



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE PESCA

CULTIVO DA MICROALGA MARINHA *Tetraselmis gracilis*, EM
LABORATÓRIO – EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS
SULFATADOS

MARIA ISONILDE SOARES

Monografia apresentada ao
Departamento de Engenharia de Pesca
do Centro de Ciências Agrárias da
Universidade Federal do Ceará, como
parte das exigências para a obtenção
do título de Engenheiro de Pesca.

FORTALEZA – CEARÁ – BRASIL

JULHO - 2007

COMISSÃO EXAMINADORA:

PROF. WLADIMIR RONALD LOBO FARIAS, D. SC
ORIENTADOR/PRESIDENTE

ENG. DE PESCA JOSÉ ARIÉVILO GURGEL RODRIGUES
MEMBRO

M.SC. WALDEMAR CAVALCANTE
MEMBRO

VISTO:

RAIMUNDO NONATO DE LIMA CONCEIÇÃO
Coordenador do Curso de Engenharia de Pesca

PROFº. MOISÉS ALMEIDA DE OLIVEIRA
Chefe do Departamento DEP/ CCA/ UFC

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S655c Soares, Maria Isonilde.

Cultivo da microalga marinha *Tetraselmis gracilis*, em laboratório — extração e purificação de polissacarídeos sulfatados / Maria Isonilde Soares. – 2007.

41 f. : il.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Curso de Engenharia de Pesca, Fortaleza, 2007.

Orientação: Prof. Dr. Wladimir Ronald Lobo Farias.

1. Microalga marinha - Cultivo. 2. Engenharia de Pesca. I. Título.

CDD 639.2

A quem comigo dividiu seus conhecimentos durante o período deste curso.

Dedico este trabalho aos meus irmãos, que sempre estiveram ao meu lado, me apoiando e me incentivando. A minha querida mãe (*in memoriam*) que foi minha inspiração durante todo o meu curso. Ofereço também aos meus sobrinhos e, a todos os amigos que estiveram ao meu lado nessa caminhada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela alegria em me conceber a realização de mais um sonho na minha vida, pelas vezes em que o conforto de suas palavras me fez acreditar na vitória.

A minha mãe (*in memoriam*) pelo cuidado, incentivo, confiança de que um dia realizaria um sonho que era tanto meu quanto seu.

Aos meus irmãos pelo incentivo, motivação e em especial minha irmã Lúcia e meu cunhado Agristerdan que sempre apoiaram e, pela ajuda incondicional eu vêm me oferecendo ao longo de minha vida.

Ao Gilson pelas vezes em que me cedeu um espaço em seu lar para estudar, e por fazer parte da minha vida.

Ao meu orientador, Prof^o Dr. Wladimir, pela oportunidade de realizar este trabalho, pela confiança em mim depositada, pela sua paciência, atenção, pela valiosa orientação e conhecimentos passados durante a execução deste trabalho, os meus sinceros agradecimentos.

A minha amiga Vilania Maria, pelo companheirismo durante essa minha caminhada e por ter contribuído direta e indiretamente para minha formação.

Aos meus amigos, Natália Rocha, Sara Helane, Tatiany Freitas, Andréia, Patrícia Mara, Vera, Valmir Barros, Robson, pelos momentos de descontração e companheirismo.

A todos os professores do Departamento de Engenharia de Pesca que contribuíaam para a minha formação, em especial, a Profª Silvana Saker, quem admiro e tenho um carinho especial.

Ao funcionário Antonio, pelas vezes que com atenção e dedicação me ajudou quando precisei.

A todos, os meus sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

	Páginas
DEDICATÓRIA	iii
AGRADECIMENTOS	iv
SUMÁRIO	vi
RESUMO	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTAS DE TABELAS	x
LISTAS DE ANEXOS	xi
INTRODUÇÃO	1
1.1 Polissacarídeos sulfatados	4
2. MATERIAIS E MÉTODOS	8
2.1 Cultivo da microalga marinha <i>Tetraselmis gracilis</i>	8
2.1.1 Manutenção das cepas	8
2.1.2 Preparo da água do mar artificial	8
2.1.3 Preparo dos meios de cultivo	9
2.1.4 Início do cultivo	9
2.1.5 Acompanhamento do cultivo	10
2.1.6 Obtenção das curvas de crescimento	12
2.2 Extração de polissacarídeos sulfatados	12
2.3 Fracionamento dos polissacarídeos sulfatados em coluna de troca iônica.	15
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	16
3.1 Correlação entre os valores de Absorbância á 700nm e n° de células.mL ⁻¹	16
3.2 Curva de crescimento da microalga T.gracilis cultivada em meio Guillard f/2	17

3.3. Curva de crescimento da microalga <i>T.gracilis</i> , expressa em valores de absorvância á 700 nm	19
3.4. Extração de polissacarídeos sulfatados	20
3.5.Fracionamento dos polissacarídeos sulfatados em DEAE-celulose	·21
4.CONCLUSÃO	23
5.REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	24

RESUMO

As microalgas marinhas do gênero *Tetraselmis* pertencem a divisão Chlorophyta, classe Prasinophyceae. Os indivíduos representantes deste gênero são monadóides, solitários, de vida livre, ativamente móveis. Dentre os compostos químicos de elevada importância presentes nas algas marinhas estão os polissacarídeos. Nos polissacarídeos sulfatados, as atividades biológicas mais amplamente estudadas são anticoagulante e antitrombótica. O objetivo do presente trabalho foi realizar o cultivo da microalga *T. gracilis* em meio de cultivo Guillard F/2 modificado, visando à determinação da curva de crescimento do cultivo através de espectrofotometria e extração de polissacarídeos sulfatados da biomassa produzida. O acompanhamento do cultivo foi realizado através de leituras de absorbância a 680nm e por contagem de células em câmara de Neubauer (hemacitômetro). Assim, foi estabelecida uma regressão linear entre os valores de absorbância e o número de células dada pela fórmula $Y = - 46,7 + 2680,7x$, onde $Y = N^{\circ}$ de células. $\text{mL}^{-1} \cdot 10^{-4}$ e $X = \text{abs}_{680\text{nm}}$ com um coeficiente de correlação linear (r) de 0,99. Foram realizados um total de 5 cultivos em garrafão de 3 L, onde o crescimento logarítmico foi alcançado no décimo quinto dia, entrando ao vigésimo quarto dia na fase estacionária, os quais renderam 1,6 g de biomassa seca que foram utilizados para a extração de polissacarídeos sulfatados. A extração resultou em 83mg de PS totais, os quais, após fracionados em coluna de DEAE-celulose, resultaram em 5 frações, sendo a maior metacromasia obtida com a eluição na concentração 0,5M de NaCl. Foi possível concluir que a microalga *T. gracilis* cultivada em laboratório, produz polissacarídeos sulfatados, que poderão ser utilizados futuramente em ensaios de atividades biológicas.

LISTAS DE FIGURAS

	Páginas
Figura 1. Microalga marinha <i>Tetraselmis sp</i>	3
Figura 2. Fluxograma mostrando as etapas de cultivo até a obtenção da biomassa seca da microalga <i>T. gracilis</i> .	11
Figura 3. Fluxograma de extração dos polissacarídeos sulfatados da microalga <i>T. gracilis</i>	14
Figura 4. Reta de regressão linear obtida a partir do nº de células.mL ⁻¹ de <i>T. gracilis</i> e os valores de absorvância da cultura a 680nm.	17
Figura 5. Curva de crescimento da microalga <i>T. gracilis</i> , expressa em nº de células mL ⁻¹ .10 ⁻⁴ por dias de cultivo.	18
Figura 6. Curva de crescimento da microalga <i>T. gracilis</i> , expressa em valores de absorvância a 700nm.	20
Figura 7. Fracionamento dos polissacarídeos sulfatados, extraídos da microalga <i>Tetraselmis gracilis</i> , em coluna de troca iônica DEAE-celulose.	22

LISTA DE TABELAS**Páginas**

Tabela 1. Sais utilizados no preparo da água do mar artificial.

9

LISTA DE ANEXOS

	Página
Preparação do Meio de cultura – Guillard F/2	30

**CULTIVO DA MICROALGA MARINHA *Tetraselmis gracilis* em
LABORATÓRIO
EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS SULFATADOS.**

MARIA ISONILDE SORES

1. INTRODUÇÃO

O plâncton é a comunidade biológica dos ecossistemas aquáticos com tamanhos e locomoção reduzidos, e distribuição espacial em função da circulação geral dos oceanos. Normalmente distribuem-se na coluna de água, com maior abundância em camadas superiores, decrescendo com a profundidade em oceanos profundos.

Denomina-se fitoplâncton os vegetais do plâncton constituído principalmente de algas normalmente unicelulares, isoladas ou organizadas em colônias filamentosas que tem capacidade fotossintética. Além de ser o nível básico da cadeia alimentar dos ecossistemas aquáticos, o fitoplâncton é um dos grandes responsáveis pela renovação do estoque de oxigênio e de outros componentes da atmosfera. Constitui uma das comunidades marinhas mais diversas e é composto por centenas de gêneros e milhares de espécies de algas unicelulares, que multiplicam-se por divisão celular e, como qualquer organismo autótrofo, depende da luz e nutrientes para a atividade fotossintética e crescimento.

Vários projetos tentam desenvolver um produto visando à minimizar os efeitos da má nutrição devido a falta ou insuficiência protéica na alimentação, bem como geração de emprego e renda. Desta forma, as pesquisas envolvendo a biotecnologia, por meio da utilização de microorganismos ou enzimas para a produção de novos produtos, estão revolucionando a sociedade moderna (BENEMANN et al., 1987).

Certas espécies de microalgas, quando cultivadas em meios equilibrados, podem duplicar sua biomassa diariamente, produzindo matéria seca com teor protéico superior a 50% alcançando produtividade de 30 a 50 $\text{gm}^{-2} \cdot \text{dia}^{-1}$ em peso seco (GOLDMAN, 1980). As microalgas apresentam uma distribuição global, podendo ser cultivadas em locais variados, tais como lagos salinos adjacentes a desertos ou nos mares do Ártico e Antártico. São largamente utilizadas como fontes de matéria prima para as indústrias farmacêuticas. Segundo Richmond (1986) o valor farmacêutico das microalgas tem sido reconhecido a muito tempo. Dentre as propriedades terapêuticas de produtos extraídos das algas marinhas podemos mencionar: antiemético, antihipertensivo, anticoagulante, antibiótico, como redutor da atividade de tumores, como ativador de enzimas e fonte de vitaminas, dentre outras. São utilizadas também na aquicultura como fonte de alimento para animais, em particular para as larvas de moluscos, estágios juvenis de crustáceos e peixes (DE PAUWN; PERSONE, 1988)

Alguns trabalhos realizados na região nordeste do Brasil avaliaram a produção em massa de microalgas, com a descobertas de novos meios de cultivos para baratear o custo de produção (KOENING et al., 1990a) e a estudos ecofisiológicos e bioecológicos (COSTA et al., 1994).

Vários fatores influenciam diretamente no crescimento das microalgas. Os fatores ambientais mais importante são a luz e conseqüentemente, a temperatura. A luz é extremamente necessária pois a maioria das microalgas são fotossintetizantes e necessitam de luz para se desenvolver. Já a temperatura afeta as atividades metabólicas e a disponibilidade de nutrientes. Esses são os fatores que mais limitam a produção ao ar livre. A salinidade do meio de cultivo é outro fator de grande influência pois causa efeito direto no incremento da biomassa (VONSHAK, 1997).

As microalgas verdes do gênero *Tetraselmis* pertencem a divisão Chlorophyta, classe Prasinophyceae. Os indivíduos representantes deste gênero são monadóides, solitários, de vida livre, ativamente móveis. A célula apresenta forma, em vista frontal, que varia desde aproximadamente

codiforme, que é mais comum, a elipsóide, até a quase esférica. Em qualquer situação, porém, a célula é bilateralmente simétrica. Em vista lateral a célula é mais quadrangular, com ângulos arredondados. Além disso pode ser reta ou dorsiventralmente curvada. As células são heteropolares, ou seja, o pólo anterior é amplamente arredondado ou mais acuminado, mas sempre com uma depressão mediana de extensão variada e mais ou menos profunda, enquanto o pólo posterior varia desde amplamente arredondado até nitidamente acuminado. O cloroplastídeo é poculiforme, com a porção basal ocupando, em geral, um terço da célula em vista frontal raramente a metade e só na espécie (*T. contracta*) mais do que a metade. Suas porções laterais possuem largura relativamente reduzida, mas estendem-se até o pólo anterior da célula. Raramente, ocorrem dois cloroplastídeos laterais situados um em frente ao outro. O pirenóide é único, basal, central e tem forma próxima de redonda. Em alguns raros casos, pode não existir pirenóide. O estigma é único, grande, ocupa metade anterior da célula e situa-se em vista lateral, deslocado para a face côncava (ventral) da célula. Os quatro flagelos são anteriores e não são maiores que o comprimento da célula, porém todos estão inseridos no fundo da concavidade mediana do pólo anterior da célula. Ocorrem dois vacúolos contráteis na parte anterior da célula e mais precisamente, nas imediações das bases flagelares. A parede celular é bastante conspícua e persistente durante a divisão celular (BICUDO; MENEZES, 2006) (Figura 1)



Figura 1. Microalga marinha *Tetraselmis* sp

1.1. Polissacarídeos Sulfatados

Dentre os compostos químicos de elevada importância presente nas algas marinhas estão os polissacarídeos, que são as macromoléculas mais abundantes nos organismos vivos, as quais garantem suporte, proteção, forma, rigidez e elasticidade aos tecidos animais e vegetais. Destacam-se neste grupo os polissacarídeos sulfatados (PS), que são polímeros formados por unidades repetitivas de açúcares e carregados negativamente devido a presença de radicais sulfatos. Estas moléculas são biologicamente ativas e de extrema relevância econômica devido ao fato de serem atóxicas e possuírem propriedades gelatizantes e espessantes com considerável valor comercial (OLIVEIRA, 1997), sendo encontradas nos tecidos conjuntivos dos vertebrados (MATHEWS, 1975) e em grandes quantidades nas algas marinhas (PAINTER, 1983). Os PS não são encontrados em plantas superiores, no entanto, recentemente, foi detectada a presença desses polímeros em gramíneas marinhas (AQUINO et al., 2005).

Os PS, extraídos de diversas algas marinhas, podem ser aplicáveis em diferentes áreas, como na indústria alimentícia onde são utilizadas como emulsificantes, estabilizantes e espessantes de alimentos; na indústria cosmética; na biotecnologia no preparo de culturas gelatinosas e nas ciências biomédicas (HOEK et al., 1995).

A busca por novos compostos provenientes dos organismos aquáticos, aplicáveis nas ciências biomédicas e na biotecnologia vem se expandindo nos últimos anos. Pode se destacar, dentre estes compostos os PS com atividade anticoagulante, antitrombótica e imunoestimulante e as lectinas (proteínas hemaglutinantes e mitogênicas) extraídas de invertebrados e de algas (micro e macroalgas) (ARTHUR et al., 1985; BICK, FAREED, 1997; AINOZ et al., 1991).

Os invertebrados possuem PS com atividade anticoagulante, podendo ser encontrados em moluscos, equinodermos e ascídeas, estes últimos possuem moléculas de sulfato de dermatan (PAVÃO et al., 1998)

Alguns trabalhos já foram publicados utilizando PS extraídos de microalgas. Campa-Cordova et al. (2002) avaliam as ações do β -glucano e de um polissacarídeo sulfatado extraído de uma microalga cianofíceas, em banhos de imersão com juvenis do camarão branco americano, *Litopenaeus vannamei*, por 1, 3 e 6 horas. Os pesquisadores concluíram que após 6 horas de imersão, estes polímeros apresentaram atividade imunoestimulante sendo que o sulfatado foi 500 vezes mais potente que o β -glucano (não sulfatado).

Os PS extraídos da microalga *Porphyridium* sp apresentaram atividade antiviral, *in vitro* e *in vivo*, contra o vírus do herpes simplex tipos I e II (HSV- I e II) (HUHEIHEL et al., 2002). Além disso, esses polissacarídeos também exibiram efeito inibitório contra o vírus *Moloney murine*, onde os autores sugerem que sua inibição é mais eficaz se o mesmo for acrescido antes ou na ocasião da infecção (HUHEIHEL; ARAD, 2001). Estes polímeros também apresentaram uma impressionante atividade antiviral contra o vírus *Varicella zoster* (VZV). A inibição da produção de novas partículas de vírus também foi inibida quando o cultivo de células pré-infectadas foi tratado com o polissacarídeo e, dependendo da concentração, a molécula ou inibe completamente o desenvolvimento da infecção ou a retarda em células pré-infectadas com HSV ou VZV. Deste modo, os autores sugerem que a referida alga é uma forte candidata ao desenvolvimento e uma nova droga antiviral (HUHEIHEL et al., 2001).

Hayashi et al. (1996) isolaram o polissacarídeo sulfatado da microalga marinha *Spirulina platensis*, o “cálcio spirulan” que apresentou uma elevada atividade antiviral quando testada no vírus da herpes (HSV-I) e no vírus da AIDS (HIV-I).

Além das atividades biológica acima citadas os PS apresentam diversas outras, tais como anti-inflamatória, interação com fatores de crescimento,

antiproliferativa, antimetastática, antiadesiva podendo ainda inibir a fertilização (BOISSON-VIDAL et al., 1995).

Os PS da macroalga marinha vermelha *Botryocladia occidentalis* foram incorporados na ração para larvas de tilápia, sendo observado um crescimento bastante diferenciado nas larvas que receberam determinada dose do polissacarídeo (FARIAS et al., 2004). Além disso quando esses mesmos polissacarídeos sulfatados foram utilizados, numa determinada dose, em banhos de imersão em pós-larvas do camarão *Litopenaeus vannamei* os mesmos apresentaram uma sobrevivência aumentada (BARROSO et al., 2007). Este efeito de aceleração de crescimento ou uma melhoria na sobrevivência tem sido relatado como um efeito adicional na imunoestimulação (ARAÚLO, 2005).

Farias et al. (2000), avaliando o efeito das galactanas sulfatadas extraída da alga citada acima, constataram que esta apresenta também uma potente atividade anticoagulante inibindo a ação da trombina, bem como atividade antitrombótica (FARIAS et al., 2001).

Segundo Zhou et al. (2004) a alga marinha vermelha *Chondrus ocellatus* possui galactanas sulfatadas com atividade antitumoral e imunomodulatória. Esses polissacarídeos foram degradados e frações com diferentes pesos moleculares, sendo que todas apresentam atividade e maior ou menor grau.

Nos PS, as atividades biológicas mais amplamente estudadas são a anticoagulante e antitrombótica, que se expressam em várias atividades como na heparina, no sulfato de dextram, nas fucanas e galactanas sulfatadas (THOMAS et al., 1989; COLLIEC et al., 1991; NISHINO et al., 1991; NISHINO, NAGUMO, 1992).

O polissacarídeo sulfatado encontrado na alga verde *Codium cylindricum* mostrou uma atividade anticoagulante similar a heparina (MATSUBARA et al., 2001). A heparina é um polímero da família dos glicosaminoglicanos sulfatados que foi descoberto em 1916. Este polissacarídeo apresenta alta atividade anticoagulante e é extraído de pulmão

bovino ou de intestino de suínos, sendo a heparina de baixo peso molecular as mais utilizadas na clínica médica (RANG et al., 2001)

Burson et al. (1956) isolaram dos moluscos *Mactrus pussula* e *Cyprinia islandica* uma substância denominada de “mactina”, que apresentou atividade anticoagulante, sendo estruturalmente semelhante a heparina.

A primeira descrição da atividade anticoagulante de polissacarídeos sulfatados de alga marinha foi feita por Chargaff et al. (1936), relatando o efeito anticoagulante de galactanas sulfatadas extraída da espécie *Iridaea laminarioides*.

Outro grupo de polissacarídeos sulfatados encontrados em algas marinhas são principalmente as carragenanas e fucoidam. Esses compostos geralmente são encontrados no espaço extracelular ou na matriz mucilaginosa de várias espécies de algas marinhas. As carragenanas são polímeros lineares constituídos de unidades alternadas de β (1 \rightarrow 4) D-galactopiranosose e α (1 \rightarrow 3) galactopiranosose.

Ângulo et al. (2003) mostraram que o fucoidam, extraído da alga marinha parda *Fucus vesiculosus*, apresentou uma eficiente atividade citotóxica e miotóxica contra o veneno das serpentes *Bothrops asper*, *Cerrophidion godmoni*, *Atropoides nummifer* e *Bothriechis schlegelii*. Hawkins; Leonardo (1962) demonstraram a atividade anticoagulante *in vitro* da carragenana, extraída da alga vermelha *Chondrus crispus*, utilizando plasma humano e de cachorro.

O presente trabalho teve como objetivo cultivar e determinar a curva de crescimento, bem como extrair e purificar os polissacarídeos sulfatados presentes na microalga *T. gracilis*.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Cultivo da microalga marinha *Tetraselmis gracilis*

2.1.1. Manutenção das cepas

As cepas de *Tetraselmis gracilis*, foram trazidas do Instituto de Ciências do Mar da UFC e são mantidas no laboratório de Planctologia do Departamento de Engenharia de Pesca/CCA/UFC, onde foi realizado parte do experimento. As cepas são mantidas em tubos de ensaio com iluminação artificial (± 1000 Lux) e fotoperíodo de 16 h de claro e 8 h de escuro, sendo a temperatura mantida em $24 \pm 2^\circ\text{C}$. A cada 15 dias, a cepa mãe é repicada em 4 tubos de ensaio contendo 10 mL de meio de cultivo Guillard f/2 modificado, preparado com água do mar artificial previamente autoclavada (121°C ; 30 min.). No momento da repicagem, cada tubo recebe cerca de 3,5 mL de cultura da microalga e, com o objetivo de evitar contaminação, o procedimento é realizado utilizando o bico de Bunsen.

2.1.2. Preparo da água do mar artificial

A água utilizada no meio de cultivo foi uma água do mar artificial preparada a partir de água destilada, sendo diluída na mesma os sais listados na tabela 1. Dos reagentes utilizados, apenas o cloreto de magnésio e o brometo de potássio foram de grau analítico, enquanto os demais de grau comercial.

Reagentes	Quantidades (g/L)
Cloreto de Sódio	27,6
Sulfato de Magnésio	6,9
Cloreto de Magnésio	5,4
Cloreto de Cálcio	1,4
Cloreto de Potássio	0,6
Bicarbonato de Sódio	0,2
Brometo de Potássio	0,027

Tabela 1. Sais utilizados no preparo da água do mar artificial

2.1.3. Preparo dos meios de cultivo

O cultivo da microalga *T. gracilis* foi realizado utilizando o meio de cultivo Guillard f/2 modificado, o qual foi preparado adicionando-se 1 mL de uma solução de nitrato de sódio (Solução 1), 1 mL de uma solução de fosfato de sódio (Solução 2), 1 mL de uma solução de metais traços (Solução 4) e 0,5 mL de uma solução de vitaminas (Solução 3) (Anexo 1) a 1 L de água do mar artificial (35‰), previamente autoclavada a 121°C durante 30 min.

2.1.4. Início do cultivo

O cultivo de *T. gracilis* foi iniciado, a partir de um volume de 20 mL em um erlenmeyer de 250 mL, no qual, a cada dois dias, foi acrescentado aproximadamente o mesmo volume de meio de cultura esterilizado. Após 12 dias, o conteúdo do erlenmeyer de 250 mL foi transferido para outro erlenmeyer de 1 L. Mais uma vez o volume foi aumentado com a adição de mais meio de cultivo e, finalmente, o conteúdo do erlenmeyer de 1 L foi transferido para um recipiente de 3 L. Neste momento, o volume foi

completado para 3 L com adição de meio de cultivo esterilizado e a cultura passou a ser submetida a uma aeração constante e iluminância de aproximadamente 1.000 Lux

2.1.5. Acompanhamento do cultivo

O crescimento populacional das microalgas foi realizado no recipiente de 3 L, sendo acompanhado por espectrofotometria e por contagem de células. Desta forma, a cada 3 dias, foi retirada uma alíquota do volume, a qual foi levada a um espectrofotômetro para leitura da absorbância no comprimento de onda de 680 nm. Em seguida as células contidas na amostra foram fixadas com solução de formalina neutralizada com bórax e feita a contagem celular em câmara de Neubauer (hemacitômetro). Os dados obtidos foram utilizados para traçar a curva de crescimento e todo o volume do cultivo (3 L) foi centrifugado (3.500 rpm; 2 min; 25°C) pra a obtenção da biomassa algal, a qual foi conservada sob congelamento (-20°C). Em seguida, novos cultivos foram realizados em duplicata, com a finalidade de obter uma quantidade suficiente de microalgas para a extração para a extração de polissacarídeos (figura 2).

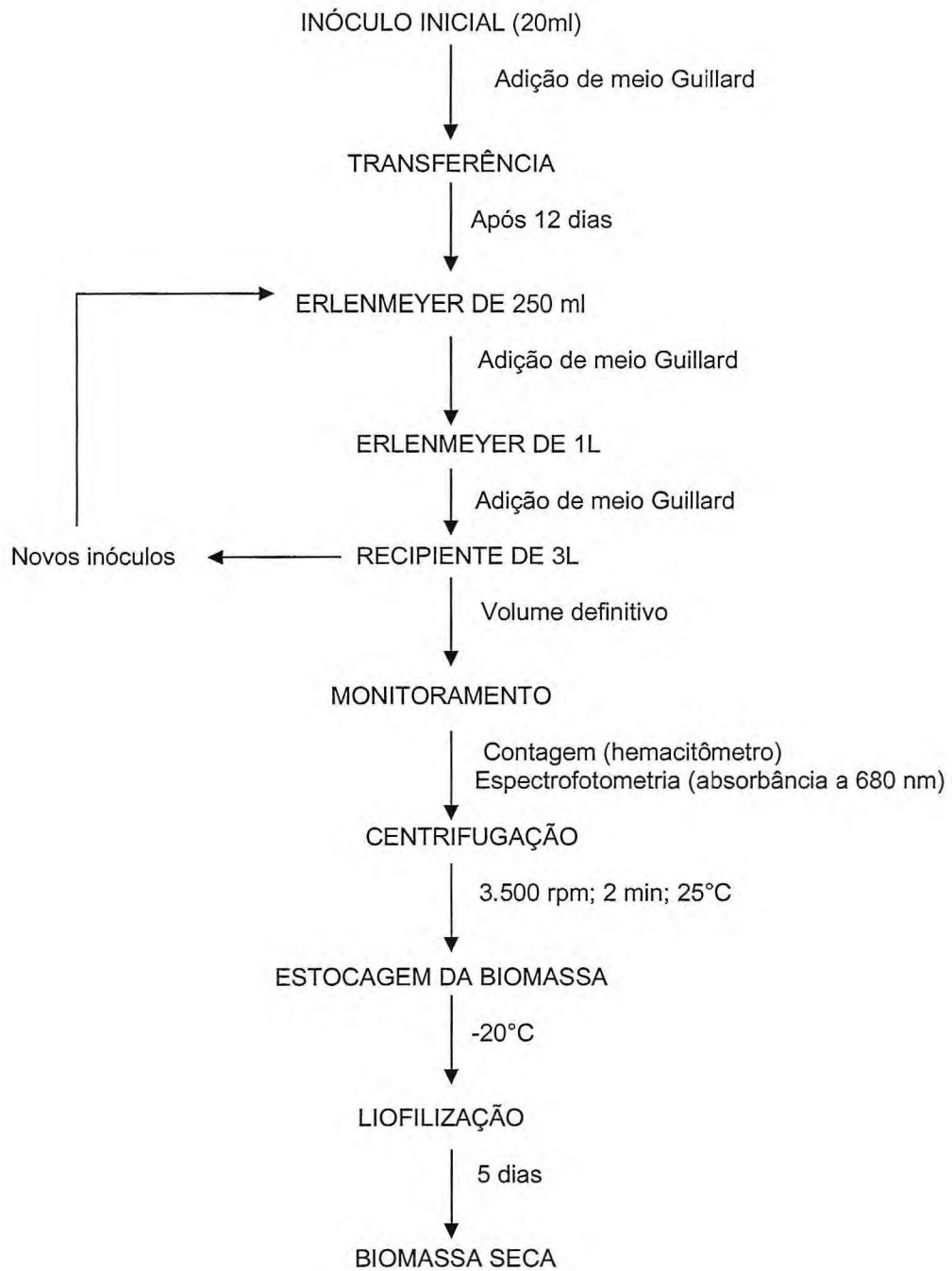


Figura 2. Fluxograma mostrando as etapas de cultivo até a obtenção da biomassa seca da microalga marinha *T. gracilis*

2.1.6. Obtenção das curvas de crescimento

Os valores de absorvância e seus respectivos valores de contagem de células foram, inicialmente, submetidos a uma análise de correlação linear utilizando o programa Excell. Em seguida, os dados foram utilizados para a obtenção da reta de regressão linear entre os valores de absorvância e o n° de células.mL⁻¹, sendo as curvas de crescimento expressas em valores de absorvância e em n° de células.mL⁻¹. Após a obtenção da equação de regressão linear, os cultivos foram monitorados apenas através de espectrofotometria, com o objetivo de estabelecer o momento ideal para a centrifugação e obtenção da biomassa algal.

2.2. Extração de polissacarídeos sulfatados

Esse procedimento foi realizado no Laboratório de Bioquímica Marinha do Departamento de Engenharia de Pesca/CCA/UFC. Inicialmente, a biomassa algal produzida e congelada foi lavada com água destilada e, posteriormente, liofilizada. A extração foi realizada a partir de 1,6g de biomassa seca, a qual foi hidratada com 80 mL de tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 5,0, contendo EDTA 5mM e cisteína 5mM. Em seguida foram adicionados 5,4mL de uma solução de papaína (30 mg/mL), sendo a mistura incubada a 60°C por 24 horas.

Após esse período, a mistura foi centrifugada (4.500 rpm; 4 min; 25°C), separando-se o resíduo do sobrenadante. Ao sobrenadante foram adicionados 5,4 mL de solução de CPC 10% (cloreto de cetilpiridínio) para precipitar os polissacarídeos sulfatados por 24 horas, à temperatura ambiente. Após a precipitação, a mistura foi novamente centrifugada, descartando-se o sobrenadante. O precipitado foi lavado com 160 mL de CPC 0,05% e, posteriormente, dissolvido em 56 mL de uma solução de NaCl 2M:etanol

(100:15;v:v). Em seguida, os polissacarídeos foram novamente precipitados com a adição de 96 mL de etanol absoluto, por 24 horas a 4°C. Finalmente, os polissacarídeos sulfatados foram lavados uma vez com 160 mL de etanol 80% e uma vez com 96 mL de etanol absoluto, sendo levados a estufa a 60°C para secagem, obtendo-se os polissacarídeos sulfatados totais (Figura 3).

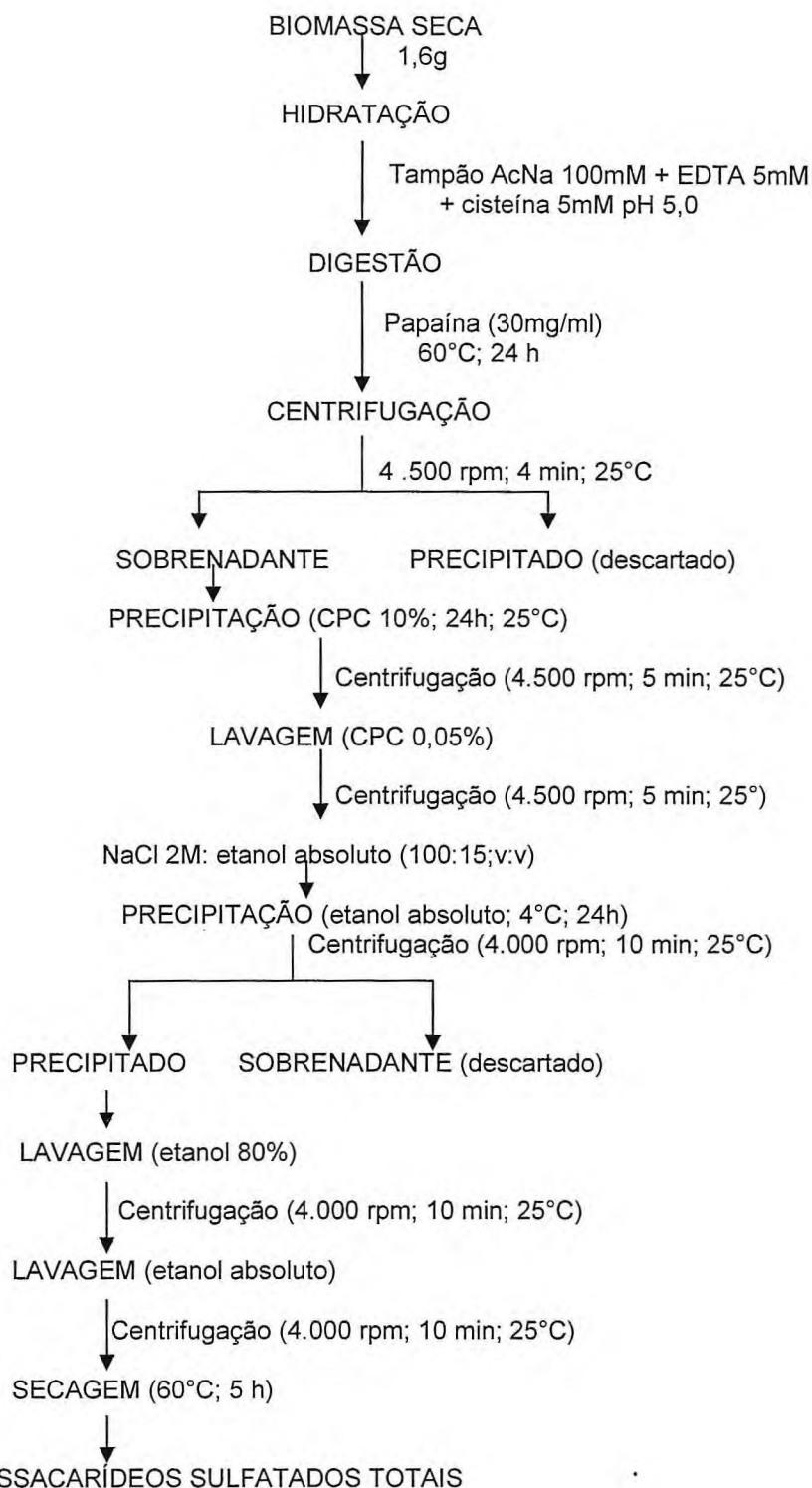


Figura 3. Fluxograma de extração dos polissacarídeos sulfatados da microalga *T. gracilis*.

2.3. Fracionamento dos polissacarídeos sulfatados em coluna de troca iônica.

O extrato bruto (EB) obtido na extração foi fracionado em coluna de DEAE-celulose (6,5cm x 1,5cm) acoplada a um coletor de frações, a fim de fracionar os polissacarídeos sulfatados totais. A coluna foi, inicialmente, equilibrada com tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 5,0 + cisteína 5mM e EDTA 5mM. Em seguida, foi aplicado no topo do gel, 3,0mL de uma solução de 3 mg/mL de EB e o fluxo da coluna ajustado para 60mL.h⁻¹. A eluição dos polissacarídeos sulfatados presentes no EB foi realizada passo a passo, utilizando soluções com diferentes concentrações de NaCl (0,50; 0,75; 1,0; 1,25; e 1,50 M), preparadas no mesmo próprio tampão de equilíbrio. Durante a eluição da coluna, foram coletadas frações de 1mL e a presença dos PS foi evidenciada através da reação metacromática. Para isso, 200µL de cada fração foram misturados com 1mL de azul-dimetil-dimetileno (DMB), que é um indicador específico para grupos sulfatados, mudando sua coloração na presença de polissacarídeos sulfatados. Todo o monitoramento foi determinado em espectrofotômetro no comprimento de onda de 525 nm.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Correlação entre os valores de Absorbância a 680 nm e n° de células.mL⁻¹

A intensidade da cor do cultivo, medida através de espectrofotometria aumenta proporcionalmente com a elevação do n° de células das microalgas. Um exemplo é a forte relação existente entre a absorbância e o número de tricomas.mL⁻¹, obtida em um cultivo da microalga cianofícea *Spirulina platensis*, a qual apresentou um coeficiente de correlação linear (r) de 0,90 para um nível de significância de 95% (Da SILVA, 2004). Desta forma, a partir dos valores de absorbância e respectivos valores de contagem de células de *T. gracilis*, foi realizada uma análise de correlação linear, sendo verificada, também, a existência de uma forte relação com o coeficiente de correlação “r” de 0,99 para um nível de significância de 95%. Desta forma, os dados de absorbância e contagem de células foram utilizados para a obtenção da reta de regressão linear, cuja equação resultante foi a seguinte $Y = - 46,7 + 2680,7x$, onde $Y = \text{N}^\circ \text{ de células. mL}^{-1} \cdot 10^{-4}$ e $X = \text{abs}_{680\text{nm}}$ (Figura 4).

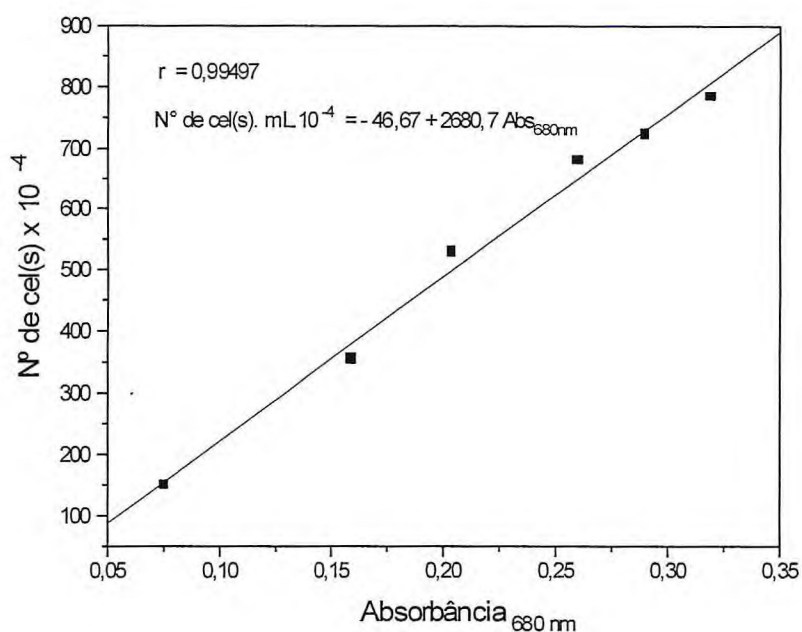


Figura 4. Retas de regressão linear obtida a partir do nº de células.mL⁻¹ de *T. gracilis* e os valores de absorbância da cultura a 680nm.

Soares (2005) e Oliveira (2007), trabalhando nas mesmas condições físico-químicas do presente trabalho, obtiveram correlações lineares de 0,93 em cultivo de *Haematococcus pluvialis* e de 0,99 em um cultivo de *Dunaliella* sp, respectivamente.

3.2. Curva de crescimento da microalga *T. gracilis* cultivada em meio Guilard f/2.

A partir da equação de regressão linear foi traçada a curva de crescimento da microalga *T. gracilis*, cultivada em meio Guilard f/2 (Figura 5). Analisando o perfil da curva de crescimento de *T. gracilis*, foi possível observar que, praticamente não houve uma fase de indução, com o cultivo entrando logo em crescimento exponencial. No entanto, esta fase se prolongou apenas até o 5º dia de cultivo. A partir deste momento, o cultivo apresentou um primeiro decréscimo na taxa de crescimento relativo, do 5º ao 13º dias e, logo em

seguida, um segundo decréscimo no crescimento relativo, a partir do 13º dia de cultivo. No 24º dia de cultivo, foi realizada a centrifugação das microalgas, pois a partir desse momento o cultivo poderia entrar, rapidamente, na fase estacionária, onde a taxa de mortalidade aumenta devido a uma maior competição por nutrientes e luz, prejudicando a qualidade da microalga.

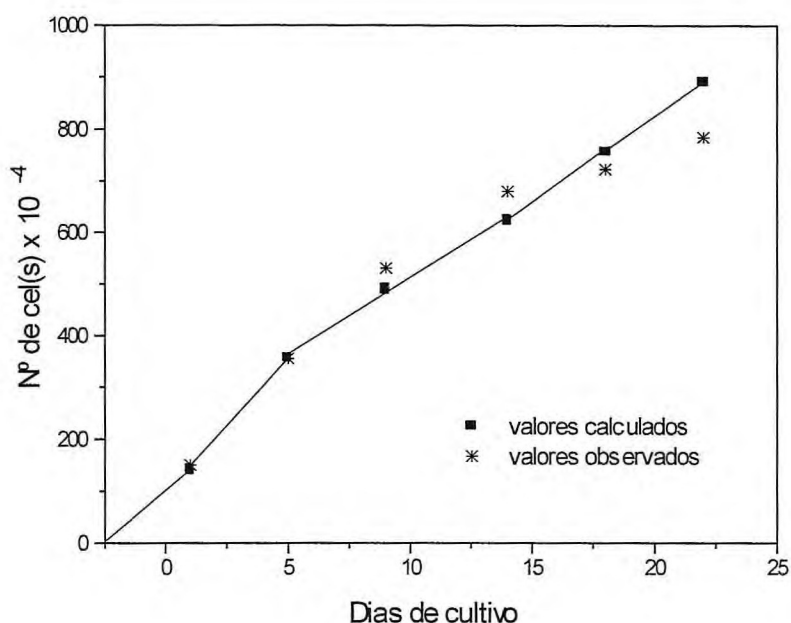


Figura 5. Curva de crescimento da microalga *T. gracilis*, expressa em nº de células $\text{mL}^{-1} \cdot 10^{-4}$ por dias de cultivo.

Em um cultivo do tipo “Batch” com a microalga cianofíceia *S. platensis* realizado nas mesmas condições físico-químicas do presente trabalho, foi possível observar uma nítida fase de indução, com diminuição da densidade celular, que durou do início até o 3º dia do cultivo. A partir deste ponto, o cultivo entrou em crescimento exponencial, o qual se prolongou até o 15º dia (Da SILVA, 2004). Soares (2005), também trabalhando nas mesmas condições, mostrou que o cultivo de *H. pluvialis* apresentou uma fase de indução até o 4º dia do início da cultura, sem mortalidade celular, seguidos de 10 dias de crescimento exponencial. Oliveira (2007) cultivou a microalga

Dunaliella sp, a qual apresentou fase de indução até o 3° dia de cultivo, seguido de um crescimento exponencial até o 5° dia. Neste caso, a cultura passou, ainda, por uma nítida fase de diminuição do crescimento relativo (até o 7° dia de cultivo) e, posteriormente, para a fase estacionária.

3.3. Curva de crescimento da microalga *T. gracilis*, expressa em valores de absorvância à 680 nm.

Os valores de absorvância também foram utilizados para a construção das curvas de crescimento de *T. gracilis*. Como podemos observar, é claramente possível identificar todas as fases discutidas anteriormente no item 3.2, devido aos elevados índices de correlação linear. Desta forma, o monitoramento de futuros cultivos, realizados nas mesmas condições físico-químicas, pode ser realizado de uma maneira simples e segura, através do acompanhamento dos valores de absorvância a 680 nm, facilitando a identificação do momento certo de adição de novo meio ou de finalização do cultivo para a obtenção da biomassa algal (Figura 6).

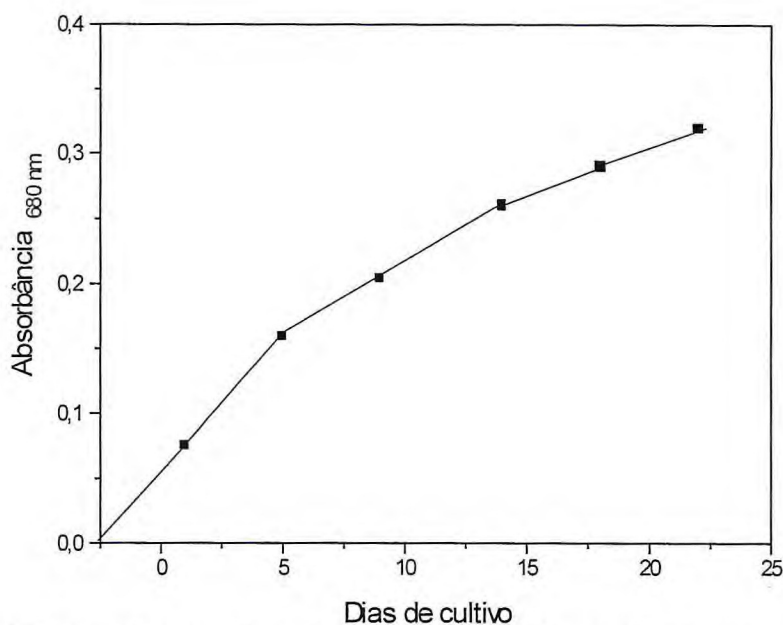


Figura 6: Curva de crescimento da microalga *T. gracilis*, expressa em valores de absorvância a 680 nm.

3.4. Extração de polissacarídeos sulfatados

Foram realizados 5 cultivos em garrafões de 3L e separada a biomassa úmida que, após ter sido centrifugada e liofilizada, resultou em aproximadamente 1,6 g de *T. gracilis* seca. O material foi utilizado para extração de polissacarídeos sulfatados (PS), sendo obtidos, ao final do processo, cerca de 83 mg de extrato bruto, o que corresponde a um rendimento de 5,2%. Um trabalho realizado com a microalga marinha *Dunaliella* sp, envolvendo a extração de PS, com o mesmo procedimento utilizado para *T. gracilis*, apresentou um rendimento de 2%. Já em trabalhos envolvendo a extração de PS de macroalgas marinhas, foram obtidos rendimentos bastante superiores, sendo de 21,4% para alga vermelha *Gracilaria córnea* (MELLO et al., 2002) e de 22,3% para alga marinha parda *Sargassum polycistum* (CHOTIGEAT et al., 2004). Rendimento mais significativo foi obtido a partir da extração de PS da alga marinha vermelhas *Solieria filiformis*, alcançando 46,8% (PONTES, 2005).

No entanto, o rendimento de 5,2%, obtido a partir da microalga *T. gracilis*, poderá ainda ser otimizado, submetendo o resíduo da primeira extração às

novas extrações, já que em alguns casos, o rendimento aumenta, como relatado por Torres (2005) quando foi possível extrair uma considerável quantitativa de PS em até quatro incubações utilizando o mesmo resíduo. Além disso, no caso das microalgas, a produção é toda realizada em laboratório o que permite a possibilidade de um elevado acúmulo de biomassa, enquanto que para as macroalgas marinhas, existe a dependência da coleta no ambiente natural.

3.5. Fracionamento dos polissacarídeos sulfatados em DEAE-celulose.

Após o fracionamento do extrato bruto contendo os polissacarídeos sulfatados, obtidos da microalga *T. gracilis* em coluna de troca iônica DEAE-celulose, foram obtidas 5 frações, sendo eluídas com 0,5; 0,75; 1,0; 1,25 e 1,5 M de NaCl. A fração que apresentou uma maior metacromasia foi a eluída com 0,5M de NaCl, seguida das frações eluídas com 0,75 e 1,0 M de NaCl (Figura 7) Após o fracionamento dos PS extraídos da microalga *Dunaliella* sp (OLIVEIRA, 2007), foram obtidas 4 frações, sendo a fração 3 (eluída com 1,0 M de NaCl) a mais metacromática. Desta forma, este é o segundo relato do fracionamento de PS de uma microalga na literatura. Até então apenas foram fracionados polissacarídeos sulfatados extraídos de macroalgas marinhas (FARIAS, 2005; PONTES, 2005; TORRES, 2005). O referido fracionamento foi realizado a partir de extrato obtido da primeira extração da biomassa algal, sendo necessárias novas extrações, da mesma biomassa inicial, para a realização de outros fracionamentos. Futuramente, as frações obtidas poderão ser concentradas por liofilização e submetidas a ensaios de atividade biológica.

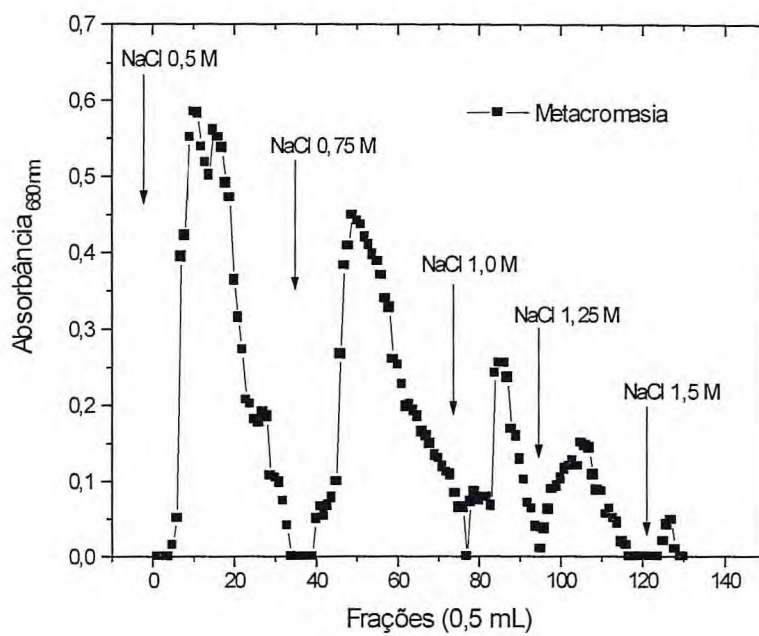


Figura 7: Fracionamento dos polissacarídeos sulfatados, extraídos da microalga *T. gracilis*, em coluna de troca iônica DEAE-celulose.

4. CONCLUSÃO

Pode se concluir após a realização do presente trabalho, que a microalga *T. gracilis* obteve um bom desenvolvimento em meio Guillard f/2 modificado, caracterizado pela ausência de uma fase de indução, um breve crescimento exponencial e uma fase de diminuição do crescimento relativo mais demorada. O estabelecimento de uma correlação entre os valores de absorvância a 680 nm e o número de células por mL desta espécie, possibilitou o acompanhamento do cultivo através de espectrofotometria. A microalga *T. gracilis* produziu polissacarídeos sulfatados, os quais apresentaram um rendimento de 5,2% a partir de 1,6g de biomassa seca. O fracionamento dos PS em DEAE-celulose resultou em 5 frações, sendo duas delas majoritária.

5. REFERENCIAIS BIBLIOGRÁFICAS

AINOUZ, I.L.; SAMPAIO, A.H. Screening of Brazilian marine algae for haemagglutinins. **Botanica Marina**, Berlin, v.34, n.3, p.211-214, May 1991.

ARAÚJO, D.; FEITOSA, W.; LOPES, P.; CARVALHO, R. A. P. L. F.; ALENCAR, R. B.; FONSECA, C.; ROCHA, J. P. Efeito do uso de imunoestimulante no desempenho do camarão marinho *Litopenaeus vannamei*, criado em viveiros . **Revista de Associação Brasileira de Criadores de Camarão**, Recife, v.7, n.1, p.41 – 51, 2005.

ÂNGULO, Y.; LOMONTE, B. Inhibitory effect of fuciodan on the activities of crotaline snake venom myotoxic phospholipases A(2). **Biochemical Pharmacology**, Oxford, v.66, n.10, p.1993-2000, Nov 2003.

AQUINO, R.S.; LANDEIRA-FERNANDEZ, A.M.; VALENTE, A.P.; ANDRADE, L.R.; MOURÃO, P.A.S. Occurrence of sulfated galactans in marine angiosperms. Evolutionary implications. **Glycobiology**, Cary, v.15, n.1, p.11-20, Jan 2005.

ARTHUR, C.K.; ISBISTER, J.P.; ASPERY, E.M. The heparin induced thrombosis-thrombocytopenia syndrome (HITTS): a review **Pathology**, Oxfordshire, v.17, n.1, p.82-86, 1985.

BENEMANN, J. R.; TILLET, D. M. ; WEISSMAN, J.C. Microalgae biotechnology. **Trends in biotechnology**, Amsterdam, v. s, p.47-53, 1987.

BICK, R.L.; FAREED, J. Current status of thrombosis: A multidisciplinary medical issue and major American health problem beyond the year 2000.

Clinical and Applied Thrombosis Hemostasis, Philadelphia, v.3, Suppl. 1, p. S1, 1997.

BOISSON-VIDAL, C.; HAROUN, F.; ELLOUALI, M.; BLONDIN, C.; FISHER, A.M.; DE AGOSTINE, A.; JOZEFONVICZ, J. Biological activities of polysaccharides from marine algae. **Drug of the Future**, Barcelona, v.20, n. 12, p.1237-1249, 1995.

BICUDO, M.; MENEZES, M. **Gêneros de algas continentais do Brasil** (Chave para identificação e descrição). 2° ed. RiMa, SP, 502 p. 2006

BURSON Jr. S.L.; FAHRENBACH, M.J.; FROMMHAGEN, B.A.; RICCARDI, R.A.; BROWN, J.A.; BROCKMAN, H.V.; LOWRY, E.L.R.; STOKSTAD, J. Isolation and purification of mactins, heparin-like anticoagulants from Mollusca. **Journal of American Chemical Society**. Washington v.78, n.22, p.5874-5878, 1956.

CAMPA-CÓRDOVA, A.I.; HERNANDEZ-SAAVEDRA, N.Y.; DE PHILIPPIS, R.; ASCENCIO, F. Generation of superoxide anion and SOD activity in haemocytes and muscle of American White shrimp (*Litopenaeus vannamei*) as a response to β -glucan and sulphated polysaccharide. **Fish & Shellfish Immunology**, London, v.12, n. 4, p. 353-366, Apr 2002.

CÁSSARO, C.M.F.; DIETRICH, C.P. Distribution of sulfated mucopolysaccharides in invertebrates. **Jornal of Biological Chemistry**. Bethesda, v. 252, n. 7, p. 2254-2261, 1977.

CHARGAFF E.; BANCROFT F.W.; STANLEY-BROWN, M. Studies on the chemistry of blood coagulation II. On the inhibition of blood clotting by substances of high molecular weight. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 115, p.15-161, 1936.

COLLIEC, S.; FISHER, A.M.; TAPON-BRETAUDIÈRE, J.; BOISSON, C.; DURANT, P.; JOZEFONVICZ, J. Anticoagulant properties of a fucoidan fraction. **Thrombosis Research**, Oxford, v. 64, n. 2, p.143-154, Oct 1991

COSTA,R.A.A.M.; KOENING, M.L.; FEITOSA, F. A. N. Influência de diversas concentrações de cloro nas populações fitoplânctônicas dos estuários do rio Botafogo (Itamaracá-PE). **Arquivo de Biologia Tecnologia**, v. 37, p. 877-888,1994.

DE PAUWN, N.; PERSONE, G. Microalgae for aquaculture. In: BOROWITZAKA,M.A.; BOROWITZAKA, L. J.(Ed) *Microalgal Biotechnology*. Sydney: Cambridge University Press, 1988. 477p. **Revista Ciências Agronomicas**, v.37, n.2, p.142-148. 2006

DA SILVA C. F. **Cultivo e extração de polissacarídeos sulfatados da microalga *Spirulina platensis***.19f. Monografia.(graduação). Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2004.

FARIAS, W.R.L.; **Estrutura e Atividades Anticoagulante e antitrombótica de Galactanas Sulfatadas da Alga Vermelha *Botryocladia occidentalis***. Tese de Doutorado apresentada ao Departamento de Bioquímica Médica da Universidade Federal do Rio de Janeiro. 102 pp, 2000.

FARIAS, W.R.L.; VALENTE, A, P.; PEREIRA, M S.; MOURÃO,P.A.S. Structure and Anticoagulant Activity of Sulfated Galactans. Isolation of a unique sulfated galactan from the red algae *Botryocladia occidentalis* and comparison of its anticoagulant action with that of sulfated galactans. **The journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.275.n38, p. 29299-29307, Sep 2000.

FARIAS, W.R.L.; REBOUÇAS, H.J.; TORRES, V.M.; RODRIGUES, J.A.G.; PONTES, G.C.; SILVA, F.H.O. Enhancement of growth in tilapia fingerlings (*Oreochromis niloticus*) by sulfated D-galactans extracted from marine algae. **Scientia Agricola**, 2004.

GOLDMAN, J.C. Outdoor algal mass cultures; II. Photosynthetic yield limitations. **Algae Biomass**, [s.l.], v.11.p.119-135, 1980.

HAYASHI, K.; HAYASHI, T.; KOJIMA, I. A natural sulfated polysaccharide, calcium spirulam, isolated from *Spirulina platensis*: *in vitro* and *ex vivo* evaluation of anti-herpes simplex virus and anti-human immunodeficiency virus activities. **Aids Research and Human Retroviruses**, New York, v. 12, n.15, pp. 1463-1471, Oct 1996.

HAWKINS, W.W.; LEONARD, V.G. Antipeptic and antitrombic properties of carrageenin. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, ST Louis, v. 60, n.4, p. 641-647, 1962.

HOEK, C. VANDEN; MANN, D. G. e JAHNS, H. M. Algae: an introduction to phycology, Cambridge University Press, p.48,62,91,513 – 527, 1995.

HUHEIHEL M.; ARAD S. Effect of Porphyridium sp. Polysaccharide on malignant cell transformation by moloney murine sarcoma virus. **Anticancer Research**, Amsterdam, v.21, n.3b, p.2073 – 2078, May – Jun 2001.

HUHEIHEL, M; ISHANU V; TAL J; ARAD S. Antiviral effect of red microalgal polysaccharides on herpes simplex and varicella zoster viruses. **Journal of Applied Phycology**, Dordrecht, v.13, n.2, p.127-134, Apr 2001

HUHEIHEL M; ISHANU V; TAL J; ARAD S. Activity of Porphyridium sp simples virusis in vitro and in vivo. **Jornal of Biochmical And Biophycal Methods**, v.50, n.2-3,p.189-200, Jan 2002.

MATHEWS. M.B. Polyanionic proteoglycans. IN: Connective Tissue: Macromolecular Structure and Evolution. KLEINZELLER; SPRINGER, G.F.; WITMANN, H.G. eds. Springer-Verlaq, Berlim, pp. 93-125, 1975

KLEIN, V.L.M., GONZALEZ, A. A. N. **Cultivo da microalga Tetraselmis chuii**. Prings em diferentes meios de cultura. *Ciência Agrômica*, Fortaleza, v.24, p.91-100, 1983.

KOENING, M. L.; LACERDA, S. R.; PASSAVANTE, J. Z. O. Cultivo em laboratório de *Tetraselmis chuii* e *Tetraselmis tetrathele* (*Chlorophyceae*) com fertilizantes orgânicos, **Arquivo de Biologia Tecnologia**, v.33, p.91-103, 1990^a.

MATSUBARA, K.; MATSUURA, Y.; BACIC, A.; LIAO, M.L.; HORI, K.; MIYAZAWA, K. Anticoagulant proprties of a sulfated gaacta preparation from a marine green alga, *Codium cylindricum*. **Internacional Journal of Biological Macromolecules**, v. 28,n. 5, p. 395-399, Jun 2001.

NISHINO, T.; NAGUMO, T. Anticoagulant and antithrombin activities of oversulfated fucans. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 229, n. 2, p. 335-362, May 1992.

NISHINO, T.; NAGUMO, T.; KIYOHARA, H.; YAMADA, H. Studies on polysaccharides from *Ecklonia kurome*. 2. Structural characterization of a new anticoagulant fucan sulfated from the brown seaweed *Ecklonia kurome*. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 211, n. 1, p. 77-90, Apr 1991.

OLIVEIRA, E. C. **Panorama da Aqüicultura**, maio, junho, 24, 1997.

OLIVEIRA, M. A. C. **Cultivo da microalga marinha *Dunaliella* sp, em laboratório. Extração e purificação de polissacarídeos sulfatados.** 25f. Monografia. (Graduação) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2007.

PAINTER, T. J. **The polysaccarides**. New York : Academic Press, v.2, p.195, 1983.

PONTES, G.C. **Extração, fracionamento, purificação e atividade biológica dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha vermelha *Solieria filiformis* (Solieriaceae, Rhodophyta).** 30f. Monografia. (Graduação) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza ,2005.

PAVÃO, M.S.G.; AIELLO, K.R.M.; WERNECK, C.C.; SILVA, L.C.F.; VALENTE, A.P.; MULLOY, B.; COLWELL, N.S.; TOLLEFSEN, D.M.; MOURÃO, P.A.S. Highly sulfated dermatan sulfates from ascidins. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 273, n.43, p. 27848-27857, Oct 1998.

RANG, H.P.; DALE, M.M; RITTER, J.M. **Farmacologia**. Quarta edição, 703p, 2001.

RICHMOND, A. Microalgae of economic potential. In: **Handbook of microalgae mass culture**. Ed CRS Florida. p.199-243 (1986)

SOARES.N.N. **cultivo e extração de picmentos das microalgas *Spirulina platensis* e *Haematococcus pluviatilis*.** Dissertação de mestrado apresentada ao programa de pós graduação em engenharia de pesca. Universidade Federal do Ceará. 58pp, 2005

THOMAS, D.P.; MERTON, R.E.; GRAY, E.; BARROWCLIFFE, T.W. The relative antithrombotic effectiveness of heparin, a low-molecular weight heparin and a pentasaccharide fragment in an animal model. **Thrombosis and Haemostasis**, Stuttgart, v. 61, n. 2, p. 204-207, Apr 1989.

TORRES, V. M. **Extração, purificação e atividade biológica de polissacarídeos sulfatados da alga marinha vermelha *Champia feldanii*** 28f. Monografia. (Graduação) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2005

VONSHAK, A. *Spirulina: growth, physiology and biochemistry*. In: ***Spirulina platensis (Arthrospira): Physiology and Biotechnology***. VONSHAK, A. (ed). London: Taylor & Francis. 254p. 1997. pp.43-66.

WIKIPÉDIA, A encyclopedia livre (disponível em: www.ibvf.cartuja.csic.es/cultivos/micro-n-z.htm). 27 de junho de 2007

ZHOU, G.; SUN, Y.; XIN, H.; ZHANG, Y.; LI, Z.; XU, Z. In vivo antitumor and immunomodulation activities of different molecular weight lambda-carrageenans from *Chondrus ocellatus*. **Pharmacological Research**, London, v. 50, n. 1, p. 47-53, Jul 2004.

ANEXO

Preparação do Meio de cultura – Guillard F/2

Solução 1: Nitrato de sódio

- Nitrato de sódio: 75g
- Cloreto de amônio: 5g
- Água destilada: 1L

Solução 2: Fosfato de sódio

- Fosfato de sódio: 5g
- Água destilada: 1L

Solução 3: Vitamina

- Cetoneurim 500mg – 1 ampola em 50mL de água destilada

Solução 4: Metais Traços

Primeiro passo: preparar as seguintes soluções.

1. Sulfato de cobre: 0,98g em 100 mL de água destilada.
2. Sulfato de zinco: 2,2g em 100 mL de água destilada.
3. Cloreto e cobalto: 1,0g em 100 mL de água destilada.
4. Cloreto de magnésio: 1,0g em 100 mL de água destilada.
5. Molibidato de sódio: 0,63g em 100 mL de água destilada.

Segundo passo: preparar a solução.

- Cloreto férrico: 3,15g
- EDTA: 4,6g
- Água destilada: 900 mL

Em seguida adicionar 1mL de cada solução preparada no primeiro passo na solução preparada do segundo passo, e completar até 1L.