioativos, porém em quantidades bem inferiores às macroalgas. Além destes organismos, diversas espécies de microalgas produzem fucanos com potencial bioatividade, porém os testes para comprovar a real atividade destes compostos isolados de microalgas são ainda bastante raros. *Cryptomonas obovata*, *Cryptomonas tetrapyrenoidosa* (Cryptophyceae), *Thalassiosira duostriata* (Bacillariophyceae), *Staurastrum orbiculare* (Zygnematomyceae) são exemplos de microalgas dulcícolas produtoras de polissacarídeos ricos em fucose com potencial bioatividade ainda inexplorada (Giroldo e Vieira 2002, Giroldo *et al.*, 003).

Os arabinanos, arabinogalactanos e ramnogalacturanos são frequentemente associados a uma classe de compostos denominada pectinas, que podem variar muito em termos de composição (Paulsen, 2001); mas têm como característica marcante a presença de arabinose, galactose e ácido galacturônico. Tanto as pectinas neutras como os arabinanos e os arabinogalactanos, quanto as ácidas como os ramnogalacturanos têm reconhecida bioatividade, principalmente em termos de atividade anti - inflamatória e imunoestimuladora. Estes compostos são muito freqüentes em vegetais superiores e em plantas de uso na medicina tradicional, sendo um dos alvos principais da farmacognosia. Diversas espécies de algas, principalmente as mais próximas filogeneticamente dos vegetais superiores, apresentam pectinas na parede celular (Domozych *et al.*, 007). Por outro lado, outras microalgas verdes apresentam parede celular e polissacarídeos extracelulares com características semelhantes às pectinas, como as glicoproteínas (“pherophorins”) que formam o envelope celular típico das Ordens Volvocales e Chlamydomonadales (Morita *et al.*, 999). A atividade imunoestimuladora de *Chlorella* (Chlorococcales) é diretamente relacionada à presença de polissacarídeos ricos em arabinose e galactose neste gênero (Kralovec *et al.*, 007), evidenciando as algas verdes como fontes naturais, além de

facilmente cultiváveis, de polímeros bioativos ricos em arabinose, galactose e ácido galacturônico. Embora poucos trabalhos tenham focado a produção destes compostos em microalgas, a composição promissora da parede celular e de polissacarídeos extracelulares ricos em arabinose, galactose, ácidos urônicos e ramnose indica que há, nesta classe de compostos, mais um campo ainda largamente inexplorado na prospecção de substâncias bioativas produzidas por microalgas.

Considerando os aspectos expostos até aqui, fica evidente que a produção de polissacarídeos com potencial bioatividade por microalgas isoladas de ambientes aquáticos brasileiros deve ser explorada com urgência para valorizar o patrimônio genético da biodiversidade nacional. A bio-prospecção aparece como ferramenta indispensável para a descoberta de novas substâncias de interesse humano e este projeto objetiva, portanto, conhecer preliminarmente os polissacarídeos excretados por cinco espécies de microalgas dulcícolas de diferentes classes taxonômicas, isoladas de sistemas aquáticos subtropicais e mantidas em cultivo na Coleção de Culturas de Microalgas Dulcícolas da Universidade Federal de Rio Grande (CCMD - FURG).

OBJETIVOS

O objetivo deste projeto é caracterizar preliminarmente a produção de polissacarídeos intra e extracelulares de cinco espécies de microalgas dulcícolas subtropicais, bem como detalhar a estrutura destes compostos em pelo menos cinco destas espécies com maior produtividade de polissacarídeos com potencial bioatividade.

Os objetivos específicos são os seguintes: (1) determinar as taxas de crescimento das cinco espécies envolvidas neste projeto; (2) quantificar e identificar os componentes dos polissacarídeos produzidos pelas cinco espécies envolvidas neste projeto durante o crescimento em culturas estancadas.

MATERIAL E MÉTODOS

Para a realização deste trabalho foram utilizadas as espécies algais *Ankistrodesmus* sp, *Chlamydomonas* sp, *Staurastrum* sp, *Anabaena* sp. e *Synechococcus* sp. Estas microalgas foram cultivadas em frascos Erlenmeyers de 1000 mL com 600 mL (triplicata) do meio de cultura apropriado para cada espécie. Foram realizadas duas amostragens por semana até o estabelecimento da fase estacionária de crescimento, que pode variar entre 20 e 60 dias, dependendo da espécie. Alíquotas de 30 mL foram retiradas a cada amostragem para a determinação do crescimento e a produção de carboidratos. Uma alíquota de 5 mL foi fixada com lugol acético para determinação da densidade celular por contagens diretas ao microscópio, utilizando uma câmara de Neubauer. Os 25 mL restantes foram centrifugados (tempo e velocidade adequado a cada espécie) e o sobrenadante reservado, enquanto as células precipitadas foram lavadas 3 vezes e ressuspensas em meio novo. A análise de carboidratos totais foi realizada por colorimetria pelo ensaio fenol - sulfúrico (Dubois *et al.*, 956), tanto no sobrenadante (carboidratos extracelulares) e como nas

células precipitadas. As células foram lisadas por congelamento/descongelamento. A amostra lisada foi então filtrada em filtros de fibra de vidro GF/F (Whatman) e o teor de carboidratos totais solúveis foi determinado no filtrado da mesma forma que os carboidratos extracelulares. Os carboidratos não solúveis foram determinados no filtro pelo método descrito por Myklestad e Haug (1972). Foi também avaliada a composição preliminar dos carboidratos solúveis, tanto extracelulares como nas células lisadas, por cromatografia líquida de alta performance, acoplada a detecção por pulsos amperométricos (HPLC - PAD).

RESULTADOS

A dosagem de clorofila - a e a contagem de células mostraram que *Chlamydomonas* sp. apresentou crescimento exponencial aproximadamente até o sétimo dia do experimento, seguido de uma fase estacionária e senescência. A produção de carboidratos intracelulares acompanhou o crescimento e atingiu cerca de 40 mg/L, o que equivale a 483 mg de carboidratos intracelulares por micrograma de clorofila. A excreção de carboidratos aumentou até o final do experimento de forma independente do crescimento, atingindo 18,7 mg/L de carboidratos extracelulares, equivalentes a 253,6 mg de carboidratos extracelulares por micrograma de clorofila. Na análise do percentual dos monossacarídeos que compõem os polissacarídeos extracelulares de *Chlamydomonas*, observa-se, na fase estacionária do crescimento, a diminuição da proporção de Glucose acompanhada do aumento nas proporções de Fucose, Galactose, Manose/Xilose e Ácido Glucurônico. As proporções de Ramnose/Galactosamina, Arabinose e Glicosamina não se modificaram ao longo do experimento. No percentual dos monossacarídeos intracelulares na fase estacionária de crescimento do experimento, observa-se que a Glucose (42%), seguida de Galactose (17%), Arabinose (13%) e Manose/Xilose (11%) são os monossacarídeos mais abundantes.

Observou-se que *Ankistrodesmus* sp. apresentou crescimento exponencial aproximadamente até o décimo quinto dia do experimento, seguido de uma fase estacionária e senescência. A produção de carboidratos intracelulares acompanhou o crescimento e atingiu cerca de 25 mg/L, o que equivale a 301,36 mg de carboidratos intracelulares por micrograma de clorofila. Além disso, a excreção de carboidratos aumentou até o final do experimento de forma independente do crescimento, atingindo 22 mg/L de carboidratos extracelulares, equivalentes a 110,52 mg de carboidratos extracelulares por micrograma de clorofila. Na fase estacionária de crescimento do experimento, observou-se que o Ácido Glucurônico representa uma proporção significativa (33%) dos monossacarídeos extracelulares, seguido de Glucose (24%), Manose/Xilose (13%) e Galactose (11%). No meio intracelular, a Glucose (45%), a Manose/Xilose (22%) e a Galactose (17%) são os monossacarídeos mais abundantes.

Onychonema sp. apresentou crescimento exponencial aproximadamente até o vigésimo dia do experimento, seguido de uma fase estacionária e senescência. A produção de carboidratos intracelulares acompanhou o crescimento e

atingiu cerca de 70 mg/L, o que equivale a 455,8 mg de carboidratos intracelulares por micrograma de clorofila. A excreção de carboidratos aumentou até o final do experimento de forma independente do crescimento, atingindo 12 mg/L de carboidratos extracelulares, equivalentes a 77,430 mg de carboidratos extracelulares por micrograma de clorofila. A Fucose representou uma proporção significativa (27%) dos monossacarídeos extracelulares durante a fase estacionária do experimento, seguida de Manose/Xilose (25%), Galactose (17%), Glucose (10%) e Ácido Glucurônico (10%). Observou-se que, no meio intracelular, a Glucose (41%), a Galactose (19%), a Manose/Xilose (11%) e a Fucose (13%) são os monossacarídeos mais abundantes.

Tanto *Staurastrum* quanto *Anabaena* apresentaram crescimento até o dia 27 do experimento seguido de uma fase estacionária. Estão em andamento a contagem de células, as dosagens e identificações de carboidratos intra e extracelulares.

Os resultados indicaram abundante produção de polissacarídeos na fase estacionária de crescimento em todas as cepas. A análise dos polissacarídeos, realizada via HPLC com detecção por amperometria pulsada indicou a presença de arabinose associada à galactose em *Chlamydomonas* sp. além de altos teores de fucose e ácidos urônicos em *Onychonema* sp.. Polissacarídeos com esta natureza assemelham-se a pectinas produzidas por plantas superiores e fucoidans produzidos por algas pardas, que são compostos associados a atividades biológicas diversas, como anti-tumorais, anti-inflamatórias e imuno estimuladoras entre outras (Paulsen, 2001 e Cumashi *et al.*, 007).

CONCLUSÃO

Concluímos que esta análise preliminar dos carboidratos produzidos por cada espécie forneceu subsídios para a identificação das microalgas que produzem as maiores quantidades de polissacarídeos e também as que produzem compostos com maior potencial para bioatividade, dependendo dos componentes mais abundantes.

Agradecimentos ao departamento de Botânica da Universidade Federal de São Carlos, sob a responsabilidade do prof. Dr. Armando A. H. Vieira, por permitir o uso do equipamento para realização das análises de carboidratos por cromatografia líquida de alta performance (HPLC - PAD).

REFERÊNCIAS

- Carlberg, G. E., Percival, E. 1977. Carbohydrates of green seaweeds belonging to genus *Urospora*. 2. Carbohydrates of green seaweeds *urospora* - *wormskioldii* and *codium* - *pusillum*. *Carbohydrate Research* 57, 223 - 234.
- Cumashi, A., Ushakova, N. A., Preobrazhenskaya, M. E., D'Incecco, A., Piccoli, A., Totani, L., Tinari, N., Morozevich, G. E., Berman, A. E., Bilan, M. I., Usov, A. I., Ustyuzhanina, N. E., Grachev, A. A., Sanderson, C. J., Kelly, M., Rabinovich, G. A., Iacobelli, S. e Nifantiev, N. E. 2007. A comparative

study of the anti - inflammatory, anticoagulant, antiangiogenic, and antiadhesive activities of nine different fucoidans from brown seaweeds *Glycobiology* 17, 541-552.

Domozych, D. S., Elliott, L., Kiemle, S. N. 2007. *Pleurotaenium trabecula*, a desmid of wetland biofilms: The extracellular matrix and adhesion mechanisms. *Journal of Phycology* 43, 1022 - 1038.

Dubois, M., Guilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. e Smiths, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* 28, 350 - 356.

Giroldo, D. e Vieira, A. A. H. 2002. An extracellular sulphated fucose - rich polysaccharides produced by a tropical strain of *C. obovata* (Cryptophyceae). *Journal of Applied Phycology* 14, 185 - 191.

Giroldo D., Vieira, A. A. H. e Paulsen, B. S. 2003. Relative increase of deoxy sugars during microbial degradation of an extracellular polysaccharide released by a tropical freshwater *Thalassiosira* sp. (Bacillariophyceae). *Journal of Phycology* 39, 1109 - 1115.

Giroldo, D. e Vieira, A. A. H. 2005. Polymeric and free sugars released by three phytoplanktonic species from a freshwater tropical eutrophic reservoir. *Journal of Plankton Research* 27, 695 - 705.

Kiemle, S. N., Domozych, D. S., Gretz, M. R. 2007. The extracellular polymeric substances of desmids (Conjugatophyceae, Streptophyta): chemistry, structural analyses and implications in wetland biofilms. *Phycologia*, 46: 617 - 627.

Kralovec, J. A., Metera, K. L., Kumar, J. R., Watson, L. V., Girouard, G. S., Guan, Y., Carr, R. I., Barrow, C. J., Ewart, H. S. 2007. Immunostimulatory principles from *Chlorella pyrenoidosa* - Part 1: Isolation and biological assessment in vitro. *Phytomedicine*, 14: 57 - 64.

Lourenço, S. O. e Vieira A. A. H. 2004. Culture collections of microalgae in Brazil: progress and constraints. *Nova Hedwigia* 79 (1 - 2): 149 - 173.

Morita, E., Abe, T., Tsuzuki, M., Fujiwara, S., Sato, N., Hirata, A., Sonoike, K. e Nozaki, H. 1999. Role of pyrenoids in the CO₂-concentrating mechanism: comparative morphology, physiology and molecular phylogenetic

analysis of closely related strains of *Chlamydomonas* and *Chloromonas* (Volvocales). *Planta* 208, 365-372.

Myklestad, S. e Haug, A. 1972. Production of carbohydrates by the marine *Chaetoceros affinis* var. *Willei* (Gran.) Hustedt. I. Effect of the concentration of nutrients in culture medium. *Journal of Experimental Marine Biology Ecology* 9, 125 - 136.

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

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

Paulsen, B. S. e Vieira, A. A. H. 1994. Structural studies on extracellular dissolved and capsular polysaccharides produced by *Spondylosium panduriforme*. *Journal of Phycology* 30, 638 - 641.

Paulsen, B. S. 2001. Plant polysaccharides with immunostimulatory activities. *Current Organic Chemistry* 5, 939 - 950.

Paulsen, B. S. e Vieira, A. A. H. 1994. Structural studies on extracellular dissolved and capsular polysaccharides produced by *Spondylosium panduriforme*. *Journal of Phycology* 30, 638 - 641.

Percival, E. 1979. Polysaccharides of green, red and brown seaweeds - their basic structure, biosynthesis and function. *British Phycological Journal* 14, 103 - 117.

Piccardi, R., Frosini, A., Tredici, M R, Margheri, M C. 2000. Bioactivity in free - living and symbiotic cyanobacteria of the genus *Nostoc* *Journal of Applied Phycology* 12 543 - 547.

Reviere, B. 2006. Biologia e filogenia das algas. *Artmed*, Porto Alegre. 280p.

Van den Hoek, C., Mann, D. G. e Jahns, H. M. 1995. Algae: an introduction to phycology. *Cambridge University Press*, Cambridge. 627p.

Vieira, A. A. H., Giroldo, D., Ortolano, P. I. C. 2006. Aggregate formation in axenic and microbial co - inoculated batch cultures of *Aulacoseira granulata* (Bacillariophyceae). *Acta Limnologica Brasiliensis* 18, 1 - 7.