



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

**Variação Sazonal de Componentes da Alga Marinha Cultivada *Gracilaria birdiae*
(Plastino e Oliveira)**

Juliana Gomes Pereira

**Fortaleza, CE
Fevereiro de 2009**

Juliana Gomes Pereira

**Varição Sazonal de Componentes da Alga Marinha Cultivada *Gracilaria birdiae*
(Plastino e Oliveira): Estrutura Química do Polissacarídeo**

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-graduação em Bioquímica, da Universidade Federal do Ceará como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Lúcia Ponte Freitas

**Fortaleza, CE
Fevereiro de 2009**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências e Tecnologia

P492v

Pereira, Juliana Gomes.

Varição sazonal dos componentes da alga marinha vermelha *Gracilaria birdiae* (Plastino & Oliveira): estrutura química do polissacarídeo. / Jualiana Gomes Pereira. – 2009.
93f. : il. color., enc. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Departamento de Bioquímica Biologia Molecular, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2009.

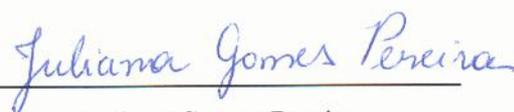
Área de Concentração: Bioquímica Vegetal.

Orientação: Profa. Dra. Ana Lúcia Ponte Freitas.

1. Alga vermelha – composição. 2. Lectinas. 3. Polissacarídeos. I. Título.

CDD 574.192

Esta dissertação foi desenvolvida como parte dos pré-requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica, outorgado pela Universidade Federal do Ceará, e encontra-se a disposição dos interessados na Biblioteca Central da referida Universidade.



Juliana Gomes Pereira



Prof. Dra. Ana Lucia Ponte Freitas
Orientadora da Dissertação
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular
Universidade Federal do Ceará

Prof. Dra. Regina Célia Monteiro de Paula
Co-Orientadora
Departamento de Química Orgânica e Inorgânica
Universidade Federal do Ceará

Prof. Dr. Dárlcio Inácio Alves Teixeira
Conselheiro
Centro de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Pernambuco

Á Deus, por me proporcionar a vida, a saúde e a tranquilidade para superar os obstáculos impostos pela vida, dedico.

AGRADECIMENTOS

À professora. Dra. Ana Lúcia Ponte Freitas que proporcionou minha iniciação científica e acompanhou meus passos desde o início, não apenas com valiosos conselhos acadêmicos, mas também, com orientações para a vida, sempre enfatizando o lado espiritual e humano do profissional.

Professor Dr. Dárlcio Inácio Teixeira pela contribuição com as algas durante todo o período de desenvolvimento dos experimentos deste trabalho de dissertação e pela valiosa presença na banca de avaliação.

À Professora. Dra. Regina Célia Monteiro de Paula por proporcionar o desenvolvimento de caracterização química no Laboratório de Polímeros da Universidade Federal do Ceará e pela disponibilidade e conselhos imprescindíveis a esse trabalho.

Ao Prof. Edilberto Rocha Silveira por disponibilizar o Centro Nordestino de Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear (CENAUREMN) para a realização dos experimentos de RMN

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará pela colaboração na minha formação acadêmica durante o curso de mestrado.

Aos meus pais Aldi e Ana Maria, por terem sempre se esforçado para me proporcionar uma boa formação e pelo exemplo de honestidade, perseverança e força . Obrigado pela segurança e a certeza de que nunca caminho sozinha.

Aos meus amigos do Laboratório de Algas Marinhas, Luciano, Jacilane, Victor, Thaís, Daniel, Lídia, Cíntia e em especial ao meu amigo Dráulio pelo companheirismo e conselhos desde o início das minhas pesquisas no laboratório.

Às Profas. Jeany, Pablina, e Dulcilene do Laboratório de Polímeros da Universidade Federal do Ceará pela inestimável ajuda nos experimentos de caracterização química.

Aos alunos que fazem parte do Laboratório de Polímeros da Universidade Federal do Ceará pela contribuição na realização dos experimentos de caracterização química.

Aos meus colegas de mestrado que me acompanharam durante essa jornada, especialmente ao Yuri, pelo companheirismo e amizade.

Às minhas amigas de pós-graduação Tuana, Wal, Patrícia e em especial às amigas Sandra e Denise pela convivência diária no departamento, pela amizade valiosa, pelos preciosos conselhos e pelo incentivo sempre. Espero que nossos momentos de “fortalecer a amizade” se multipliquem.

A todos os funcionários do Departamento de Bioquímica pela colaboração e convivência diária durante o curso de mestrado.

INSTITUIÇÕES COLABORADORAS

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará, sede do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e onde este trabalho foi executado.

Departamento de Química Orgânica e Inorgânica do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará cujo foi realizado grande parte do estudo da estrutura química do polissacarídeo.

Centro Nordestino de Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear (CENAUREMN) onde foram realizados parte do estudo da estrutura química do polissacarídeo através de experimentos de RMN.

Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP) pelo apoio financeiro por meio da bolsa e auxílios imprescindíveis à realização desse trabalho.

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelos convênios com o curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará.

Instituto Terramar e Associação de Produtores de Algas de Flecheiras e Guajirú pelo parceria no fornecimento da alga marinha *Gracilaria birdiae*, utilizada como objeto de estudo deste trabalho.

RESUMO

Algas marinhas são seres classificados no reino protista, predominantemente aquáticos e com grande capacidade adaptativa. Encontradas em todas as regiões do planeta, as algas desempenham importante papel ecológico e econômico, representando um grande potencial de biorrecursos. A alga marinha vermelha *Gracilaria birdiae*, coletada durante doze meses, foi submetida à extração aquosa a 100 °C de polissacarídeos e apresentou rendimento superior a 50 %, com exceção nos meses de fevereiro, setembro e novembro de 2007 (49,5%, 41,8% e 49,4% respectivamente). O teor de sulfato foi obtido por microanálise e não variou significativamente ao longo dos meses analisados, apresentando valor médio de 1,35%. O grau de sulfatação médio encontrado foi de 0,15. O conteúdo protéico nas amostras também não apresentou variação considerável, tendo média de 0,5%, entretanto, no mês de abril o conteúdo protéico aumentou cerca de 3 vezes do valor médio encontrado. As doze amostras foram caracterizadas quimicamente por cromatografia de permeação em gel (GPC), espectroscopia na região do infravermelho (FT-IR) e por ressonância magnética nuclear (RMN). Os cromatogramas de GPC das amostras apresentaram semelhanças e características típicas de polissacarídeos das algas vermelhas. Em geral, foram observados um pico principal, em aproximadamente 7,58 mL e um ombro em aproximadamente 9,2 mL de volume de eluição, com exceção dos meses de agosto, outubro e novembro de 2007, que apresentaram cromatogramas com pico principal em aproximadamente 8,27 mL de volume de eluição, detectados pelo índice de refração. Os polissacarídeos investigados apresentaram altas massas molares, variando de $0,11 \times 10^4$ a $8,51 \times 10^5$ g/mol. Os espectros de infravermelho das doze amostras de polissacarídeos apresentaram perfis semelhantes, com as bandas características de agarocolóides, mais especificamente, do tipo agarana. Espectros de RMN foram empregados para a caracterização estrutural das amostras ao longo do ano e, revelaram que a estrutura do polissacarídeo é composta por segmentos de (1→3)-β-D-galactopiranosil ligada a (1→4)-α-L-anidrogactopiranosil. O estudo da variação sazonal da composição centesimal, em geral, não apresentou variação acentuada. Com relação à quantidade de proteínas solúveis e a atividade hemaglutinante no extrato protéico, o estudo da variação sazonal revelou uma pequena variação no teor de proteínas solúveis, com valor máximo (0,94 mgP/mL) em novembro/06 e mínimo no mês de dezembro/06 (0,39 mgP/mL). Em geral, a atividade hemaglutinante observada em *Gracilaria birdiae* é fraca, porém, ela esteve presente em concentrações variáveis ao longo de todo o período estudado, com exceção no mês de dezembro/06, independente do conteúdo protéico total e solúvel encontrado.

ABSTRACT

Seaweeds are classified in the kingdom protist, predominantly aquatic and with great adaptive capacity. Found in all regions of the planet, algae play an important role ecological and economic, representing a great potential for bioresources. The red seaweed *Gracilaria birdiae*, collected during twelve months, was submitted to aqueous extraction of polysaccharides at 100°C, showed yield exceeding 50 %, except in February, September and November 2007 (49,5%, 41,8% and 49,4% respectively). The sulfate content was obtained by microanalysis and it not vary significantly over the months examined averaging 1,35%. The sulfate degree was 0.15. The protein content in the samples also showed no considerable variation, with average of 0,5%, however in April, the protein content increased about 3 times the average found. The twelve samples were chemically characterized by Gel Permeation Chromatography (GPC), Infrared (FT-IR) and Nuclear Magnetic Resonance (NMR) spectroscopy. The GPC chromatograms of the samples showed similarity and typical characteristics of polysaccharides from red algae. In general, we observed a main peak, at approximately 9,2 mL volume of elution, with the exception of August, October and November 2007, which showed chromatograms with main peak at approximately 8,7 mL volume of elution, detected by a refractive index. The polysaccharides investigated showed high molecular weight, ranging from 0.11×10^4 and 8.51×10^5 g/mol. The infrared spectra of the twelve samples of polysaccharides presented similar profiles, with bands characteristics of agarocolloids, more specifically agaran-like, with evidence of protein. NMR were employed to the structural characterization of the samples throughout the year and revealed that the structure of polysaccharides is composed by (1→3)-β-D-galactopyranosyl linkage to (1→4)-α-L-anhydrogalactopyranosyl segments. The study of seasonal variation in proximate composition, in general, showed no marked variation. Regarding the amount of soluble protein in the crude extract, the study of seasonal variation showed a small variation in the content of soluble protein, with maximum value (0,94 mgP/mL) in November/06 and minimum (0,39 mgP/mL) in December/06. The hemagglutinating activity during the period of one year, except in December/06.

LISTA DE FIGURAS

	Página
FIGURA 01: Representação esquemática estrutural das galactanas de algas vermelhas.....	28
FIGURA 02: Estrutura básica repetitiva de agaranas, com unidades D- e L- alternantes.....	30
FIGURA 03: Estruturas extremas encontradas em agaranas: Agarose (I); Precursor da Agarose (II).....	31
FIGURA 04: Padrão estrutural do dissacarídeo presente nas carragenanas.....	32
FIGURA 05: Representação esquemática estrutural das galactanas DL- híbridas de algas vermelhas.....	35
FIGURA 06: (I) Foto de <i>G. birdiae</i> ; (II) Modelo esquemático do cultivo de algas marinhas em Flecheiras.....	38
FIGURA 07: Fluxograma de extração do polissacarídeo da alga vermelha <i>Gracilaria birdiae</i>	46
FIGURA 08: Variação em porcentagem de matéria seca de <i>G. birdiae</i>	53
FIGURA 09: Análise centesimal da farinha da alga <i>G. birdiae</i> (em porcentagem de matéria seca).....	53
FIGURA 10: Variação nos teores de lipídeo, fibra bruta, proteína e resíduo mineral de <i>G. birdiae</i>	54
FIGURA 11: Variação no conteúdo de proteína e carboidrato presente na alga <i>G. birdiae</i>	54
FIGURA 12: Rendimento dos polissacarídeos de <i>G. birdiae</i> extraídos em diferentes períodos.....	57

FIGURA 13: Cromatograma de Permeação em Gel (GPC) do polissacarídeo de <i>G. birdiae</i> extraído a 100°C. (a) <i>G. birdiae</i> dez/06, (b) <i>G. birdiae</i> jan/07, (c) <i>G. birdiae</i> fev/07, (d) <i>G. birdiae</i> mar/07, (e) <i>G. birdiae</i> abr/07, (f) <i>G. birdiae</i> mai/07, (g) <i>G. birdiae</i> jun/07, (h) <i>G. birdiae</i> jul/07, (i) <i>G. birdiae</i> ago/07, (j) <i>G. birdiae</i> set/07, (l) <i>G. birdiae</i> out/07, (m) <i>G. birdiae</i> nov/07.....	62
FIGURA 14: Espectro de RMN ¹ H do polissacarídeo de <i>G. birdiae</i> : (a) Janeiro/07, (b) Abril/07, (c) Agosto/07.....	70
FIGURA 15: Espectro de RMN ¹ C do polissacarídeo de <i>G. birdiae</i> : (a) Janeiro/07, (b) Abril/07, (c) Agosto/07.....	71
FIGURA 16: Espectro na região de infravermelho do polissacarídeo extraído a 100°C de <i>G. birdiae</i> . (a) <i>G. birdiae</i> dez/06, (b) <i>G. birdiae</i> jan/07, (c) <i>G. birdiae</i> fev/07, (d) <i>G. birdiae</i> mar/07, (e) <i>G. birdiae</i> abr/07, (f) <i>G. birdiae</i> mai/07, (g) <i>G. birdiae</i> jun/07, (h) <i>G. birdiae</i> jul/07, (i) <i>G. birdiae</i> ago/07, (j) <i>G. birdiae</i> set/07, (l) <i>G. birdiae</i> out/07, (m) <i>G. birdiae</i> nov/07.....	78

LISTA DE TABELAS

	Página
TABELA 1: Codificação dos resíduos de açúcar e grupos substituintes presentes nas galactanas (KNUTSEN <i>et al</i> , 1994).	29
TABELA 2: Nomenclatura alternativa para as carragenanas proposta por Knutsen <i>et al</i> (1994), modificada por Cauduro <i>et al</i> . (2000).....	33
TABELA 3: Análise centesimal da farinha da alga <i>Gracilaria birdiae</i>	51
TABELA 4: Análise química de diferentes espécies de algas relatadas por vários autores.....	52
TABELA 5: Dosagem de proteínas (Lowry) e atividade hemaglutinante específica do extrato protéico de <i>G. birdiae</i>	56
TABELA 6: Rendimento e Dosagem de Carboidratos Solúveis do Polissacarídeo de <i>Gracilaria birdiae</i>	58
TABELA 7: Rendimento de ágar de algumas espécies de <i>Gracilaria</i>	59
TABELA 8: Microanálise do polissacarídeo de <i>Gracilaria birdiae</i>	60
TABELA 9: Comparação com ágar de diferentes espécies de <i>Gracilaria</i>	60
TABELA 10: Massas molares de cada pico das extrações de polissacarídeos de <i>G. birdiae</i> a 100° C.....	68
TABELA 11: Razão molar do resíduo LA e L-6S de <i>G. birdiae</i>	69
TABELA 12: Composição estimada das unidades presentes nos polissacarídeos extraídos a quente de <i>G. birdiae</i>	71
TABELA 13: Assinalamentos de referência do espectro de RMN de ¹³ C.....	73

TABELA 14: Assinalamentos de RMN de ^1H e ^{13}C para resíduos de Gb-f (fração a frio).....	74
TABELA 15: Assinalamentos de RMN de ^1H e ^{13}C para resíduos de G.b. jan/07.....	74
TABELA 16: Assinalamentos de RMN de ^1H e ^{13}C para resíduos de G.b. abr/07.....	75
TABELA 17: Assinalamentos de RMN de ^1H e ^{13}C para resíduos de G.b. ago/07.....	75
TABELA 18: Atribuições no espectro do infravermelho para polissacarídeos de algas marinhas.....	77

ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES

COSY	Correlated Spectroscopy
D ₂ O	Água deuterada
DMSO	Dimetil Sulfóxido
GS	Degree sulfate (Grau de sulfatação)
EtOH	Etanol
FT-IR	Fourier Transformed – Infrared (Infravermelho com transformação de Fourier)
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Correlation Spectroscopy
G.b.	Polissacarídeo de <i>G. birdiae</i> extraído a quente (100° C)
GPC	Cromatografia de Permeação em Gel
NaCl	Cloreto de Sódio
NaOH	Hidróxido de Sódio
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
NaSO ₃	Sulfato de Sódio
NaNO ₃	Nitrato de Sódio

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABELAS	xii
ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES	xiv
RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
	Página
1. Introdução.....	18
1.1. Algas Marinhas.....	18
1.2. Importância Econômica das Algas.....	19
1.3. Algas Vermelhas.....	22
1.4. Lectinas.....	24
1.5. Lectinas de Algas Marinhas	26
1.6. Polissacarídeos de Algas Marinhas.....	26
1.7. Galactanas Sulfatadas de Rhodophytas.....	27
1.7.1. Agaranas.....	30
1.7.2. Carragenanas.....	32
1.7.3. Híbrido D L.....	35
1.8. Algas Marinhas Cultivadas no Ceará.....	36
2. Objetivos.....	39
2.1. Objetivos Gerais.....	39
2.2. Objetivos Específicos.....	39
3. Material e Métodos.....	40

3.1. Materiais.....	40
3.1.1. Algas Marinhas.....	40
3.1.2. Células Sanguíneas.....	40
3.1.3. Reagentes.....	40
3.2. Métodos.....	40
3.2.1. Tratamento da Alga Marinha.....	40
3.2.2. Análise Elementar da Alga Marinha Vermelha <i>Gracilaria birdiae</i>	41
3.2.2.1. Umidade.....	41
3.2.2.2. Proteínas.....	41
3.2.2.3. Cinzas.....	42
3.2.2.4. Lipídeos.....	42
3.2.2.5. Carboidratos Totais.....	42
3.2.2.6. Fibra Bruta.....	43
3.3. Preparação do Extrato Total.....	43
3.4. Determinação de Proteínas.....	44
3.5. Determinação de Carboidratos Solúveis.....	44
3.6. Determinação da Atividade Hemaglutinante.....	44
3.7. Extração dos Polissacarídeos.....	45
3.8. Métodos Analíticos para Análise dos Polissacarídeos.....	47
3.8.1. Determinação do Rendimento do Polissacarídeo Extraído de <i>G. birdiae</i>	47
3.8.2. Dosagem de Proteína.....	47
3.8.3. Dosagem de Sulfato.....	47
3.8.4. Cromatografia de Permeação em Gel (GPC).....	47
3.8.5. Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho (FT-IR).....	48
3.8.6. Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	48

4. Resultados e Discussão.....	49
4.1. Composição Elementar da Farinha da Alga Marinha <i>G. birdiae</i>	49
4.2. Atividade Hemaglutinante Específica do Extrato Protéico de <i>G. birdiae</i>	55
4.3. Variação Sazonal do Polissacarídeo de <i>G. birdiae</i>	57
4.3.1. Rendimento do Polissacarídeo Extraído de <i>G. birdiae</i>	57
4.3.2. Microanálise Elementar do Polissacarídeo Extraído de <i>G. birdiae</i>	59
4.4. Cromatografia de Permeação em Gel (GPC).....	61
4.5. Espectro de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ¹³ C e ¹ H.....	69
4.6. Espectro de Absorção na Região do Infravermelho.....	76
5. Conclusão.....	84
6. Referências Bibliográficas.....	85

1. Introdução

1.1. Algas Marinhas

O termo algas, *latu sensu*, compreende um agrupamento artificial de organismos que têm muito pouca coisa em comum a não ser o fato de serem predominantemente aquáticos, fotossintetizantes, contém clorofila a e são desprovidos de um tecido constituído de células estéreis envolvendo os órgãos de reprodução e de um sistema diferenciado para condução de água, circulação de fluidos, sais minerais e outros nutrientes. Por esta razão são grupos polifiléticos e não constituem uma categoria taxonômica definida, mas sim um amontoado de categorias díspares, tão diversas que chegam a ser classificadas em dois ou três reinos diferentes, tradicionalmente conhecidos como Monera, Protista e Plantae (BATTACHARYA, MEDLIN, 1998; SOGIN, 1989). Atualmente a classificação mais bem aceita, posiciona todas as algas no reino Protista (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2001).

Em muitos ecossistemas aquáticos, as algas atuam como produtores primários na cadeia alimentar, sintetizando material orgânico a partir de dióxido de carbono e água e também o oxigênio necessário para o metabolismo dos organismos consumidores (LEE, 1997). As algas calcárias são elementos importantes na formação e manutenção dos recifes de coral, ecossistemas com biodiversidade comparável à das florestas tropicais (BROWN; OGDEN, 1993; REAKA-KUDLA, 1997; STENECK; TESTA, 1997). É possível ainda que as algas calcárias tenham um importante papel no ciclo global do carbono, tendo abundância e diversidade provável influência sobre o clima do planeta (OLIVEIRA, 1996).

Quanto à morfologia podem ser unicelulares, coloniais, filamentosas, sifonáceas até complexos talos parenquimatosos das grandes algas (OGAWA; KOIKE, 1987).

Embora pertencendo a vários grupos taxonômicos, as algas podem ser grosseiramente separadas pelo tamanho em dois grandes grupos: as algas microscópicas (microalgas) e as algas macroscópicas (macroalgas), com dimensões que variam de alguns milímetros a algumas dezenas de metros (PANORAMA DE AQUICULTURA, maio/junho, 1997). Tal variedade de organismos encontra-se distribuídas por diferentes habitats: oceanos, corpos de águas doces, solos rochas e mesmo, superfície de vegetais.

As algas macroscópicas, do ponto de vista botânico, são classificadas de acordo com a estrutura física, função e ciclo reprodutivo em: **Chlorophyta** (algas verdes), **Phaeophyta** (algas pardas) e **Rhodophyta** (algas vermelhas) (RAVEN, 1996).

Segundo ROUND (1983), evolutivamente, as algas marinhas por apresentarem um histórico fóssil muito extenso são consideradas como um grupo a partir do qual todos os outros vegetais fotossintetizantes mais complexos, Criptógamos e, mais recentemente, Fanerógamas, se originaram. Apesar da sua variedade nos aspectos morfológicos, citológicos e reprodutivos, seus mecanismos básicos e vias metabólicas parecem ser similares aos demais vegetais.

Reconhecidamente, as algas marinhas representam um dos maiores biorecursos, existindo aproximadamente 150.000 espécies, dentre as quais mais de 30.000 se encontram taxonomicamente classificadas (HARVEY, 1988).

1.2. Importância Econômica das Algas

O valor das algas marinhas para o ambiente marinho é igualado apenas ao seu valor para a sociedade, pelo fato de elas oferecerem um amplo espectro de produtos e benefícios, com aplicações na nutrição, fertilização, cosmética, farmacologia, processamento de alimentos e biotecnologia (MORANO, 1991).

Em virtude da persistência e toxicidade ambiental da maioria dos pesticidas sintéticos, vem sendo observado um maior interesse por compostos naturais nas aplicações agroquímicas. As algas marinhas, além de reguladoras do crescimento de plantas, são também utilizadas para aumentar o rendimento da colheita, reduzir a perda de frutos armazenados, melhorar a absorção dos nutrientes e tornar saudável a pastagem do gado através de sua aplicação no tratamento do solo (HARVEY, 1988).

Povos de várias partes do mundo, especialmente no Extremo Oriente, comem tanto algas pardas quanto vermelhas. Kelps (kombu) são regularmente consumidos na China e no Japão. Algumas vezes são cultivadas, mas são, sobretudo colhidos de populações naturais. Porphyra (nori), uma alga vermelha, é consumida por muitos habitantes do Pacífico Norte e tem sido cultivada há séculos no Japão, Coréia e China (RAVEN, 2001). Além de seu uso como alimento, as algas têm sido utilizadas como complemento de rações, adubos sólidos ou líquidos e como fontes de produtos químicos diversos, dentre os quais se destacam certas mucilagens conhecidas como

ficocolóides, ou colóides de algas. Estas últimas substâncias são classificadas em três grupos básicos em função de sua estrutura química e propriedades reológicas: os ágares (ágar-ágar) ou agaranas, as carragenanas, e os algenatos.

No Brasil, a região costeira compreendida entre os estados do Ceará e o norte do estado do Rio de Janeiro, abriga a flora algal mais diversificada do país. No tocante à exploração de espécies com fins comerciais, a atividade de maior porte corresponde à coleta de algas vermelhas (*Gracilaria* e *Hypnea*) no litoral do nordeste, principalmente na costa dos estados do Ceará e da Paraíba. A coleta de *Gracilaria* vem sendo feita desde a década de 60, por arrancamento manual ou através de mergulho livre, para fins de exportação e também para processamento no próprio país, na produção de ágar. Já a *Hypnea* tem sido exportada como matéria prima ou já processada para a indústria de carragenana; neste caso, a biomassa é coletada em algas arribadas nas praias, e não diretamente nos locais de crescimento (VIDOTTI, 2004).

As algas marinhas podem ser consideradas como uma fonte potencial de nutrientes, visto que elas usualmente contêm grandes quantidades de proteínas e carboidratos (MABEAU, 1992; BENEVIDES, 1998^a; RAMOS, 1998). Além disso, elas têm altos teores de iodo, justificando a baixa incidência de hipotireoidismo e bócio nas populações da costa asiática (YAGAMATA e YAMAGATA, 1972; ARASAKI e ARASAKI, 1983). Além disso, algumas algas contêm quantidades significantes de vitaminas A, B1 (tiamina), B2 (riboflavina), C e, especialmente, B12 (ERICSON e LEWIS, 1953; CHAPMAN, 1970; DARCYVRYLLON, 1993; PEREIRA, 2000). Algumas variedades de algas marinhas apresentam na sua composição de aminoácidos altos teores de arginina e grandes quantidades de aminoácidos não essenciais, tais como, aspártico, glutâmico, glicina e alanina (MABEAU, 1992). A *Ulva lactuca* (TAYLOR, 1960), é uma espécie muito rica em vitaminas do complexo B e ácido ascórbico. A composição de aminoácidos de algumas espécies de algas marinhas nativas da costa nordeste do Brasil foi avaliada por RAMOS, (1998). Os autores verificaram que a alga vermelha *Amansia multifida* é rica em aminoácidos ácidos e hidroxilados e pobre em metionina e cisteína, e que a alga verde *Caulerpa sertularioides* apresenta grande conteúdo de leucina e de alanina, mas baixos níveis de aminoácidos sulfurados.

RAMOS, (2000), ao estudarem o conteúdo de proteínas e seus aminoácidos constituintes em quatro espécies de algas marinhas do nordeste do Brasil, observaram grande variação no conteúdo protéico entre as espécies analisadas, variando de 2,3%

(*Corallina officinallis*) a 25,6% (*Amansia multifida*). As espécies *Amansia multifida*, *Caulerpa sertularioides*, *Enantiocladia duperreyi*, *Solieria filiformis* e *Vidalia obtusiloba* apresentaram níveis protéicos (acima de 18%) comparáveis aos de algumas sementes de leguminosas. Elas apresentaram altos teores dos aminoácidos aspártico/asparigina, glutâmico/glutamina, fenilalanina, tirosina e treonina e quantidade moderada do resíduo do aminoácido essencial metionina.

Do ponto de vista da aplicação biológica, as algas têm demonstrado várias atividades, como as do gênero *Caulerpa*, que apresentam propriedades antibióticas contra várias bactérias. Outras espécies também agem contra fungos e vírus. Poderíamos citar ainda, algumas frações protéicas de *Pterocladia capillacea* que apresentam atividade lipolítica, hipoglicêmica, anticoagulante e fibrinolítica. O óleo essencial desta espécie apresenta também atividade antibacteriana e antifúngica (GÜVEM, 1979).

Os polissacarídeos sulfatados de algas são de grande importância no que tange à aplicação biológica e encontram-se assim distribuídos: nas algas vermelhas as galactanas sulfatadas, nas pardas as fucanas (homofucanas) e fucoidanas (heterofucanas), constituídos principalmente de L-fucose sulfatada, enquanto as algas verdes apresentam polissacarídeos sulfatados mais heterogêneos ricos em galactose, manose, xilose, arabinose, glicose e ou ácidos urônicos (CHEVOLOT, 2001). A atividade anticoagulante para essas moléculas foi inicialmente descrita por CHARGAF, (1936) e desde então, vários estudos aplicativos explorando essa propriedade já foram conduzidos em várias espécies. Por exemplo, os polissacarídeos sulfatados da alga *Sptoglossum schroederi* exibiram atividade anticoagulante semelhante a heparina e, uma alta atividade na estimulação da síntese de antitrombóticos a partir de células endoteliais (LEITE, 1998).

Em geral, a atividade biológica dos polissacarídeos sulfatados de algas marinhas está relacionada ao tamanho da molécula, tipo de unidades constituintes e conteúdo de sulfato. A posição dos grupos sulfato, tipo de ligação e geometria da molécula também são importantes para a atividade biológica (MELO, 2004).

O alginato, um ficocolóide encontrado na parede celular e no espaço entre as células das algas pardas, é um polissacarídeo com caráter ácido, formado por D-manurônico e L-gulurônico, e desempenha o importante papel de retardar a dessecação da alga. O alginato extraído das algas pardas é bastante usado como espessantes nas indústrias alimentícias, têxteis, cosméticas e de papel (BOLD; WYNNE, 1985).

O ágar é um polissacarídeo bastante explorado comercialmente. Composto por resíduos de D e L-galactose, esse polissacarídeo é usado em diversos produtos alimentícios, como meio de cultura microbiológica, na formulação de cápsulas de vitaminas e drogas e base para cosméticos (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2001).

Carragenanas são hidrocolóides semelhantes ao ágar, bastante usados como agente estabilizante e emulsificante em tintas, cosméticos e laticínios (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2001). Na década 1990, estimava-se que o Brasil importava cerca de 200 toneladas de carragenanas por ano, uma vez que a produção comercial de carragenanas no país é esporádica e pequena. Até então, apenas a espécie *Hypnea musciformis* era explorada como fonte de carragenanas. Porém, outras espécies das famílias Gigartinaceae, Hypneaceae, Phyllophloraceae e Solieriaceae passaram a ser estudadas como carragenófitas em potencial (SAITO; OLIVEIRA, 1990).

1.3. Algas Vermelhas

Os organismos aquáticos e o ambiente abiótico estão interrelacionados e interagem entre si, dessa forma esses organismos marinhos desenvolveram mecanismos para utilização dos solutos disponíveis no meio e assim, adaptaram-se as altas concentrações de sais. Dentre os mais importantes íons presentes no ambiente marinho estão o sulfato, o cloreto, o brometo e o iodeto, em concentrações de 885, 19000, 65, e 0,06 mg/L, respectivamente. Diante disso, é compreensível o fato dos organismos marinhos produzirem substâncias halogenadas e sulfatadas em abundância, com maior ou menor eficiência. As algas marinhas vermelhas (Rhodophytas) são os principais organismos produtores dessas substâncias e são capazes de sintetizar uma grande diversidade de metabólitos halogenados, que podem pertencer a praticamente todas as classes químicas, desde hidrocarbonetos de baixo peso molecular, cetonas simples, fenóis, acetogeninas até sofisticados terpenos. Além disso, são eficientes na produção de polissacarídeos sulfatados (carragenanas e agar), que chegam a representar mais de 70% do seu peso seco.

As algas marinhas pardas (Phaeophyta) e verdes (Chlorophyta) são menos eficientes na produção de substâncias halogenadas e ambas produzem polissacarídeos sulfatados.

As algas vermelhas formam um grupo de organismos extremamente diversificado. Com cerca de 6.000 espécies, as Rhodophytas são diferenciadas dos

outros grupos de algas pela combinação de algumas características (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2001). Elas se caracterizam por possuir como pigmentos a clorofila a, a clorofila d, carotenóides e ficobilinas (ficocianina, aloficocianina e ficoeritrina) que mascaram a tonalidade verde das clorofilas, deixando a alga com seu tom avermelhado característico. A presença da ficoeritrina permite-lhes absorver a luz azul, podendo assim, sobreviver à profundidades muito superiores às das outras algas. Já foram encontradas algas desta divisão a mais de 260 metros de profundidade, desde que água seja límpida o suficiente para a passagem de luz (CRAIGE, 1990). Os principais produtos de reserva das algas vermelhas são os grânulos de amido das florídeas. Armazenados no citoplasma, o amido das florídeas é uma molécula que se assemelha à porção amilopectina do amido (VAN DEN HOEK; MANN; JAHNS, 1989; RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2001), pois é constituído por α -D-glucose, com ligações glicosídicas do tipo $\alpha(1\rightarrow4)$ e pontes de ramificações no carbono 6 (PAINTER, 1983).

Ágar é uma mistura complexa de polissacarídeos obtidos de algas vermelhas, conhecidas como agarófitas. O ágar é constituído por duas frações principais: um polímero neutro, agarose, que tem um alto poder gelificante e agarpectina, um polissacarídeo sulfatado de baixo poder gelificante (YAPHE, 1984).

A maior quantidade de ágar produzida no mundo é derivada de *Gracilaria* (53%) e *Gelidium* (44%) (MC HUGH, 1991). Apesar de espécies de *Gracilaria* geralmente produzirem ágar de baixo poder gelificante, elas são consideradas as mais importantes comercialmente (ARMISEN, 1995) e têm sido objeto de numerosos estudos de caracterização desses ficocolóides.

A parede celular das Rhodophytas, assim como das Phaeophyta e Chlorophyta, tem como componente principal a celulose (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2001). A celulose da parede celular das Rhodophytas encontra-se embebida por um material amorfo e mucilaginoso, responsável pela flexibilidade, resistência e textura das algas. Os principais componentes mucilaginosos das algas vermelhas são o ágar, a carragenana e o alginato (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2001).

Entre os três grupos de macroalgas, a presença de pelo menos um tipo de polissacarídeo contendo éster sulfato é uma característica marcante, uma vez que polissacarídeos sulfatados ainda não foram relatados em plantas, embora ocorram amplamente em tecidos conjuntivos de vertebrados e em menor proporção em invertebrados (FARIAS *et al*, 2000)

1.4. Lectinas

Lectinas são glicoproteínas ou proteínas oligoméricas que fazem ligações univalentes ou polivalentes (JCBN Nomenclature Committee of IUB, 1981; GOLDSTEIN e PORETZ, 1986; OHYAMA, 1986) com carboidratos, e são de natureza não imune. Elas se ligam reversivelmente a açúcares específicos. Muitas lectinas podem também conter um segundo tipo de sítio de ligação que podem interagir com ligantes que não são carboidratos. Dessa forma, lectinas possuem várias especificidades que estão associadas com sua capacidade de interagir com acetilaminocarbohidratos, aminocarbohidratos, ácido siálico, hexoses, pentoses, além de outros tipos de carboidratos, e precipitando polissacarídeos, glicoproteínas e glicolipídeos que contenham açúcares específicos, agindo assim como células de reconhecimento (GOLDSTEIN, 1980; LIS e SHARON, 1984).

As lectinas são amplamente distribuídas na natureza e têm sido encontradas em muitos organismos, desde vírus e bactérias até plantas e animais, embora a observação de sua larga ocorrência em animais superiores somente seria constatada com a descoberta das selectinas (SHARON e LIS, 2001).

O conhecimento sobre lectinas tem revelado sucessivas definições para esta classe especial de proteínas, dentre as quais, a mais utilizada e mais apropriada é aquela citada por PEUMANS e VAN DAMME (1995), que as definiram como “proteínas de origem não imune que possuem um ou mais sítios ligantes de carboidratos os quais, no caso de enzimas, não são requeridos para a atividade catalítica”. CUMMINGS (1997) definiu uma lectina, como uma proteína que se liga a carboidrato, que não seja anticorpo e não tenha atividade enzimática para carboidratos.

Com base na estrutura de suas subunidades (mais precisamente nos produtos primários da tradução dos genes das lectinas) podem ser distinguidos cinco tipos principais de lectinas: merolectinas, hololectinas, quimerolectinas, superlectinas e multilectinas.

As **merolectinas** são proteínas pequenas, formadas exclusivamente por um domínio ligante a carboidrato. Devido à sua natureza monovalente, as merolectinas não são capazes de precipitar glicoconjugados ou aglutinar células. Poucas merolectinas foram descobertas, talvez pelo fato de não apresentarem atividade hemaglutinante. Exemplos conhecidos são a lectina extraída do látex de *Hevea brasiliensis* (VAN PARIJS, 1991) e a proteína monomérica manose-ligante extraída de orquídeas (VAN

DAMME, 1994). As **hololectinas** são formadas exclusivamente por domínios ligantes a carboidratos, porém, diferente das merolectinas, possuem dois ou mais destes domínios, iguais ou homólogos, e se ligam ao mesmo (ou estruturalmente similar) açúcar. Por apresentarem mais de um sítio de ligação são capazes de precipitar glicoconjugados e aglutinar eritrócitos. A maioria das lectinas, já isoladas, pertence ao grupo das hololectinas (VAN DAMME, 1994). As **quimerolectinas** são compostas basicamente por domínios ligantes a carboidratos, arranjos em seqüência com um domínio apresentando uma outra atividade biológica. Tal domínio pode apresentar atividade catalítica (ou outra atividade biológica qualquer), agindo de forma independente do domínio de ligação a carboidratos. As **superlectinas** são um tipo especial de quimerolectinas. Elas são formadas por dois domínios ligantes a carboidratos, arranjos em seqüência, os quais são estruturalmente diferentes e reconhecem açúcares estruturalmente não relacionados. Até o momento, a lectina de bulbos de tulipa é a única superlectina descrita (CAMMUE *et al.*, 1986). As **multilectinas** são caracterizadas por possuírem mais de um sítio ligante a açúcares que, embora idênticos, podem ligar açúcares diferentes (MONTEIRO-MOREIRA, 2002). Exemplos de multilectinas são as lectinas frutalinas (de *Artocarpus incisa*) e jacalina (de *Artocarpus integrifolia*).

A especificidade por açúcar é uma característica marcante das lectinas. A interação das lectinas com células é, portanto, dependente da presença dos carboidratos apropriados na sua superfície. Deste modo, as lectinas ao interagirem com os carboidratos da superfície dos eritrócitos induzem ligações cruzadas entre as células, que resultam na aglutinação, denominada tecnicamente de aglutinação celular ou hemaglutinação (LIS; SHARON, 1998).

1.5. Lectinas de Algas Marinhas

As lectinas de algas marinhas diferem das lectinas de plantas superiores em uma variedade de propriedades. Em geral, lectinas de algas possuem uma pequena massa molecular comparado à maioria das lectinas de plantas superiores e não apresentam afinidade por açúcares simples mas apresentam maior especificidade por oligossacarídeos complexos, assim como por glicoproteínas. A maioria das lectinas de algas marinhas não é dependente de cátions divalentes para suas atividades biológicas (ROGERS e HORI, 1993). Elas ocorrem principalmente na forma monomérica.

Quanto à composição de aminoácidos, as lectinas de algas apresentam elevadas concentrações de aminoácidos ácidos (ácido aspártico e ácido glutâmico) e aminoácidos hidroxilados (serina e treonina) e baixos teores de aminoácidos básicos (BENEVIDES, 1996; HORI, 1988^a ; 1990; OKAMOTO, 1990; SAMPAIO, 1998^a , 1998b). Possuem ponto isoelétrico (PI) que variam de 4 a 6 (SHIOMI, 1981; HORI, 1990).

Ao analisar os dados publicados sobre a presença de lectinas em algas marinhas, SAMPAIO (1997) constatou que apenas 700 espécies haviam sido examinadas e que em cerca de 57% delas observou-se à presença de lectinas. Levando-se em consideração que na natureza existem milhares de espécies de algas, este número representa apenas uma pequena parcela da contribuição das algas marinhas para os estudos de detecção e isolamento da lectina.

1.6. Polissacarídeos de Algas Marinhas

Polissacarídeos são polímeros de açúcar que contém mais de 20 unidades monossacarídicas, podendo ter cadeias de centenas ou milhares destas unidades. Dessa forma, são polímeros de média até alta massa molecular (NELSON & COX, 2002).

Os polissacarídeos de algas apresentam em sua estrutura açúcares bastante comuns como glicose, xilose e galactose, assim como possuem açúcares bastante específicos e incomuns, diferentes dos encontrados em animais e vegetais terrestres como é o caso da fucose e da anidrogactose (ZHANG *et al.*, 2003).

Os polissacarídeos das algas verdes são polímeros heterogêneos altamente ramificados, ricos em galactose, manose, xilose, arabinose, glicose e/ou ácidos

urônicos, não apresentando unidades repetitivas dissacarídicas (PERCIVAL, 1979; PERCIVAL; MCDOWELL, 1990) como ocorre nos glicosaminoglicanos.

A composição polissacarídica das algas vermelhas é muito diferente das de outras plantas, e contém usualmente carragenanas, que são uma classe de polímeros constituídos de galactanas sulfatadas lineares e solúveis em água, como principal constituinte estrutural da parede celular na matriz intercelular (PAINTER, 1983). Estas polímeros são formados por resíduos de β -D-galactopiranosose unidas por ligações $\alpha(1\rightarrow3)$ ou α -D-galactopiranosose unidas por ligações $\alpha(1\rightarrow4)$. Além da galactose, outros resíduos de carboidratos como glicose, xilose e ácidos urônicos podem estar presentes em preparações de carragenanas (VAN DE VALDE; PEREIRA; ROLLEMA, 2004). Além das carragenanas terem grande importância nas indústrias alimentícias e cosméticas, elas vêm sendo utilizadas como ferramentas para investigar o processo inflamatório em ratos e camundongos (LEVY, 1969).

As algas marrons produzem as fucanas sulfatadas que são polissacarídeos extremamente heterogêneos e ramificados, compostos por unidades de α -L-fucose (1 \rightarrow 3) e α -L-fucose (1 \rightarrow 4) sulfatadas em C3, C2 e/ou C4. Além da fucose, podem conter no polímero outros monossacarídeos como galactose, xilose e ácidos urônicos (LEITE, *et al.*, 1998; DUARTE, *et al.*, 2001; ROCHA, 2002; PONCE, *et al.*, 2003).

Segundo KLOAREG e QUATRANO (1988) os polissacarídeos da matriz das algas marinhas estão correlacionados com a regulação osmótica ou iônica, adaptando as algas ao meio marinho. Ainda com função de osmorregulação, as algas biossintetizam carboidratos de baixo peso molecular e/ou polióis (KARSTEN *et al.* 1993).

1.7. Galactanas Sulfatadas de Rhodophytas

As algas vermelhas biossintetizam uma grande variedade de galactanas sulfatadas que são os principais componentes da matriz intercelular. As galactanas consistem de polímeros de galactose, mais especificamente, por cadeias lineares de dissacarídeos repetitivos. Cada dissacarídeo é constituído por duas subunidades, A e B, e o polissacarídeo é formado pela alternância dessas unidades $(AB)_n$ (FIGURA 01). A unidade A é representada pela β -D-galactopiranosose ligadas através dos carbonos C-1 e C-3 enquanto a subunidade B é representada pela α -galactopiranosose ligadas através dos carbonos C-1 e C-4. Algumas unidades B podem ocorrer na forma

ciclizada entre os carbonos C-3 e C-6, formando o composto 3,6-anidro- α -L-galactose (PAINTER, 1983).

Segundo RESS (1961 *apud* USOV, 1998) o resíduo de α -L-galactose 6-sulfato é o precursor biológico do resíduo de 3,6-anidrogalactose- α -L-galactose. Há duas formas de promover essa conversão. A primeira, natural, a reação é catalisada nos tecidos algais por uma enzima específica chamada sulfato eliminase. Uma segunda forma pode ser realizada quimicamente por tratamento alcalino dos polissacarídeos.

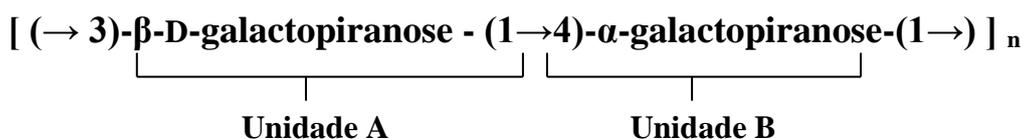


FIGURA 01: Representação esquemática estrutural das galactanas de algas vermelhas

A mais simples classificação das galactanas de algas marinhas é feita de acordo com a estereoquímica da unidade B: sendo a unidade B pertencente à série D, estas galactanas são classificadas como carragenanas; sendo a unidade B pertencente à série L, as galactanas são classificadas como agaranas. No entanto, estudos estruturais detalhados demonstram um terceiro grupo de galactanas onde a unidade B apresenta configuração D- e L- na mesma molécula. Polissacarídeos com essa estrutura são denominados de carrágar (CHOPIN et al., 1999) ou híbridos – D/L (STORTZ & CEREZO, 2000). Uma característica bastante comum nas galactanas de Rhodophytas é a possibilidade de substituição dos grupos hidroxila por ésteres de sulfato, grupos metil, grupos acetal de ácido pirúvico e em alguns casos, por monossacarídeos adicionais (PAINTER, 1983; FALSHAL; FURNEAUX; STEVENSON, 2005; USOV, 1998; MOLLET; RAHAOUI; LEMOINE, 1998; MARINHO-SORIANO, 2001). Esses grupos substituintes ocorrem nas agaranas e carragenanas de forma bem peculiar: geralmente as carragenanas têm maior conteúdo de sulfato que as agaranas. Por outro lado, as agaranas apresentam maior grau de substituição por grupos metil e piruvatos que as carragenanas (LAHAYE, 2001).

Com o intuito de facilitar e homogeneizar a escrita das unidades dissacarídicas repetitivas das galactanas KNUTSEN *et al.* (1994) desenvolveram uma nomenclatura simbólica, na qual as unidades A (β -galactopiranosse) são simbolizadas

pela letra G, e as unidades B quando pertencentes ao grupo das carragenanas são simbolizadas pela letra D (α -D-galactopiranosil) e DA (3,6-anidro- α -D-galactose). As substituições por grupos metil, sulfato e xilose recebem o número correspondente ao carbono que está sendo substituído e as letras correspondentes ao tipo de substituinte M, S e X, respectivamente. Acetal de ácido pirúvico substituindo as unidades A são representados simbolicamente de GP. Segundo essa nomenclatura, pode-se observar na TABELA 01 algumas unidades monossacarídicas com suas correspondentes letras codificadas.

TABELA 01: Codificação dos resíduos de açúcar e grupos substituintes presentes nas galactanas (KNUTSEN *et al*, 1994). Números correspondem o átomo de carbono no qual o substituinte encontra-se ligado.

Código	Unidade monossacarídica correspondente
D	(1→4)- α -D-galactopiranosil
DA	(1→4)-3,6-anidro- α -D-galactopiranosil
G	3-ligado - β -D-galactopiranosil
L	(1→4)- α -L-galactopiranosil
LA	(1→4)-3,6-anidro- α -L-galactopiranosil
M	O-metil
P	4,6-O-(1-carboxietilideno)
S	Ester Sulfato
L2M,6S	(1→4)-2-O-metil- α -L-galactopiranosil-6-sulfato
G4S-DA-G	→3)- β -D-galactopiranosil 4-sulfato (1→4) 3,6-anidro- α -D-galactopiranosil (1→3) β -D-galactopiranosil (1→

A caracterização química das galactanas de algas vermelhas, bem como o número e os tipos de substituintes, é um passo essencial para o estudo das propriedades e aplicações desses polímeros. Métodos químicos e espectroscópicos são as principais ferramentas para a caracterização de galactanas de Rhodophytas (FALSHAW; FURNEAUX, 1994; USOV, 1998)

1.7.1. Agaranas

As agaranas formam uma classe de galactanas que ocorrem na matriz extracelular de diversas espécies de algas marinhas vermelhas (Rhodophyta), especialmente os membros das famílias Gelidiaceae e Gracilariaceae (ARMISEN; GALACTAS, 1987 apud MARINHO-SORIANO; BOURRET, 2005). Sua função, se assemelha à dos polissacarídeos de parede celular de plantas terrestres, porém, enquanto estas requerem uma estrutura rígida capaz de resistir à constante atração da gravidade, as algas marinhas precisam de uma maior flexibilidade em sua estrutura para acomodar as variações nas correntes marinhas e movimento das ondas.

O ágar consiste em dois diferentes componentes: agarose e agarpectina. A agarose é um polissacarídeo neutro, caracterizado por uma estrutura linear de unidades repetidas do dissacarídeo agarobiose [(1→3)-β-D-galactose e (1→4)-3,6-anidro-α-L-galactose]. Já a agarpectina caracteriza-se como um polissacarídeo ácido contendo sulfato, metil, ácido pirúvico e ácido D-glucurônico adicionado à agarobiose (ARAKI, 1966 apud MARINHO-SORIANO; BOURRET, 2005). KNUTSEN, *et al* (1994) propuseram que o termo “agarana” deveria ser empregado para designar polissacarídeos constituídos por monômeros de dissacarídeos repetitivos de (→3)-β-D-galactose ligada a (1→4)-α-L-galactose (FIGURA 02).

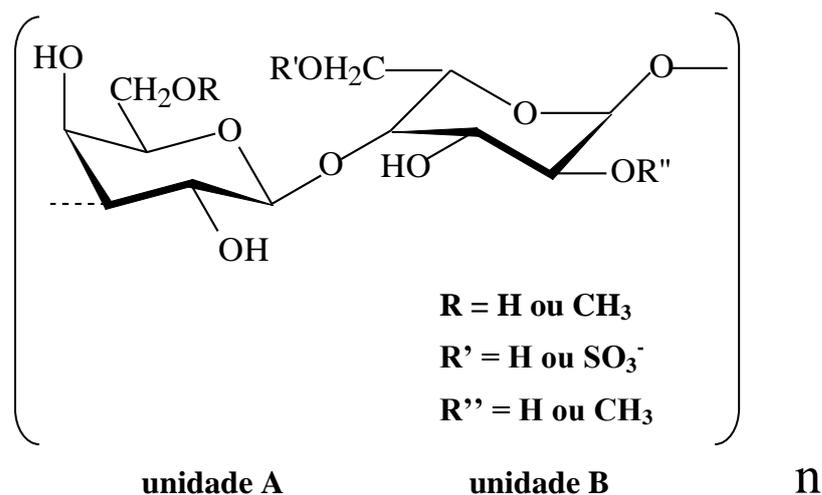


FIGURA 02. Estrutura básica repetitiva de agaranas, com unidades D- e L-alternantes.

Por outro lado, o termo “agarose” designaria o polissacarídeo semelhante às agaranas, porém, sua unidade B (4-*O*-ligada) ocorreria na forma de 3,6-anidro- α -L-galactose, ou simplesmente 3,6-anidrogalactose (FIGURA 03 I). Segundo NOSEDA e CEREZO (1995) a agarose teria como precursor biológico natural o composto α -L-galactose-6-sulfato. (FIGURA 03 II). A agarose é a galactana com maior propriedade gelificante devido à presença da ligação anídrica entre os carbonos C- 3 e C-6 da unidade B das galactanas. (KNUTSEN *et al*, 1994).

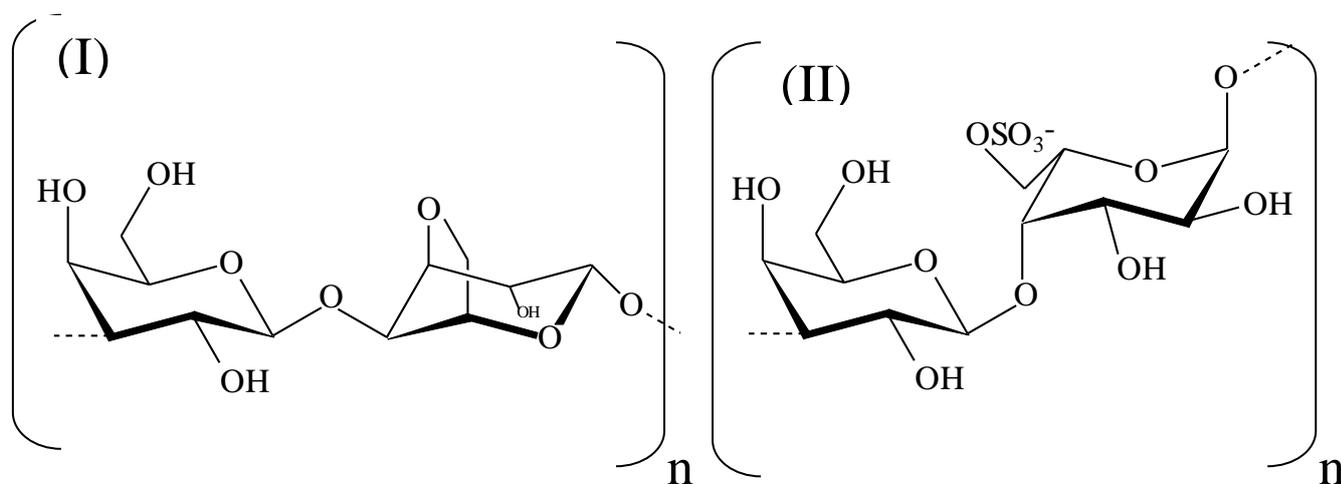


FIGURA 03. Estruturas extremas encontradas em agaranas: Agarose (I); Precursor da Agarose (II).

Geralmente, espécies do gênero *Gracilaria* produzem ágar com baixa qualidade devido ao alto conteúdo de sulfato (MARINHO-SORIANO, 2001). No entanto, a qualidade do ágar pode ser aumentada através do tratamento de hidrólise alcalina, com conversão de L-galactose-6-sulfato para 3,6-anidro-L-galactose (ARMISEN; GALACTAS, 1987).

Géis de agarose modificados quimicamente são utilizados em laboratórios em cromatografias de troca-iônica (DEAE-Sepharose, CM-Sepharose). Estes géis estão entre os meios mais utilizados para eletroforese, assim como também o ágar é amplamente utilizado para solidificar meios de cultura de microorganismos (NOSEDA, 1994).

As agaranas podem ser utilizadas na fabricação de cápsulas de vitaminas e outras drogas, em materiais odontológicos e como base para cosméticos. São igualmente empregados como agentes que impedem a dessecação de produtos de confeitaria, na preparação de geléias e sobremesas e como conservantes temporários para carne e peixe em regiões tropicas (RENN, 1997).

1.7.2. Carragenanas

As carragenanas são polissacarídeos sulfatados extraídos de Rhodophytas, com cadeia linear, solúveis em água e são muito explorados comercialmente devido suas propriedades gelificantes e estabilizantes (DE RUITER; RUDOLPH, 1997; VAN DE VELDE *et al.*,2002). Esse grupo de galactanas é formado por unidades repetitivas de dímeros contendo (1→3)-β-D-galatopirranose (unidade A) ligadas a (1→4)-α-D-galactopirranose (unidade B). (FALSHAW, FURNEAUX; STEVENSON, 2005; USOV, 1998; MOLLET; RAHAOUI; LEMOINE, 1998 MARINHIO-SORIANO, 2001; DE RUITER; RUDOLPH, 1997; VAN DE VELDE *et al.*,2002). Esta última unidade pode ser encontrada na forma totalmente ciclizada de 3,6-anidro-α-D-galactose, ou ainda na sua forma precursora de anidro-açúcar α-D-galactose-6-sulfato. Geralmente as carragenanas apresentam uma alta porcentagem de grupos sulfato e uma baixa porcentagem de grupos O-metil naturais (PAINTER,1983).

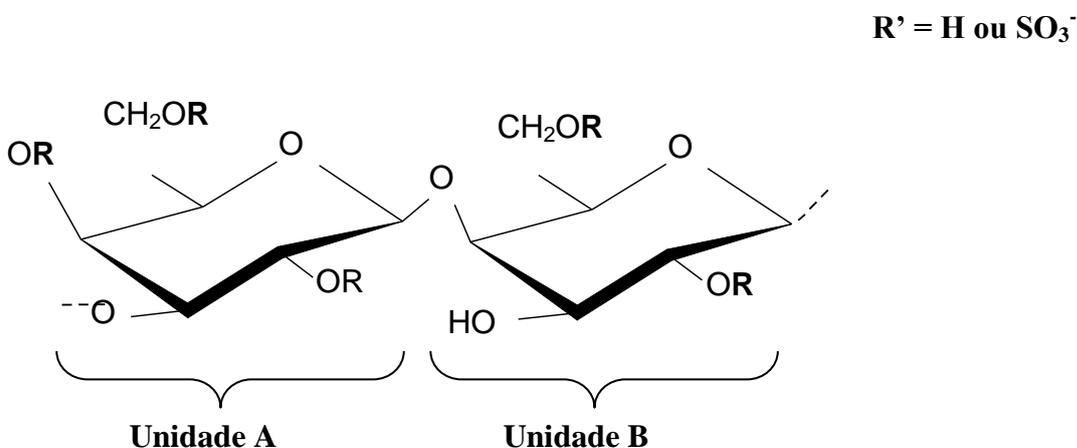


FIGURA 04: Padrão estrutural do dissacarídeo presente nas carragenanas.

Tradicionalmente, as carragenanas são classificadas por letras gregas, que indicavam o maior componente de uma amostra. Essa identificação é bastante utilizada na ciência, legislação e regulação, porém, apresenta problemas no ponto de vista científico, pois se trata de uma nomenclatura não lógica, inflexível, e incapaz de descrever, sem ambigüidade, polímeros complexos (DE RUITER; RUDOLPH, 1997). Tendo em vista esse problema, uma nova nomenclatura foi proposta por KNUTSEN *et al* (1994), e atribuía letras-código para identificar cada monômero que compunha a galactana. Essa nomenclatura baseada em letras-código, apresentada na TABELA 02, é atualmente adotada pela “International Union of Pure and Applied Chemistry” (IUPAC), e proporciona uma classificação sistemática para polímeros complexos (VAN DE VELDE *et al.*, 2002).

TABELA 02: Nomenclatura alternativa para as carragenanas proposta por Knutsen *et al* (1994), modificada por Cauduro *et al.* (2000)

Unidade A (1→3)	Unidade B (1→4)	Carragenana	Família
G4S	DA	κ (kappa)	Kappa
G4S	DA2S	ι (iota)	
G4S	D6S	μ (mu)	
G4S	D2S,6S	ν (nu)	
G4S	D2S	o (omicron)	
G	DA	β (beta)	Beta
G	D6S	γ (gamma)	
G	D2S,6S	δ (delta)	
G	DA2S	α (alpha)	
G2S	D2S,6S	λ (lambda)	Lambda
G2S	DA2S	θ (theta)	
G2S	D2S	ξ (xi)	
GP,2S	D2S	π (pi)	Omega
G6S	DA	ω (omega)	
G6S	D6S	ψ (psi)	

Geralmente, as carragenanas naturais são misturas de diferentes polissacarídeos sulfatados. Diferentes tipos de híbridos de carragenanas são bastante relatados como κ / ι -híbrido, κ / β -híbrido, ξ / θ -híbrido, ν / ι -híbrido, e mais estruturas complexas contendo unidades metiladas e piruvatadas (VAN DE VELDE, 2008). As misturas e proporções de carragenana podem variar de acordo com espécies, ciclo de vida, condições fisiológicas e ambientais. Os estágios do ciclo reprodutivo de espécies da família Gigartinaceae afetam as estruturas de suas carragenanas, a alga *Gigartina pistillata* biossintetiza na sua fase gametofítica um heteropolissacarídeo constituído majoritariamente por kappa/iota-carragenana, e baixas proporções de nu-carragenana. Já na fase tetrasporofítica a alga biossintetiza um complexo de lambda/xi/pi-carragenana, com grande parte das unidades A 2,6-dissulfatadas (AMIMI et al., 2001).

O conteúdo de $-O-SO_3^-$ nos polissacarídeos sulfatados pode variar entre 0-41%(m/m), podendo resultar em polímeros altamente carregados negativamente. Carragenanas comerciais, como a κ , ι e λ contém 22, 32 e 38% (m/m) de sulfato, respectivamente, e massa molecular entre 400 e 600 kDa. A determinação do conteúdo de sulfato, bem como as posições desses grupos, é importante para o estudo das propriedades reológicas dos polímeros, suas aplicações em alimentos e cosméticos e suas possíveis aplicações médicas (DE RUITER; RUDOLPH, 1997).

Entre as carragenanas, as gelificantes (kappa- e iota-) e as não gelificantes (lambda-carragenana) são amplamente utilizadas em diversos setores da indústria. As carragenanas gelificantes diferem nas propriedades dos hidrogéis (PICULELL, 1995)

A lambda-carragenana é a carragenana mais sulfatada (G2S-D2,6S). Hélices ordenadas não são formadas por essa estrutura, dessa forma, a lambda-carragenana não forma gel. As espécies formadoras de gel geralmente apresentam a unidade B na forma de 3,6-anidrogactose (PICULELL, 1995).

As carragenanas do tipo κ e ι têm a propriedade de formar gel devido à presença de um resíduo de 3,6-anidrogactose na unidade B do dissacarídeo enquanto a λ -carragenana, caracteriza-se pela alta viscosidade, e pela incapacidade de formar gel (DE RUITER; RUDOLPH, 1997; VAN DE VELDE *et al.*, 2002).

As carragenanas podem ser usadas como géis, espessantes ou em suspensão, elas estabilizam emulsões e controlam a sinerese (perda de água), proporcionando dispersão, ligação e corpo ao produto final. O principal uso das carragenanas, em particular na indústria alimentícia é em produtos derivados do leite (GUISELEY *et al.*,1980)

1.7.3. Híbrido D/L

Alem dos principais tipos de galactanas (agaranas e carragenanas), um terceiro tipo foi identificado. Trata-se de um grupo de galactanas que apresentam características tanto de agaranas quanto de carragenanas. Inicialmente, esse novo grupo foi chamado de carrágar (CHOPIN; KERIN; MAZEROLLE, 1999), mas, posteriormente, STORTZ e CERZO (2000) propuseram o nome galactana DL-híbrida. A principal característica das galactanas DL-híbridas está na unidade B da estrutura regular das galactanas, que pode ocorrer tanto na forma D quanto na forma L. Dessa forma, a determinação das unidades enantioméricas é o ponto fundamental para a caracterização dessas galactanas.

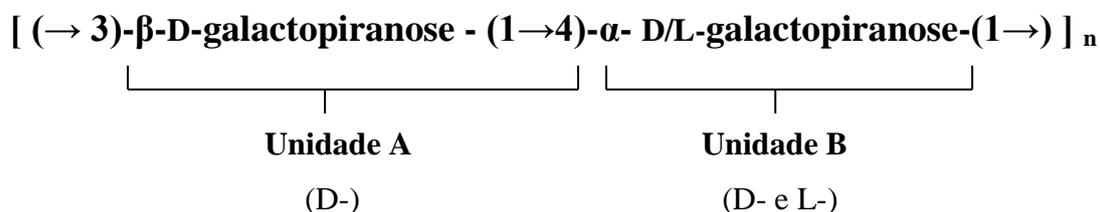


FIGURA 05: Representação esquemática estrutural das galactanas DL-híbridas de algas vermelhas

As galactanas DL-híbridas são definidas de acordo com a proporção da configuração presente na unidade B das galactanas. Quando a molécula é constituída principalmente por carragenanas (α -D-galactose), a galactana híbrida é denominada carragenana-híbrida-D/L, mas quando as principais unidades dissacarídicas são moléculas de agaranas (α -L-galactose), o polímero híbrido é denominado de agarana-híbrida-D/L (ESTEVEZ; CIANCIA; CERZO, 2004).

A recente descoberta das galactanas do DL-híbridas proporcionou o estudo mais minucioso das algas consideradas anteriormente como agarófitas ou carragenófitas exclusivas. Apesar de o gênero *Gymnogongrus* ser considerado como carragenófito,

ESTEVEZ, CIANCIA e CEREZO (2004) encontraram uma galactana DL-híbrida, com maiores quantidades de agaranas e carragenanas típicas e menores quantidades de agaranas com padrão não usual. A alga *Kappaphycus alvarezii* apresentou uma galactana DL-híbrida constituída de agaranas e agarana-κ-carragenana, e marcante presença de Ca²⁺ e Mg²⁺. Os cátions divalentes atuariam como agente agregante entre galactanas híbridas (ESTEVEZ; CIANCIA; CEREZO, 2004).

1.8. Algas Marinhas Cultivadas no Ceará

Em geral, as algas são utilizadas de várias formas, como na alimentação direta e em produtos processados, como é o caso dos ficocolóides. Tradicionalmente, as algas são coletadas em populações de estoques naturais, mas estes vêm diminuindo em todos os bancos naturais onde ocorre este processo, por isso, as técnicas de maricultura estão superando o extrativismo desde 1993, onde os principais cultivos concentram-se nas seguintes espécies: *Laminaria japonica* e *Undaria pinnatifida* (Phaeophyta), *Eucheuma* spp., *Gracilaria* spp. e *Porphyra* spp. (Rhodophyta) e *Monostroma* sp. (Chlorophyta). Na América Latina, o Chile tem se destacado com o cultivo de *Gracilaria chilensis*. Foram muitos os trabalhos experimentais no Chile para que se chegasse a uma produção mais significativa. Segundo ALVEAL (1998) a maioria dos cultivos iniciados por pescadores com assessoria técnica de pesquisadores logram êxito, entretanto, diversos fatores prejudicam a atividade, como epifitismo, grandes marés, condições climáticas, dentre outros.

O cultivo de algas para produção de agaranas e carragenanas tem sido advogado como prioritário no Brasil. O país importa estes produtos em quantidades significativas, e o mercado mundial apresenta demanda crescente (PAULA, 1998; OLIVEIRA, 1992; CRICHLEY, 1993). Alguns esforços já foram realizados para se cultivar espécies de macroalgas nativas do Brasil, mas apesar destes esforços a maricultura comercial somente tornou-se realidade para *Gracilaria* no Chile (PAULA, 1998), como foi mostrado anteriormente. OLIVEIRA e MIRANDA (1998) citam que embora a exploração de macroalgas no Brasil tenha se iniciado por volta de 1940, seu impacto econômico e, sobretudo, social tem sido muito pequeno.

A partir de 1997, foram iniciados os experimentos preliminares realizados pelo Instituto Terramar e Universidade Federal do Ceará, na comunidade de Flecheiras

(Município de Trairi). Nesta ocasião, a viabilidade do crescimento da *Gracilaria cornea* (J. Agardh) e *G. birdiae* (Plastino e Oliveira, 2002) foi testada com os experimentos iniciais conduzidos em uma pequena estrutura, em parceria com a Associação de Moradores de Flecheiras, que posteriormente, estendeu-se também para a comunidade de Guajiru. Atualmente as atividades de cultivo estão em expansão, onde o processo produtivo está sendo desenvolvido pela Associação de Produtores de Algas de Flecheiras e Guajiru (APAFG), com Assessoria direta do Instituto Terramar e de outros órgãos envolvidos no processo.

O cultivo de *Gracilaria* objetiva ampliar a renda das comunidades da zona costeira do Estado do Ceará. Além de dar lucro, a alga pode ainda ajudar na repovoação de lagostas, camarões e peixes, pois estes vêm buscar proteção sob o abrigo das algas. No Chile, onde o cultivo de *Gracilaria* está integrado às fazendas de salmão, as algas crescem muito bem e reduzem os amônios excretados pelos peixes. No litoral do Nordeste brasileiro, são mais de 300 espécies de algas crescendo em bancos de corais e recifes. O extrativismo, desde a década de 70, reduziu bastante e está sendo substituído pelo cultivo de algas com êxito.

As algas produzidas nesse cultivo (Flecheiras - Trairi), especialmente, a *G. birdiae*, também são empregadas em estudos realizados na Universidade Federal do Ceará. O projeto financiado pelo CNPq – Ct - Agro intitulado, “Aproveitamento de Algas marinhas como suplemento nutricional de formulações alimentares alternativas (multimistura)”, sob a responsabilidade do laboratório de Algas Marinhas I do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, teve como interesse principal estudar a multimistura, utilizada como alimento em comunidades carentes brasileiras, e introduzir o uso regional de farinhas de algas como suplemento da citada formulação. A avaliação da constituição bioquímica e do valor nutricional de algumas espécies de algas foram avaliados nos últimos experimentos nutricionais, tendo sido a espécie cultivada *G. birdiae*, a escolhida para a continuação dos experimentos. A FIGURA 06 mostra a foto da alga *Gracilaria birdiea* e o modelo esquemático das condições de cultivo dessa espécie.



(I)

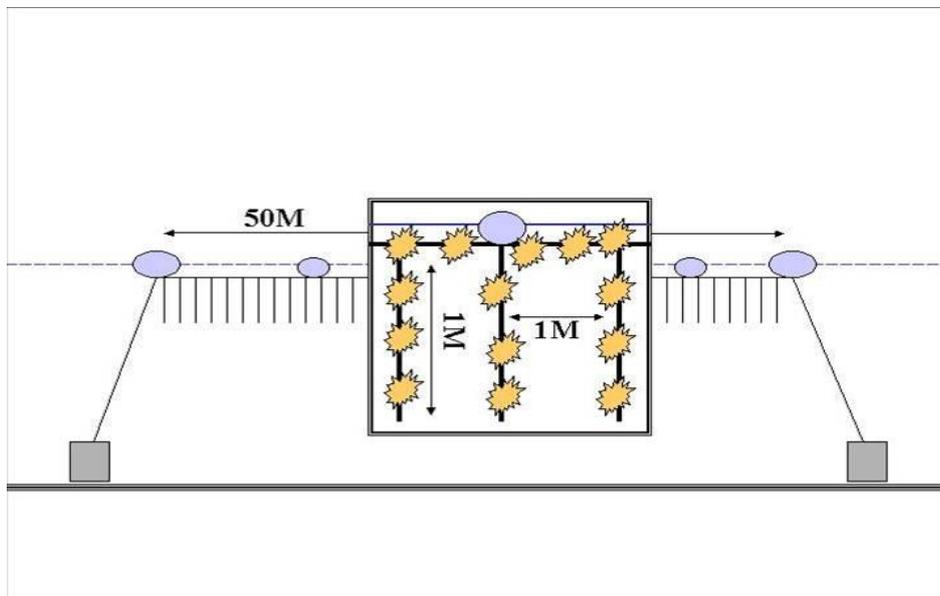


FIGURA 06: (I) Foto de *G. birdiae*; (II) Modelo esquemático do cultivo de algas marinhas em Flecheiras.

2. Objetivos

2.1. Objetivos Gerais

Esse trabalho tem como um dos objetivos avaliar a estrutura química dos polissacarídeos da Rhodophyta *Gracilaria birdiae*, extraídos a cada mês, em um período de doze meses, fazendo um comparativo e identificando possíveis mudanças estruturais, assim como suas implicações na qualidade do ágar, visando possíveis aplicações biológicas, biotecnológicas ou industriais. Além disso, este trabalho também visa realizar um estudo da sazonalidade da alga marinha *G. birdiae*, com relação à presença de atividade hemaglutinante e composição mínima, durante o período de um ano.

2.2. Objetivos Específicos

- Avaliar o rendimento do polissacarídeo extraído de *G. birdiae*, a cada mês, durante um ano, proveniente do cultivo de algas marinhas em Flecheiras (CE).
- Determinar a massa molar dos polissacarídeos através de Cromatografia em Permeação em Gel (GPC);
- Determinar a estrutura química fina dos polissacarídeos de *G. birdiae* através de métodos químicos e espectroscópicos;
- Determinar os teores de cinzas, fibra bruta, extrato etéreo, umidade, proteína e valor calórico, através da análise centesimal mensal da farinha da alga *G. birdiae*
- Realizar mensalmente, ensaios de hemaglutinação com o extrato protéico da alga *G. birdiae*, visando detectar o período de maior atividade da lectina;
- Realizar dosagens de proteínas (Lowry) no extrato protéico com o intuito de verificar possíveis variações no conteúdo de proteínas solúveis ao longo do período investigado.

3. Materiais e Métodos

3.1. Materiais

3.1.1. Algas Marinhas

Os exemplares da alga marinha cultivada *Gracilaria birdiae* foram coletados em estrutura de cultivo, na praia de Flecheiras (3°22'S, 39°25'W), município de Trairi, Ceará. Após coleta, os exemplares foram guardados em sacos plásticos etiquetados, com a identificação da espécie e transportados em recipientes térmicos em baixa temperatura para o Laboratório de Algas Marinhas I da Universidade Federal do Ceará-Brasil.

3.1.2. Células Sangüíneas

Eritrócitos de galinha foram obtidos de animais criados no Departamento de Zootecnia do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Ceará.

3.1.3. Reagentes

- Álcool etílico comercial e acetona (P.A.) foram obtidos comercialmente, sulfato de sódio e albumina sérica bovina, da Sigma – Aldrich, St. Louis, EUA.

Todos os demais reagentes são de Grau Analítico e foram obtidos comercialmente.

3.2. Métodos

3.2.1. Tratamento da Alga Marinha

Os exemplares da alga marinha vermelha *Gracilaria birdiae*, uma vez no laboratório, foram lavadas com água destilada e separadas de epífitas e outras algas,

sendo então estocadas em sacos plásticos e armazenadas a -20°C , para posterior utilização.

3.2.2. Análise Elementar da Alga Marinha Vermelha *Gracilaria birdiae*.

Amostras da alga marinha vermelha *Gracilaria birdiae* foram utilizadas para estudos de análise elementar, como descrito a seguir.

3.2.2.1. Umidade

Aproximadamente 4g da amostra foram pesadas (balança analítica TECNAL GEHARA, modelo BG400 II) em pesa filtro tarado. As amostras foram secas em estufa à temperatura estabilizada de 105°C (Estufa de esterilização e secagem 1.6 ODONTOBRAS; temperatura de $0-300^{\circ}\text{C}$), durante 12 horas, levadas ao dessecador e após o equilíbrio térmico foram pesados. Em seguida os pesa-filtros retornaram à estufa por mais 12 horas, sendo esta etapa repetida até o aparecimento de pesos constantes. A perda de água na secagem foi calculada pela diferença entre os pesos das amostras úmidas e o peso das mesmas secas. A determinação de umidade foi realizada conforme metodologia da A.O. A.C (1990).

3.2.2.2. Proteínas

O teor de proteínas foi determinado conforme o método de Kjeldhal citado pela A.O.A.C (1990). Uma amostra de 2g foi pesada e colocada em balão de Kjeldhal com auxílio de 30 mL de H_2SO_4 ; a qual foi adicionado 0,5g de catalisador sulfato de cobre e 9,5g de sulfato de sódio. O balão foi levado ao digestor (Modelo TE 40/25 – TECNAL) para mineralização da matéria orgânica; depois foi deixado esfriar e ao mesmo foi acrescentado 200 mL de água destilada, aproximadamente 1g de zinco em pó e 100 mL de NaOH 40%. Foi destilado cerca de 2/3 do volume inicial utilizando como solução receptora 50 mL de ácido sulfúrico 0,1N e vermelho de metila como indicador. Após a destilação, foi titulado (Aparelho de titulação de nitrogênio TE 036/1 – TECNAL) o excesso de ácido sulfúrico com solução de NaOH 0,1N.

O cálculo do percentual de proteína foi realizado através da fórmula:

$$\text{Proteína} = \frac{V \times 0,14 \times 6,25}{P}$$

Onde: V = diferença entre o volume (mL) de ácido sulfúrico 0,1N adicionado e o volume (mL) da solução de NaOH 0,1N gasto na titulação; P = massa da amostra (g).

3.2.2.3. Cinzas

Amostras (4 g) da alga foram pesadas em cadinho de porcelana previamente tarado em balança analítica e em seguida a amostra foi transferida para o forno mufla (Modelo EDGCON 1P) a uma temperatura até 550°C onde se dá a completa mineralização e carbonização da mesma. O teor de cinzas foi obtido através da diferença entre a massa bruta dos cadinhos após a incineração e a massa dos cadinhos tarados, em relação à massa da amostra utilizada (A.O.A.C, 1990).

3.2.2.4. Lipídeos

O teor de lipídeos presente no extrato etéreo obtido a partir da amostra, farinha da alga *G. birdiae*, foi determinado através do método descrito pela A.O.A.C (1990). As amostras secas provenientes da determinação de umidade foram pesadas, transferidas para cartuchos filtrantes, que foram colocados no aparelho extrator (Aparelho de Soxlet, marca FANEM, modelo 308.26), onde foi posto aproximadamente 100mL de hexano como solvente. O período de extração foi completado em 8 horas e, ao final da extração, após a recuperação do solvente adequadamente, os frascos receptores foram transferidos para secar na estufa a 100°C, e depois pesados até ser obtido peso constante. O peso dos lipídeos foi obtido pela diferença entre os pesos dos frascos com a amostra e com o peso da tara.

3.2.2.5. Carboidratos Totais

Os carboidratos totais, presentes na farinha da alga *G. birdiae*, foram obtidos por diferença segundo o método de PEARSON (1976) pelo emprego da seguinte equação:

$$\% \text{ Carboidratos} = (100\% \text{ da matéria seca}) - [(\% \text{ Lipídeos}) + (\% \text{ Cinzas}) + (\% \text{ Proteínas})]$$

3.2.2.6. Fibra Bruta

Esta determinação foi realizada segundo o método de HENNEBERG citado por WINTON & WINTON (1958). À 1,0 g da amostra desengordurada foi adicionado ácido sulfúrico (1,25%) previamente aquecido e, após 30 minutos de aquecimento até alcançar a fervura, essa amostra foi filtrada em papel de filtro quantitativo (faixa preta), previamente aquecido em estufa a 105°C por 1 hora e pesado. Em seguida, o papel com o resíduo foi lavado com água quente até não haver reação básica com o papel indicador de pH. Posteriormente, o resíduo foi lavado por 3 vezes com álcool etílico e 2 vezes com éter etílico. O solvente evaporou e em seguida o papel com o resíduo foi colocado em estufa a 105°C, para secagem, até alcançar um peso constante. Em um cadinho de porcelana previamente tarado, o papel encerrando o resíduo foi a este juntado, queimado em bico de Bunsen, e em seguida incinerado em forno mufla a uma temperatura de 550°C.

O cálculo da fibra bruta foi calculado através da seguinte fórmula:

$$[(P + F + C) - P] - C = F \qquad \% F = \frac{F \times 100}{P}$$

Onde: P = peso do papel; F= fibra; C= cinza.

3.3. Preparação do Extrato Total

A alga marinha vermelha *Gracilaria birdiae*, após descongelamento e secagem em papel de filtro, foi triturada em almofariz de porcelana na presença de nitrogênio líquido e a farinha obtida foi utilizada para extração das proteínas solúveis. O tampão fosfato de sódio 0,02 M, pH 7,0 foi adicionado a essa farinha, na proporção de 1:5 (p/v) e a mistura foi deixada em contato por 4 horas, à temperatura ambiente. Após esse período, a amostra foi filtrada em tecido fino e centrifugada a 14.300 x g, 4 °C por 30 minutos. O resíduo obtido foi desprezado e o sobrenadante, denominado extrato total, foi empregado nos ensaios de atividade hemaglutinante, dosagens de proteínas e carboidratos.

3.4. Determinação de Proteína

As dosagens de proteínas nos extratos protéicos totais de *G.birdiae* foram feitas segundo o método de LOWRY *et al.* (1951). A 1mL da amostra previamente diluída foram adicionados 5 mL do reagente FOLIN C e, após 10 minutos de repouso, foram adicionados 0,5 mL do reagente FOLIN D. Após repouso de 30 minutos, as absorbâncias foram lidas a 750 nm em Espectrofotômetro Spectronic modelo 20 GENESYS. A concentração de proteínas foi estimada com relação a uma curva padrão obtida com albumina sérica bovina (BSA).

3.5. Determinação de Carboidratos Solúveis

O teor de carboidratos foi determinado seguindo o método de DUBOIS *et al.* (1956). Para 1mL da amostra, adicionou-se 1 mL de fenol a 5% e 5 mL de ácido sulfúrico concentrado. Após agitação, a amostra permaneceu em repouso por 15 minutos e as leituras foram feitas a 490 nm em espectrofotômetro Genesys – Spectronic 20. A concentração de carboidratos solúveis foi estimada com relação a uma curva padrão obtida com galactose.

3.6. Determinação da Atividade Hemaglutinante

A atividade hemaglutinante foi determinada através de diluições seriadas em tubos de ensaio. Em cada tubo foram adicionados 100 µl de NaCl 150 mM. No primeiro tubo foram adicionados 100 µl da amostra e, umas séries de diluições duplas foram feitas (1:2, 1:4, 1:8, 1:16, etc.), sendo o tubo completamente homogeneizado antes de cada transferência. A cada diluição foram adicionados 100µl de eritrócitos a 2% e a reação foi incubada à temperatura ambiente por 60 minutos, conforme descrito por MOREIRA e PERRONE (1977). Posteriormente, o material foi centrifugado a 2.000 x g, por 30 segundos e os resultados foram lidos macroscopicamente, sendo o título expresso em Unidade de Hemaglutinação (UH/ mL), que é o inverso da maior diluição da amostra que apresentar nítida aglutinação.

3.7. Extração dos Polissacarídeos

A alga marinha úmida passou por um processo de secagem à temperatura ambiente, exposta ao sol para despigmentação, seguido de maceração com nitrogênio líquido. Depois de triturada, uma amostra de 5 g da alga marinha foi submetida à extração aquosa (0,5 % p/v) sob agitação mecânica, à temperatura de 100 °C por 4 horas. Após essa etapa, o extrato aquoso foi filtrado em tecido de nylon, e ao sobrenadante foi adicionado cloreto de sódio na concentração de 1:1. Em seguida foi adicionado etanol (4:1; etanol:extrato) para precipitação dos polissacarídeos. Por último, o carboidrato foi filtrado (vácuo) em funil de placa sinterizada (n° 2) e seco em acetona P.A. Essa fração obtida a partir da extração a quente foi denominada de G.b. (FIGURA 07).

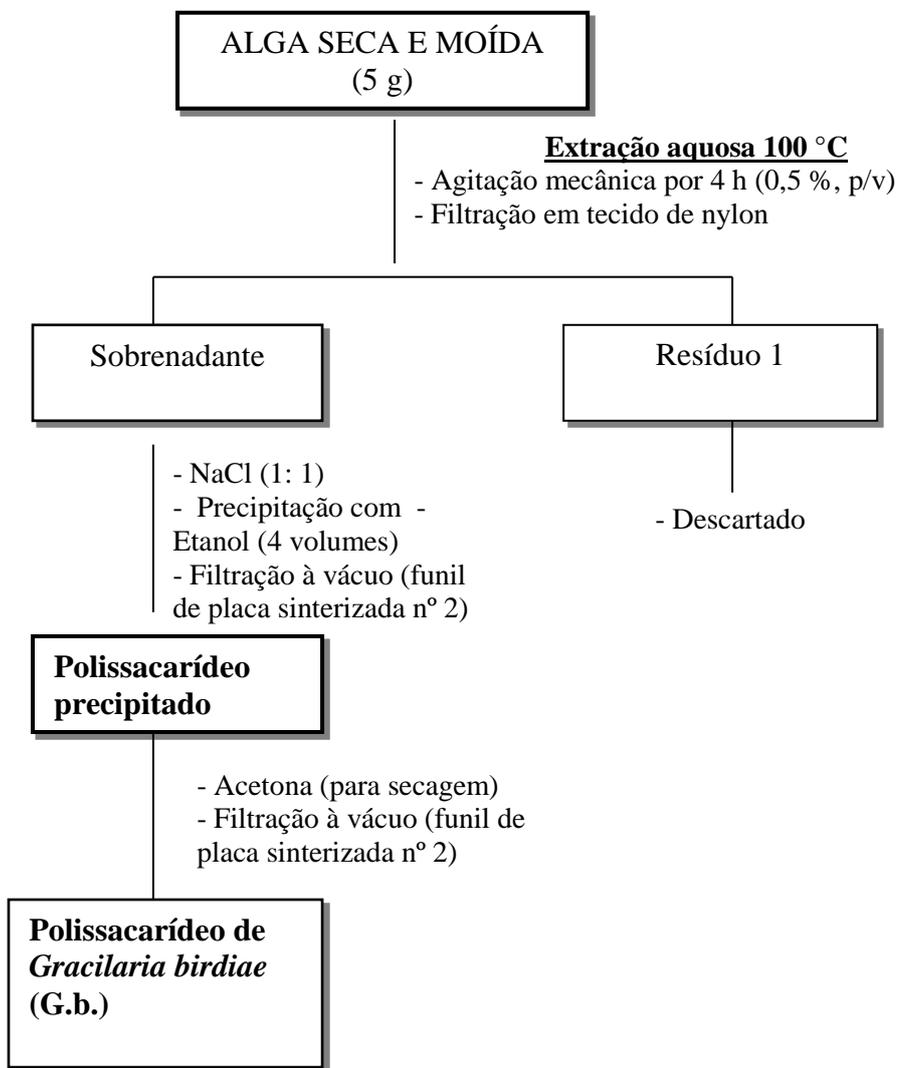


FIGURA 07. Extração aquosa dos polissacarídeos da alga vermelha *Gracilaria birdiae*, a 100 °C.

3.8. Métodos Analíticos para Análise dos Polissacarídeos

3.8.1. Determinação do Rendimento do Polissacarídeo Extraído de *G. birdiae*

O rendimento da extração foi calculado à partir de 5 g da alga seca triturada em nitrogênio líquido. Após a extração e secagem dos polissacarídeos, estes foram pesados em balança analítica e foi calculado o rendimento da extração.

3.8.2. Dosagem de Proteínas

A quantificação de proteínas nas amostras de polissacarídeos foi calculada por microanálise elementar a partir da porcentagem de nitrogênio (%N) usando um fator de correção de 6,25, proposto por MARKS, BAUM e SWAIN (1985).

3.8.3. Dosagem de Sulfato

As dosagens de sulfato nos polissacarídeos de *G. birdiae* extraídos à 100° C foram determinadas por microanálise elementar (Perkin Elmer CHN 2400), proposto por MARKS, BAUM e SWAIN (1985)

3.8.4. Cromatografia de Permeação em Gel (GPC)

A distribuição das massas molares dos polissacarídeos de *G. birdiae* foi determinada por cromatografia de permeação em gel (GPC), em equipamento Shimadzu com detectores de índice de refração e UV-visível a 254 nm, à temperatura ambiente com coluna de Ultrahydrogel (7.8 x 300 mm) e fluxo de 0.5 mL/min. Esse ensaio foi realizado no Departamento de Química da Universidade Federal do Ceará.

Para esse ensaio foi usado uma solução de polissacarídeo de *G. birdiae* 0.5 % e NaNO₃ 0,1 M como solvente. O volume injetado das amostras e dos padrões foi de 50 µL. Amostras de pululan (Shodex Denko) de diferentes massas molares (5.9 x 10³, 1,18 x 10⁴, 4,73 x 10⁴, 2,12 x 10⁵ e 7,8 x 10⁵ g/mol) foram usadas como padrões para a determinação das massas molares.

3.8.5. Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho (FT-IR)

Espectros na região do infravermelho das amostras dos polissacarídeos de *G. birdiae* foram produzidos com espectrofotômetro Shimadzu IR (modelo 8300) na região de 4000 cm^{-1} a 400 cm^{-1} , em pastilhas de KBr.

3.8.6. Ressonância Magnética Nuclear (RMN ^{13}C e ^1H)

Espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) ^{13}C e ^1H foram feitas no Departamento de Química da Universidade Federal do Ceará em espectroscópio da marca Bruker, modelo AVANCE – DRX – 500.

Para a obtenção dos espectros de RMN, uma amostra do polissacarídeo foi dissolvida em água deuterada (D^2O - $\sim 30\text{ mg/mL}^{-1}$) em tubos de diâmetro externo de 5 mm. O ensaio foi realizado a 70° C por 12 horas usando Sodium 2,2 - dimethylsilapentane - 5 - Sulfonate (DSS) como padrão interno (0.00 ppm para ^1H).

4. Resultados e discussão

4.1. Composição Elementar da Farinha da Alga Marinha *Gracilaria birdiae*

A literatura sobre a constituição química das algas marinhas é escassa, porém, alguns dados já foram publicados para espécies de algas marinhas da costa cearense. No presente trabalho realizamos esta análise durante um ano, da espécie cultivada *Gracilaria birdiae*, visando verificar principalmente, a variação do teor protéico bruto, fibra bruta e de carboidratos. Os dados desta análise em *G. birdiae*, servirão de base para estudos posteriores com relação a sua utilização.

As propriedades nutricionais das algas normalmente são avaliadas a partir de sua composição química. A alga marinha vermelha *G. birdiae*, quando analisada em relação a sua composição mínima (TABELA 03), demonstrou um maior conteúdo de carboidratos, com percentuais menores de proteína bruta, resíduo mineral, fibra bruta e lipídeos. Os resultados obtidos para essa espécie concordam com os obtidos para *Enantiocladia duperreyi* (BENEVIDES *et al.*, 1998), *Solieria filiformes* (BENEVIDES *et al.*, 1996) e *Vidalia obtusiloba* (MELO, 2000).

O estudo de sazonalidade de *G. birdiae* (FIGURA 07) revelou uma variação muito pequena no percentual de matéria seca, com o menor valor (11,57%) em novembro/06 e o maior valor (15,34%) em março/07. O conteúdo de proteína bruta, apesar de pequeno, variou ao longo do período investigado, apresentando valores mais elevados e comparáveis entre os meses de julho a novembro de 2006, com uma média de 12,58% e nos meses subsequentes (entre dezembro/06 a março/07) os valores foram menores, apresentando média em torno de 7,68%. BENEVIDES *et al.* (1999), ao estudarem a variação sazonal da composição química de duas espécies de algas vermelhas, encontraram para *Gracilaria domingensis*, uma variação pequena no teor de proteínas totais ao longo do período de estudo, enquanto que para *Gelidium pusillum*, observaram uma variação mais expressiva para o conteúdo de proteínas totais ao longo do mesmo período, com valor máximo de 8,9% em Fevereiro e Outubro de 1994. MELO (2000) ao investigar a variação sazonal da alga marinha *Vidalia obtusiloba*, encontrou uma ampla faixa de variação no conteúdo de proteínas totais (2,62% – 23,13%) e atribuiu este resultado, ao ciclo reprodutivo da alga, já que ela passa sucessivamente pelas formas gametofíticas (haplóide) e esporofíticas (diplóide),

contendo estruturalmente diferentes proteínas. Segundo MARINHO-SORIANO (2006) o conteúdo de proteína está positivamente relacionado com os níveis de nitrogênio e negativamente relacionado com a temperatura da água e a salinidade. No que diz respeito ao teor de lipídeos de *G. birdiae*, foi observado em julho/06, 2,99% de lipídeos na matéria seca enquanto que em abril/07 o conteúdo de lipídeos praticamente desapareceu (0,03%). O maior valor de fibra bruta também foi encontrado em julho/06 (9,91%) e o menor valor ocorreu em abril/07 (6,52%). O conteúdo de resíduo mineral aumentou aproximadamente 2,67 vezes de abril/06 (4,24%) a dezembro/06 (11,35%). Para carboidrato total, obtido por diferença, a variação foi quase imperceptível, tendo em novembro/06 (77,2%) seu menor valor e em abril/06 (87,48%) seu valor máximo. ROSEMBERG & RAMUS (1982) relatam que o aumento da síntese de carboidrato está relacionado com o período de máximo crescimento (biomassa) do organismo (algas), com o aumento de sua atividade fotossintética e com a redução no conteúdo de proteínas (dados não mostrados). A FIGURA 09 mostra que o teor de proteína bruta variou inversamente ao conteúdo de carboidrato, ou seja, nos meses em que a síntese de proteína foi maior, a síntese de carboidrato foi menor e nos meses em que a síntese de proteína diminuiu, a de carboidrato aumentou. Esse resultado obtido para *G. birdiae* concorda com os obtidos para *Gracilaria cervicornis* e *Sargassum vulgare* (MARINHO-SORIANO, 2006), onde os autores confirmam que o período de maior síntese de carboidrato é marcado pelo aumento da temperatura, da salinidade e da intensidade de luz solar. A TABELA 04 mostra valores da composição química de outras espécies de algas.

TABELA 03. Análise centesimal da farinha da alga *Gracilaria birdiae*.

Mês	Umidade (%)	Matéria seca (%)	Proteína Bruta (%)	Extrato Etéreo (%)	Fibra Bruta (%)	Cinzas (%)	Carboidrato (diferença) (%)	Energia (Kcal/Kg)
Abril/06	86,31	13,69	7,48	0,80	7,59	4,24	87,48	3567,00
Mai/06	85,43	14,57	8,22	0,65	7,04	4,47	86,66	3523,00
Junho/06	87,79	12,21	8,92	1,02	8,53	6,38	83,68	4104,01
Julho/06	85,95	14,05	13,68	2,99	9,91	5,05	78,28	4160,43
Agosto/06	87,59	12,41	11,88	1,5	8,66	5,53	81,09	4139,75
Setembro/06	88,26	11,74	12,52	0,94	7,88	5,63	80,91	3971,02
Outubro/06	88,36	11,64	12,40	1,38	8,34	5,09	81,13	4323,54
Novembro/06	88,43	11,57	12,42	0,40	8,65	9,98	77,20	4002,71
Dezembro/06	86,49	13,51	7,10	0,40	8,35	11,35	81,15	4080,08
Janeiro/07	87,97	12,03	6,46	0,54	8,85	7,50	85,50	4029,63
Fevereiro/07	87,18	12,82	10,06	0,55	8,70	4,67	84,72	4153,21
Março/07	84,66	15,34	7,12	0,27	8,41	5,39	87,22	5362,04
Abril/07	85,71	14,29	12,95	0,03	6,52	8,07	78,95	5528,78
Média			10,09 ± 2,58	0,88± 0,74	8,26± 0,84	6,41± 2,16	82,61± 3,42	

Resultados com base na Matéria Seca.

TABELA 04. Análise química de diferentes espécies de algas relacionadas por vários autores.

Espécies	Umidade Umidade (%)	Proteína Bruta (%)	Extrato Etéreo (%)	Fibra Bruta (%)	Resíduo Mineral (%)	Carboidrato (diferença) (%)
<i>Ulva rígida</i> (a)		6,40	0,30		52,00	18,10
<i>Gelidium pristoides</i> (a)		11,80	0,90		14,00	43,10
<i>Caulerpa racemosa</i> (b)		3,98		1,36	55,11	3,60
<i>Sargassum filipendula</i> (b)		8,72		6,57	44,29	3,73
<i>Gracilaria córnea</i> (b)		5,47		5,21	29,06	36,29
<i>Ulva lactuca</i> (c)	10,60	7,06	1,64		55,40	14,60
<i>Hypnea japonica</i> (c)	9,95	19,00	1,42			4,28
<i>Porphyra tenera</i> (d)		34,20	0,70	4,80	8,70	40,70
<i>Enteromorpha sp.</i> (e)	9,00	9,45			36,38	
<i>Gracilaria cervicornis</i> (f)	14,33	22,96	0,43	5,65	7,72	63,12
<i>Sargassum vulgare</i> (f)	14,66	15,76	0,45	7,73	14,20	67,80

Resultados com base na Matéria Seca.

(a) Foster and Hodgson (1998).

(b) Robledo and Freile-Pelegrin (1997).

(c) Wong and Cheung (2000).

(d) Arasaki and Arasaki (1983).

(e) Aguilera-Morales et al. (2005).

(f) Marinho-Soriano et al. (2006).

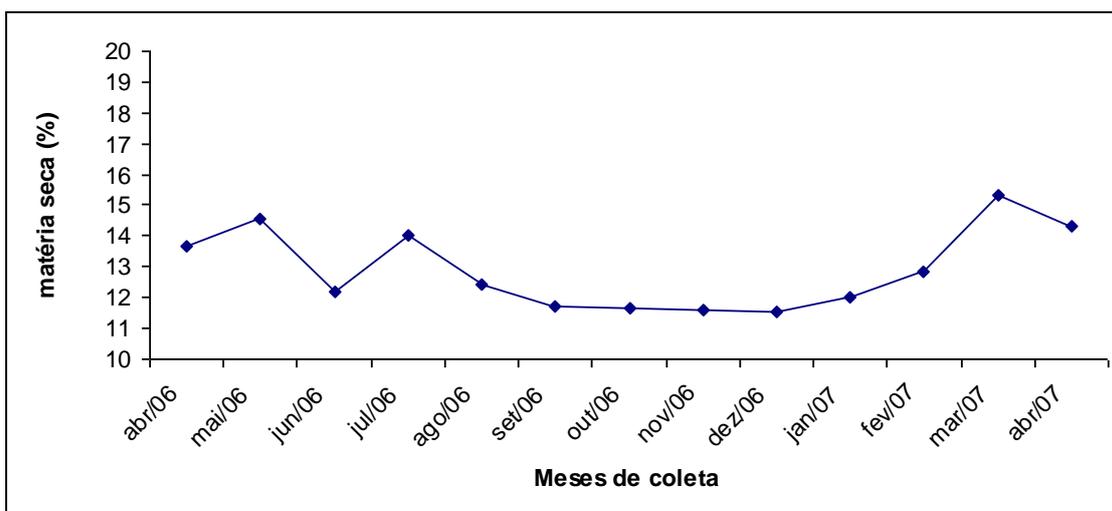


FIGURA 08. Variação em porcentagem de matéria seca de *G. birdiae*

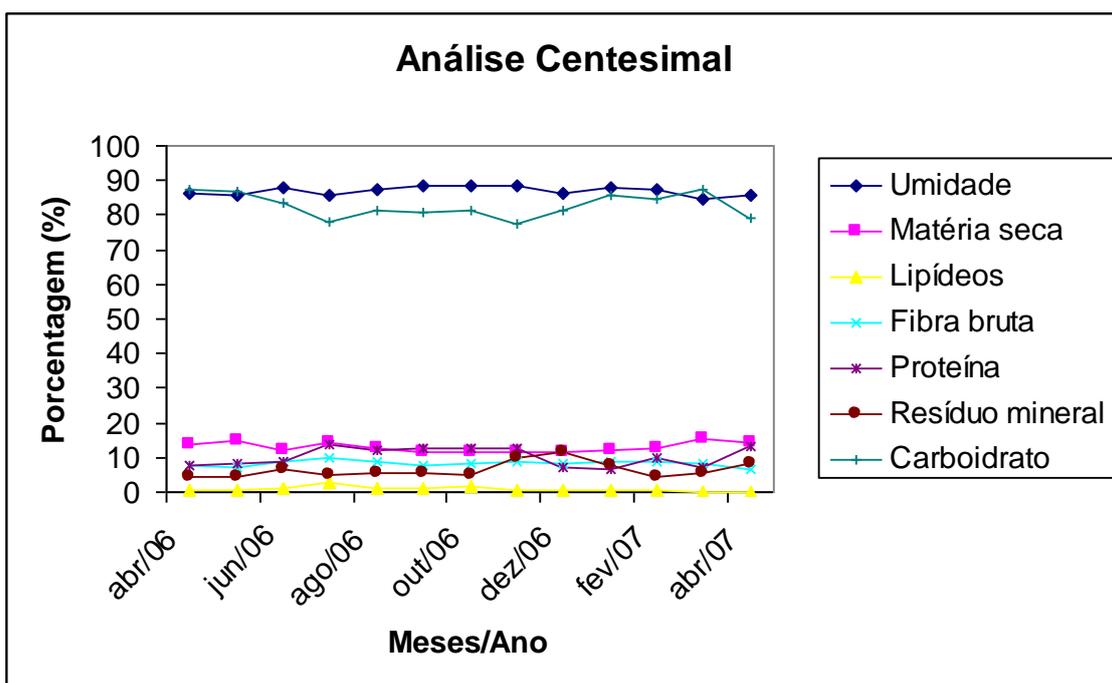


FIGURA 09. Análise centesimal da farinha da alga *G. birdiae* (em porcentagem de matéria seca).

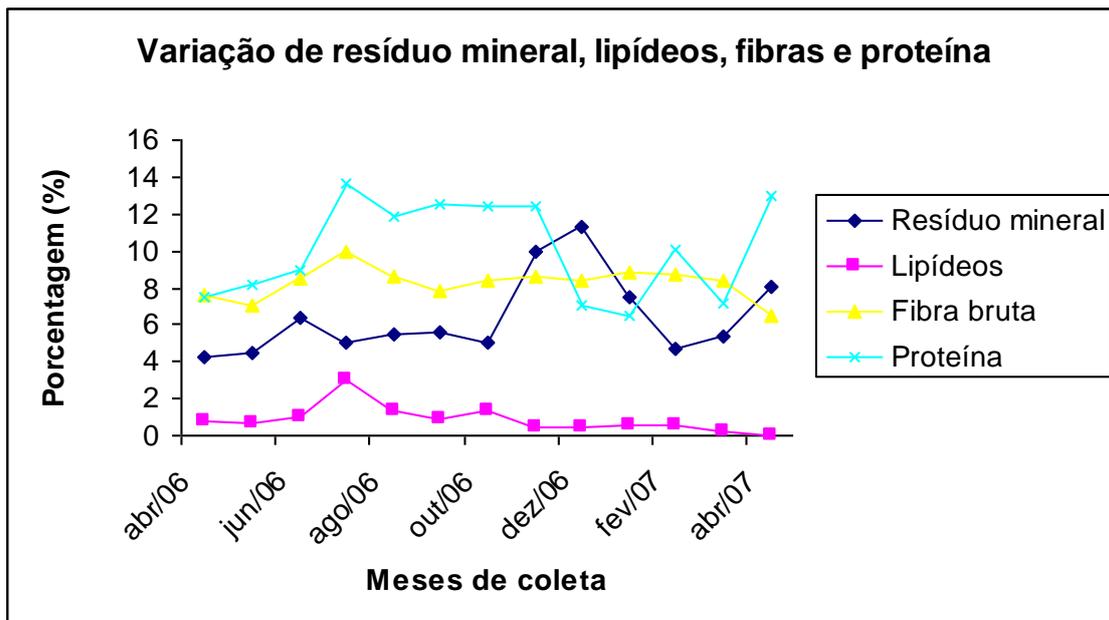


FIGURA 10. Variação nos teores de lipídeo, fibra bruta, proteína e resíduo mineral de *G. birdiae*.

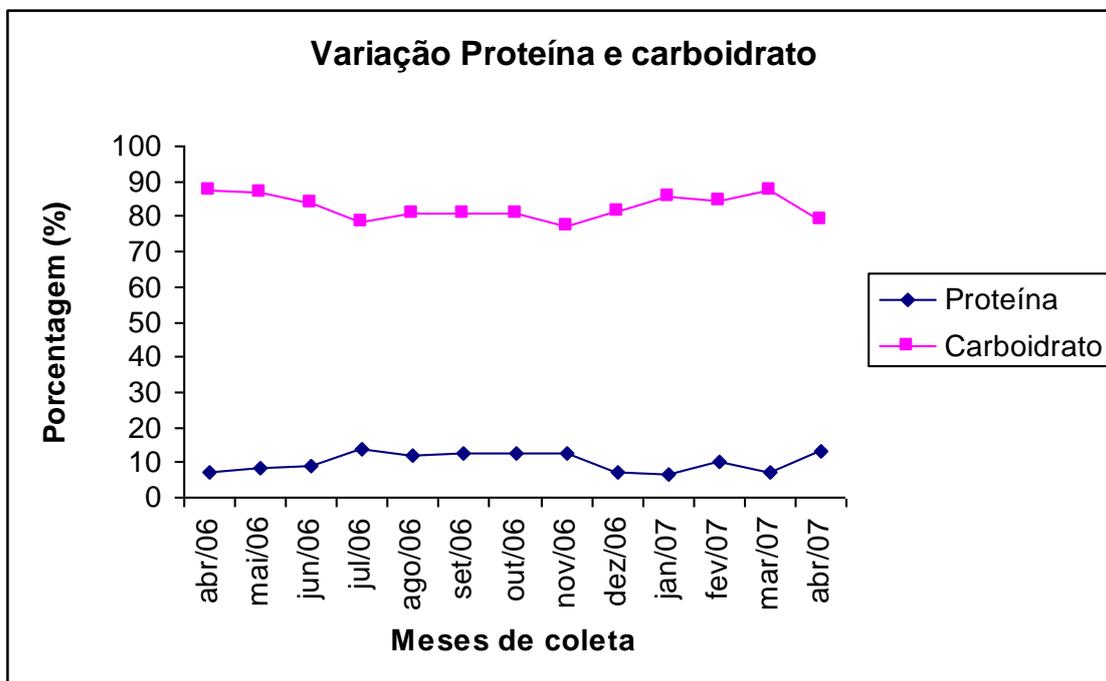


FIGURA 11. Variação no conteúdo de proteína e carboidrato presente na alga *G. birdiae*

4.2. Atividade Hemaglutinante Específica do Extrato Protéico (1:5) de *G. birdiae*.

O estudo da variação sazonal no extrato protéico com base na quantidade de proteínas solúveis e na atividade hemaglutinante (TABELA 05) revelou uma pequena variação no teor de proteínas solúveis, com valor máximo (0,94 mgP/mL) em novembro/06 e mínimo no mês de dezembro/06 (0,39 mgP/mL), uma redução de aproximadamente 2,41 vezes. Em geral, a atividade hemaglutinante observada em *Gracilaria birdiae* é fraca (título variando de $2^2 - 2^4$), porém, ela esteve presente ao longo de todo o período estudado, com exceção no mês de dezembro/06. A atividade hemaglutinante específica foi menor no mês de maio/06 (2,79 U.H./mgP), enquanto que no mês de junho/07 houve um aumento acentuado (33,05 U.H./mgP). Com esse resultado, observa-se que mesmo que as proteínas solúveis tenham apresentado teores mais baixos (0,484 mgP/mL) no mês de junho/07, as proteínas capazes de causar aglutinação de suspensões de eritrócitos de galinha tratados com tripsina (atividade hemaglutinante específica) se mostraram mais ativas nesse mês. CHILES & BIRD (1989) observaram que muitos dos ensaios feitos para detecção de lectinas em algas marinhas, tiveram resultados errôneos, devido a presença de inibidores protéicos endógenos em concentrações variáveis nos extratos. Esta afirmação pode justificar o fato de que concentrações menores de proteínas solúveis no extrato protéico do mês de junho/06 de *G. birdiae*, terem apresentado atividade hemaglutinante específica mais elevada.

TABELA 05. Dosagem de proteínas (Lowry) e atividade hemaglutinante específica do extrato protéico de *G. birdiae*.

Mês	Volume (mL)	Proteína Solúvel (mg/mL)	Atividade U.H.Total	Hemaglutinante U.H/mgP
Abril/06	25	0,425	100	9,41
Mai/06	25	0,717	50	2,79
Junho/06	25	0,870	400	18,39
Julho/06	25	0,752	100	5,32
Agosto/06	25	0,716	100	5,58
Setembro/06	25	0,420	200	19,04
Outubro/06	25	0,597	50	3,35
Novembro/06	25	0,940	200	8,51
Dezembro/06	25	0,390	S/A	S/A
Janeiro/07	25	0,516	100	7,75
Fevereiro/07	25	0,400	100	10,00
Março/07	25	0,515	200	15,53
Abril/07	25	0,568	400	28,17

- Dosagens feitas no extrato protéico na concentração de 1:5.

- Atividade hemaglutinante testado no extrato protéico de *G. birdiae* na concentração de 1:5, utilizando sangue de galinha tratado com tripsina.

- S/A: Sem atividade.

4.3. Variação Sazonal do Polissacarídeo de *G. birdiae*.

4.3.1. Rendimento do Polissacarídeo Extraído de *G. birdiae*.

Algas da espécie *Gracilaria birdiae* foram coletadas no período de dezembro/06 a novembro/07 em uma fazenda de crescimento na praia de Flecheiras/Trairi. O polissacarídeo extraído a quente (100°C por 4 h), apresentou rendimento bastante elevado (FIGURA 12) com um rendimento médio de 56,5%. Durante o período avaliado o maior rendimento foi observado no mês de agosto/07 (72%) e o menor no mês de setembro/07 (41,8%). Se comparado com o polissacarídeo da mesma alga utilizando a extração a frio, observa-se um aumento de 8,7 vezes. Esse elevado teor de polissacarídeo extraído de *G. birdiae* por este método, indica uma boa vantagem para extração comercial de agaras desta espécie de alga. MARINHO-SORIANO (2003), estudando o efeito da sazonalidade, no rendimento de ágar de das espécies *Gracilaria gracilis* (máximo - 30% e mínimo – 19%) e *Gracilaria bursa-pastoris* (máximo - 36% e mínimo – 23%) observou que o maior rendimento ocorreu no verão e na primavera, onde também foi observado os maiores valores de temperatura e salinidade. Dessa forma, os autores sugeriram que esses dois parâmetros podem influenciar na biossíntese de ágar.

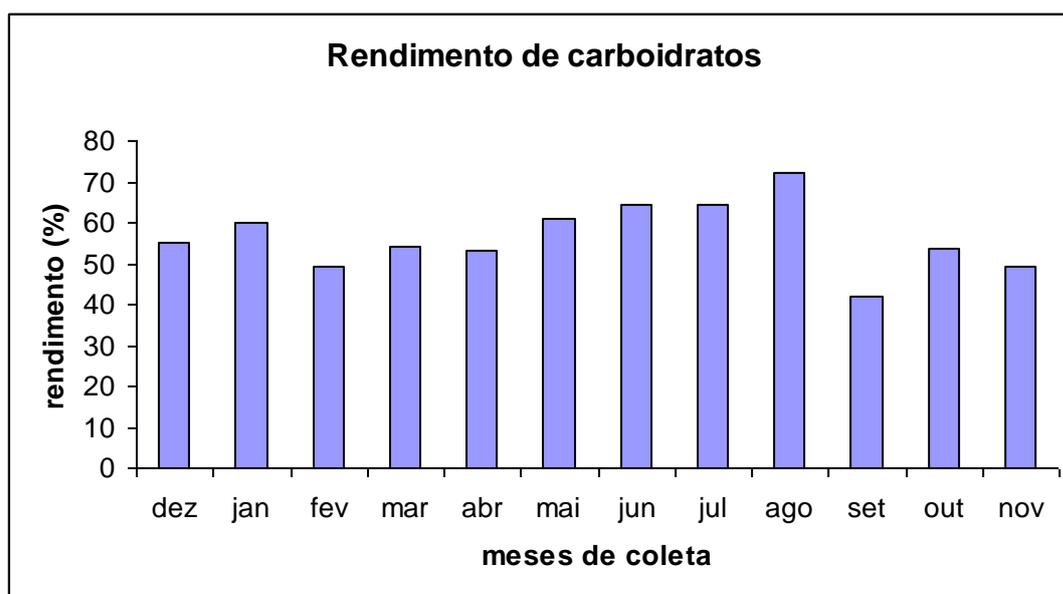


FIGURA 12. Rendimento dos polissacarídeos de *G. birdiae* extraídos em diferentes períodos.

TABELA 06. Rendimento e Dosagem de Carboidratos Solúveis do Polissacarídeo de *Gracilaria birdiae*

Mês/Ano	Rendimento(%)	Carboidrato*		Umidade(%)
		(mgC/mL)	(%)	
Dezembro/06	55,0	0,850	93	8,6
Janeiro/07	59,8	0,768	82	6,3
Fevereiro/07	49,5	0,809	87	7,0
Março/07	54,0	0,834	90	7,3
Abril/07	53,2	0,768	86	10,7
Mai/07	61,2	0,890	97	8,2
Junho/07	64,4	0,577	63	8,3
Julho/07	64,4	0,612	67	8,7
Agosto/07	72,0	0,561	62	9,5
Setembro/07	41,8	0,535	59	9,3
Outubro/07	53,6	0,603	67	10,0
Novembro/07	49,4	0,607	67	9,4

* Valores corrigidos com base na umidade.

TABELA 07. Rendimento de ágar de algumas espécies de *Gracilaria*

Espécie	Rendim.(%)	Localidade	Fonte
<i>G. dura</i>	32 – 35 ^a	França	Marinho-Soriano;Bourret, 2005.
<i>G. cervicornis</i>	11 – 20 ^b	Brasil (RN)	Marinho-Soriano, 2001.
<i>G. cervicornis</i>	39,3	México	Freire-Peregrin;Murano, 2005.
<i>G. corticata</i>	21,8	Madagascar	Adriamanantoanina <i>et al.</i> , 2007.
<i>G. fisheri</i>	13,3	Tailândia	Praiboon <i>et al.</i> ,2006.
<i>G. edulis</i>	10,9	Tailândia	Praiboon <i>et al.</i> ,2006.
<i>Gracilaria sp.</i>	39,4	Japão	Praiboon <i>et al.</i> ,2006.
<i>G. gracilis</i>	11,1 – 18,7 ^c	França	Mollet;Rahaoui;Lemoine, 1998.
<i>G. bursa-pastoris</i>	34,8	França	Marinho-Soriano, 2001
<i>G. dura</i>	33,5	França	Marinho-Soriano, 2001
<i>G. gracilis</i>	30,0	França	Marinho-Soriano, 2001
<i>G. salicornia</i>	30,2	Tanzânia	Buriyo; Kivaisi, 2003
<i>G. cornea</i>	29 - 41	Brasil (RN)	Marinho-Soriano, 2001.
<i>G. cornea</i>	21,4	Brasil (CE)	Melo <i>et al.</i> , 2002.
<i>G. bursa-pastoris</i>	36,5 – 38,3 ^d	França	Marinho-Soriano <i>et al.</i> , 1999.
<i>G. birdiae</i>	6,5	Brasil (CE)	Maciel <i>et al.</i> , 2008.

a: Máximo mês de outubro e mínimo no mês de junho

b:Máximo e mínimo na estação seca

c: Máximo mês de março e mínimo mês de abril

d: Extração a partir do estágio vegetativo e reprodutivo da alga, respectivamente.

4.3.2. Microanálise Elementar do Polissacarídeo Extraído de *G. birdiae*.

O teor médio de proteínas (TABELA 08) é bastante inferior ao observado para o extraído da mesma alga a frio (7,6%), provavelmente devido a maior solubilização do polissacarídeo à quente do que da proteína. HOLANDA (2007) estudando a alga vermelha *Solieria filiformes* também encontrou um baixo teor de proteína (5,5%) na fração extraída a quente (90°C – 4h). O grau de sulfatação (GS) foi calculado com base na metodologia utilizada por Maciel (2008), levando em consideração a %S e %C obtida por microanálise. O GS é definido como o número de OSO_3^- átomos de enxofre por unidade dissacarídica, a qual possui 12 átomos de carbono.

$$\text{GS} = (\%S / \text{massa molar de S}) / (\%C / \text{massa molar de C} \times 12) = 4,5 \times (\%S / \%C)$$

O grau de sulfatação (GS) médio determinado (0,15) é menor do que o determinado por MACIEL *et al.* (2008), na extração a frio, que foi de 0,22, o que indica uma diminuição na proporção do precursor biológico da agarana, onde os grupos sulfatos estão presente no carbono -6 da α -L-galactose. A tabela 9 mostra o conteúdo de NaSO₃ para várias espécies de *Gracilaria*. O teor médio de NaSO₃ é similar ao obtido por CRAIGIE *et al.* (1984) para *G. tikvahiae* e inferior ao encontrado em muitos polissacarídeos extraídos de espécies de *Gracilaria*.

TABELA 08. Microanálise do polissacarídeo extraído a 100°C de *Gracilaria birdiae*

Amostras	% S	GS	NaSO ₃	% C	% H	% N	Proteína
			(%p/p)				%
DEZ/06	1,47	0,17	4,70	39,70	6,73	0,36	2,30
JAN/07	1,62	0,19	5,20	38,90	6,30	0,55	3,40
FEV/07	1,33	0,15	4,30	39,80	6,40	0,56	3,51
MAR/07	0,99	0,11	4,20	40,40	6,80	0,51	3,20
ABR/07	1,39	0,15	4,50	40,50	6,90	1,71	10,70
MAI/07	1,35	0,15	4,30	40,10	6,30	0,64	4,00
JUN/07	1,22	0,14	3,90	39,30	6,70	0,63	4,00
JUL/07	1,28	0,14	4,10	40,10	7,08	0,82	5,13
AGO/07	1,02	0,11	3,30	41,07	7,17	0,73	4,60
SET/07	1,60	0,18	5,12	39,93	6,86	0,92	5,80
OUT/07	1,40	0,15	4,50	40,55	7,00	0,76	4,80
NOV/07	1,50	0,17	4,80	39,55	7,04	0,81	5,10

TABELA 09. Comparação com ágaros de diferentes espécies de *Gracilaria*

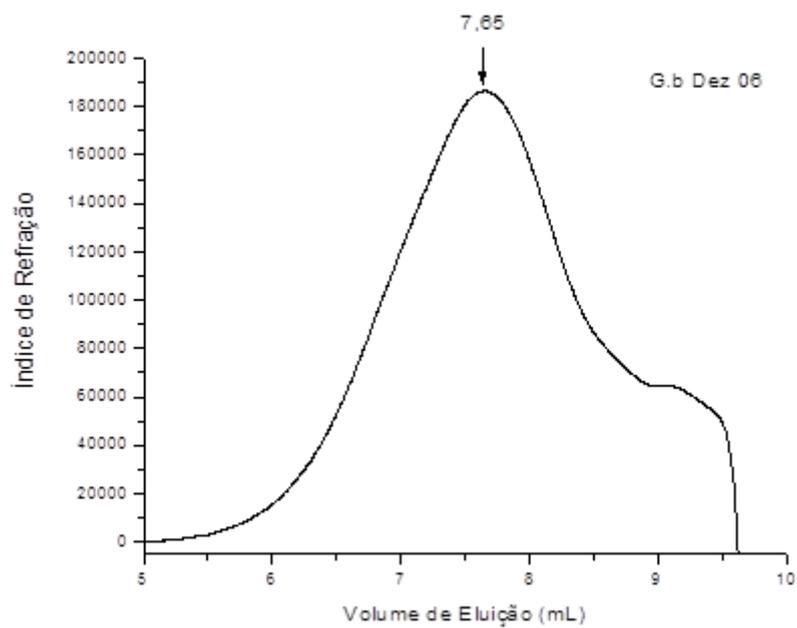
Polissacarídeo	NaSO ₃ (% p/p)	Referências
<i>G. tikvahiae</i>	4,3	Craigie <i>et al.</i> (1984)
<i>G. sjoestedtii</i>	2,3	Craigie <i>et al.</i> (1984)
<i>G. textorii</i>	13,9	Craigie <i>et al.</i> (1984)
<i>G. dominguensis</i>	7,6	Valiente <i>et al.</i> (1992)
<i>G. mammillaris</i>	8,9	Valiente <i>et al.</i> (1992)
<i>G. cornea</i>	4,8	Melo <i>et al.</i> (2002)
<i>G. birdiae</i>	6,4	Maciel <i>et al.</i> (2008)

4.4. Cromatografia de Permeação em Gel (GPC)

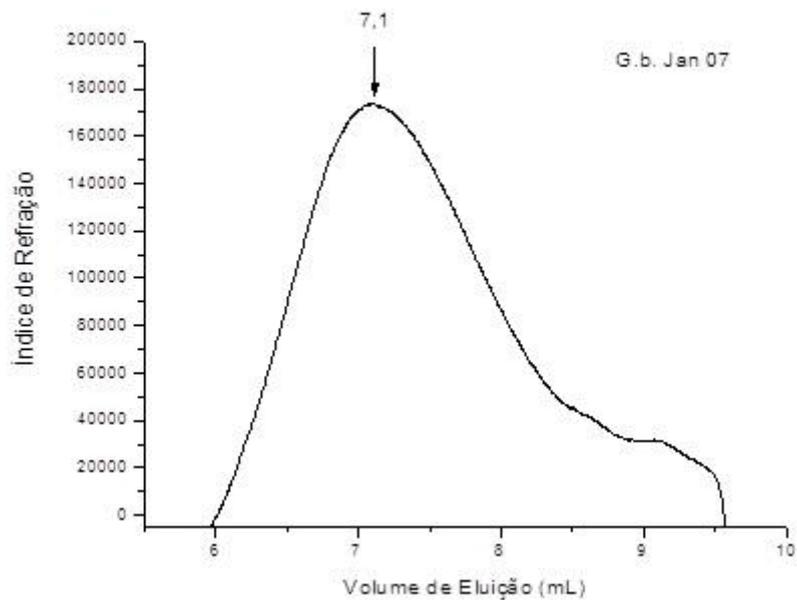
Polissacarídeos são macromoléculas polidispersas quanto à massa molar, ou seja, não possuem massa molar precisamente definida. Dessa forma, a massa molar dos polissacarídeos é representada pela média da massa molecular dos polímeros semelhantes na estrutura, pois variam com o tamanho da cadeia (STANLEY, 1995).

Os cromatogramas de GPC do polissacarídeo de *G. birdiae* extraído a 100° C estão apresentados na FIGURA 13 (a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, l, m). Em geral, são observados um pico principal, em aproximadamente 7,58 mL e um ombro em aproximadamente 9,2 mL de volume de eluição, com exceção dos meses de agosto, outubro e novembro de 2007, que apresentaram cromatogramas com pico principal em aproximadamente 8,27 mL de volume de eluição, detectados pelo índice de refração. As massas molares dos picos foram estimadas a partir da equação $\log M_w = 12,65 - 0,96 V_e$, onde V_e corresponde ao volume de eluição. O coeficiente de correlação linear para essa reta foi 0,9980.

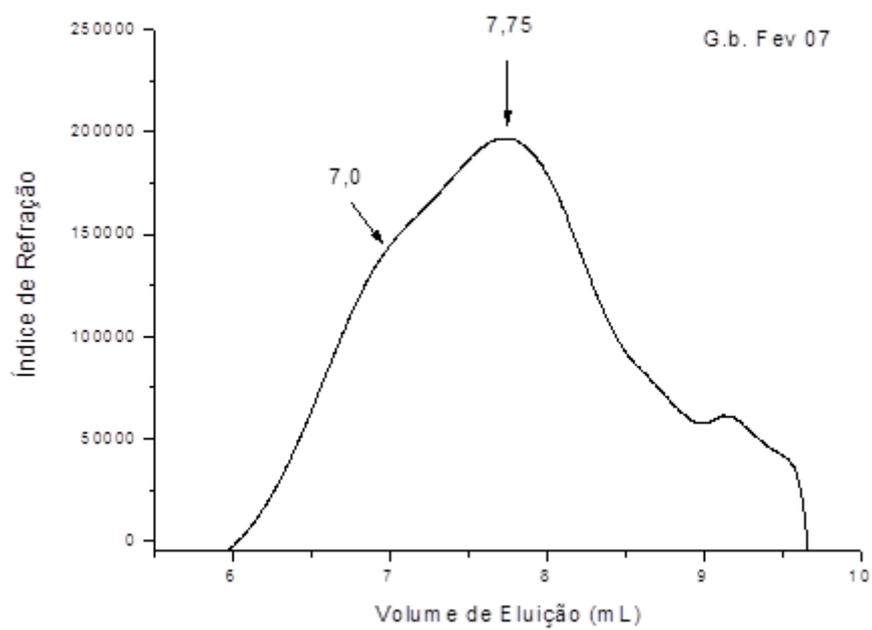
Os cromatogramas de GPC para o polissacarídeo extraído a 100° C, apresentaram altas massas molares (tabela 10), variando de $0,24 \times 10^4$ a $8,51 \times 10^5$ g/mol. O polissacarídeo de *G. birdiae* comporta-se como um sistema polidisperso (picos largos) semelhante a outros polissacarídeos de algas, como *G. cornea* (MELO *et al.*, 2002) , *Solieria filiformis* (Holanda, 2007) e *Botryocladia occidentalis* (FARIAS *et al.*, 2000).



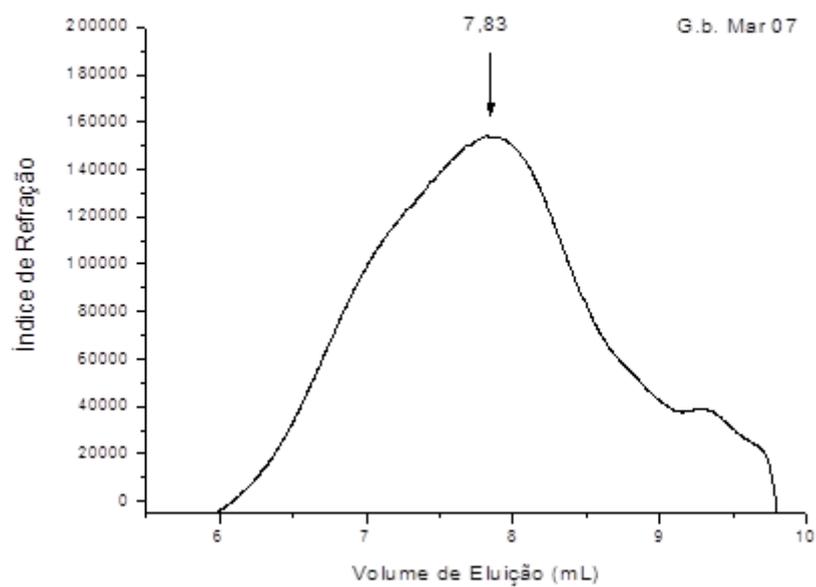
(a)



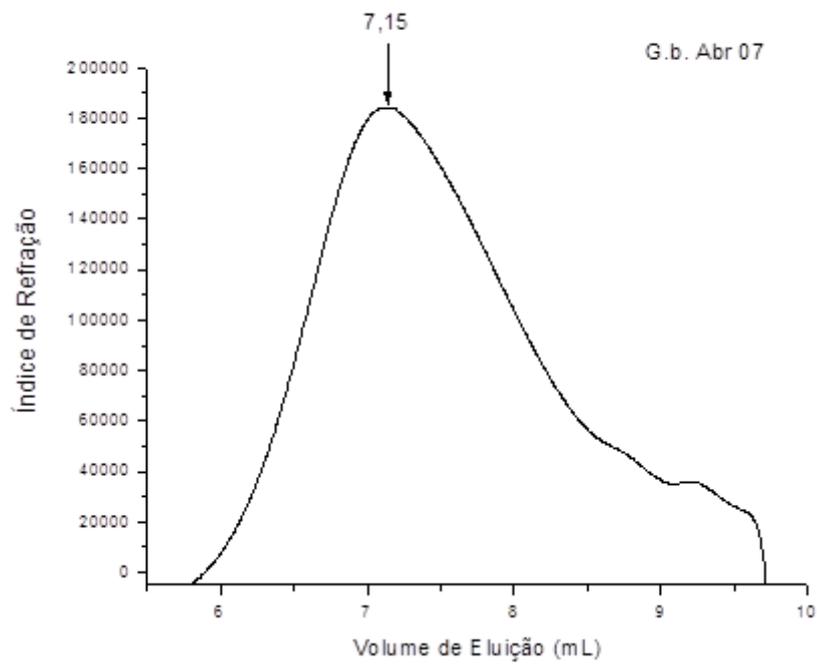
(b)



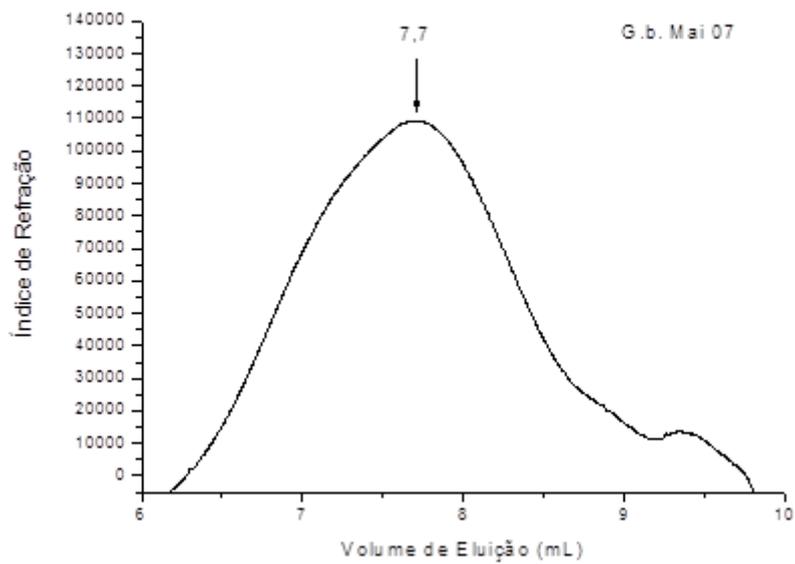
(c)



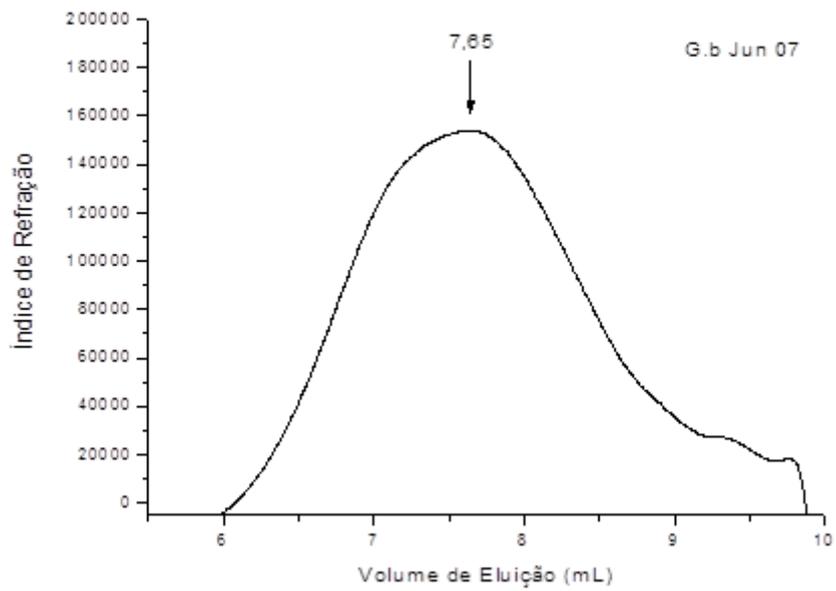
(d)



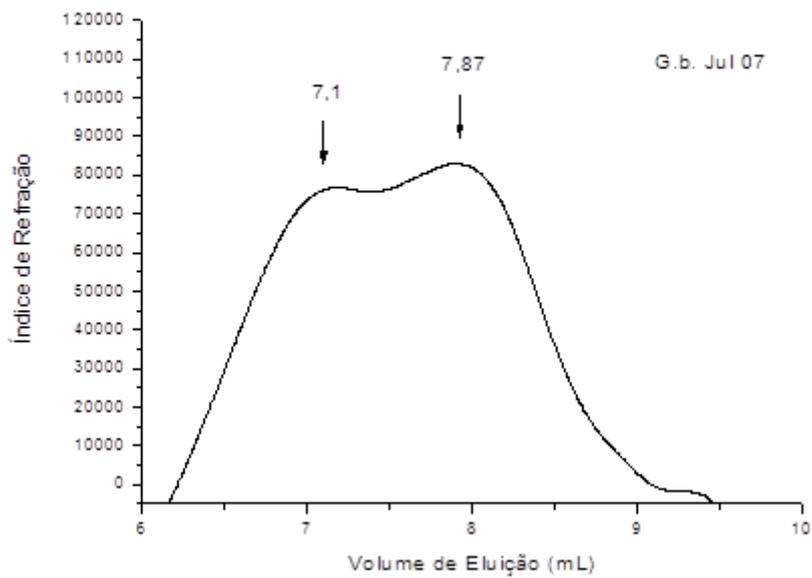
(e)



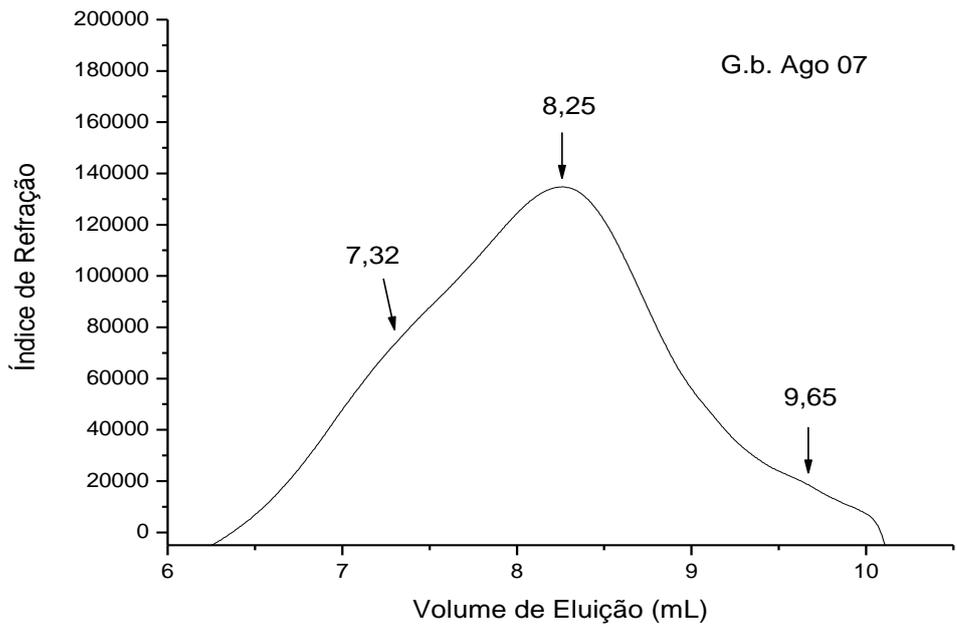
(f)



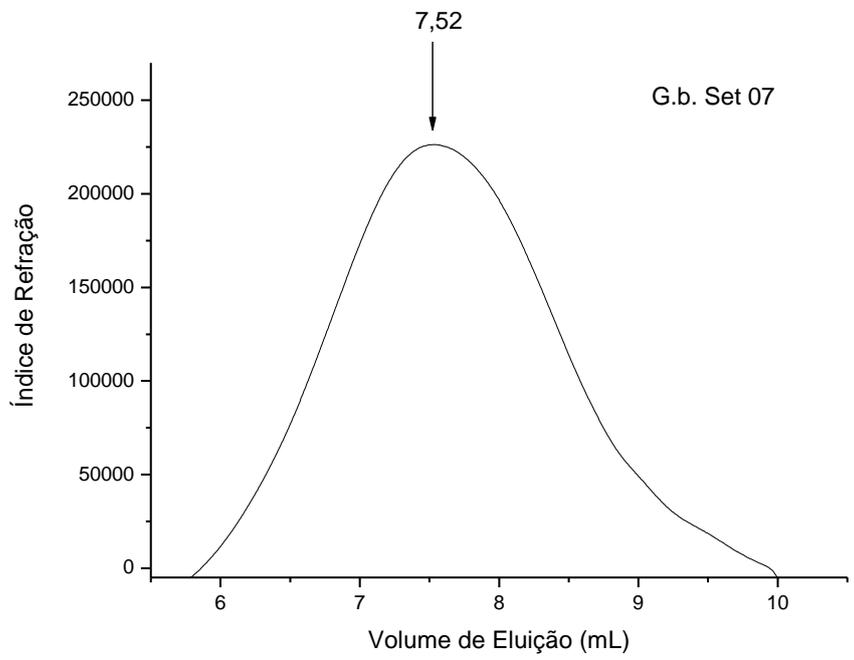
(g)



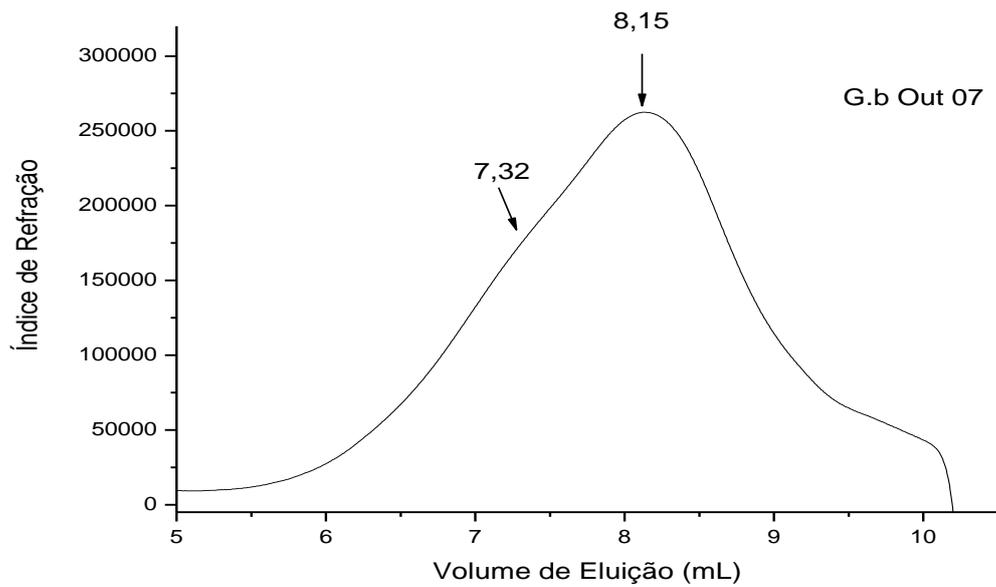
(h)



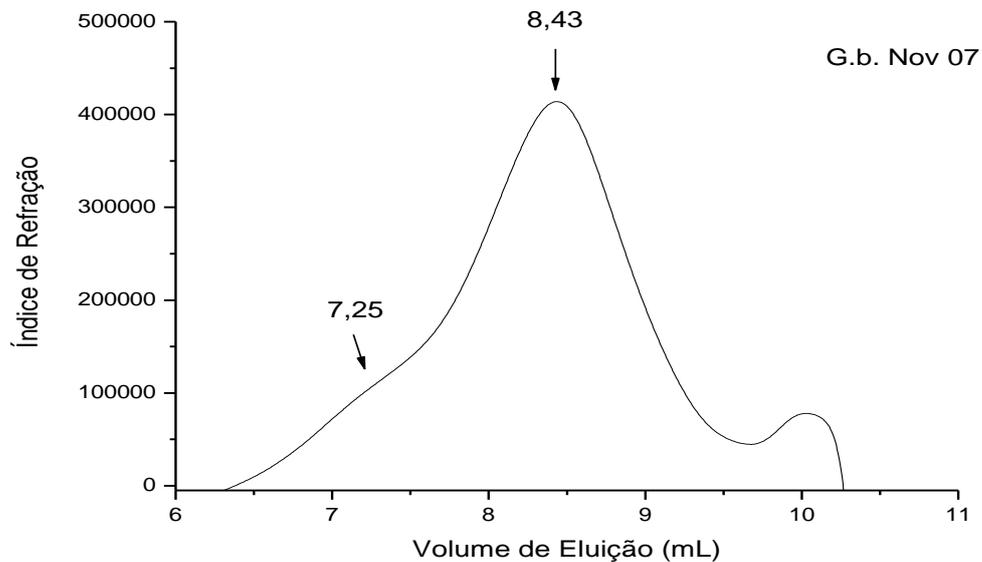
(i)



(j)



(l)



(m)

FIGURA 13. Cromatograma de Permeação em Gel (GPC) do polissacarídeo de *G. birdiae* extraído a 100°C. (a) *G. birdiae* dez/06, (b) *G. birdiae* jan/07, (c) *G. birdiae* fev/07, (d) *G. birdiae* mar/07, (e) *G. birdiae* abr/07, (f) *G. birdiae* mai/07, (g) *G. birdiae* jun/07, (h) *G. birdiae* jul/07, (i) *G. birdiae* ago/07, (j) *G. birdiae* set/07, (l) *G. birdiae* out/07, (m) *G. birdiae* nov/07.

TABELA 10: Massas molares de cada pico das extrações de polissacarídeos de *G. birdiae* a 100° C.

Frações	Picos	Volume de Eluição (mL)	Massa Molar (g/mol)
G.b. dez/06	I	7,65	2,02 x 10 ⁵
G.b. jan/07	I	7,10	6,82 x 10 ⁵
G.b. fev/07	I	7,00	8,51 x 10 ⁵
	II	7,75	1,62 x 10 ⁵
G.b. mar/07	I	7,83	1,35 x 10 ⁵
G.b. abr/07	I	7,15	6,11 x 10 ⁵
G.b. mai/07	I	7,7	1,81 x 10 ⁵
G.b. jun/07	I	7,65	2,02 x 10 ⁵
G.b. jul/07	I	7,10	6,82 x 10 ⁵
	II	7,87	1,24 x 10 ⁵
G.b. ago/07	I	7,32	4,23 x 10 ⁵
	II	8,25	5,37 x 10 ⁴
G.b. set/07	I	7,52	2,7 x 10 ⁵
G.b. out/07	I	7,32	4,23 x 10 ⁵
	II	8,15	6,7 x 10 ⁴
G.b. nov/07	I	7,25	4,9 x 10 ⁵
	II	8,43	3,6 x 10 ⁴

4.5. Espectroscopia por Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

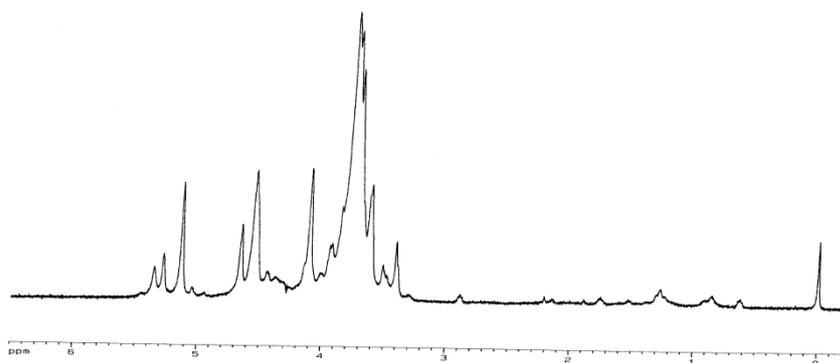
Os espectros de ressonância magnética nuclear foram utilizados para investigar a estrutura dos polissacarídeos extraídos a quente (100°C) da alga *G. birdiae*. A FIGURA 14 (a, b e c) mostra os espectros de RMN de próton para os polissacarídeos extraídos nos meses de janeiro, abril e agosto de 2007. Os sinais de ^1H foram atribuídos comparando-os com os dados obtidos por MACIEL *et al.* (2008) para o polissacarídeo de *G. birdiae* extraído a frio.

Os sinais devido aos prótons anoméricos em δ 5,14 e 5,28 foram atribuídos a 3,6 α -L-anidrogactose (LA) e α -L-gactose-6-sulfato (L-6S), respectivamente. O resíduo L-6S é um precursor biológico do LA. Os prótons anoméricos referentes a β -D-gactose (G') ligada a α -L-gactose-6-sulfato (L-6S) e o da β -D-gactose (G) ligada a 3,6 α -L-anidrogactose (LA) estão em $\sim \delta$ 4,45 e 4,55 respectivamente.

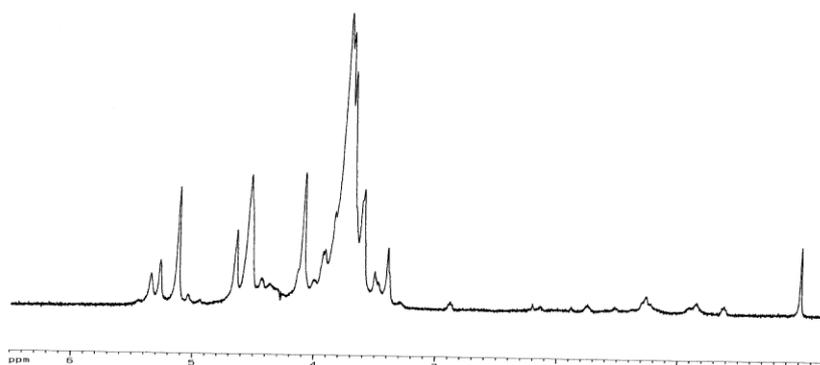
A partir da TABELA 11, é possível fazer um comparativo entre a razão molar do resíduo LA e L-6S dos três meses investigados. A razão molar foi obtida dividindo-se a área do sinal referente a LA (δ 5,14) pela área do sinal referente a L-6S (δ 5,28). Observa-se que o polissacarídeo extraído no mês de agosto possui um maior percentual de 3,6 α -L-anidrogactose do que nos outros meses investigados.

TABELA 11. Razão molar do resíduo LA e L-6S de *G.birdiae*.

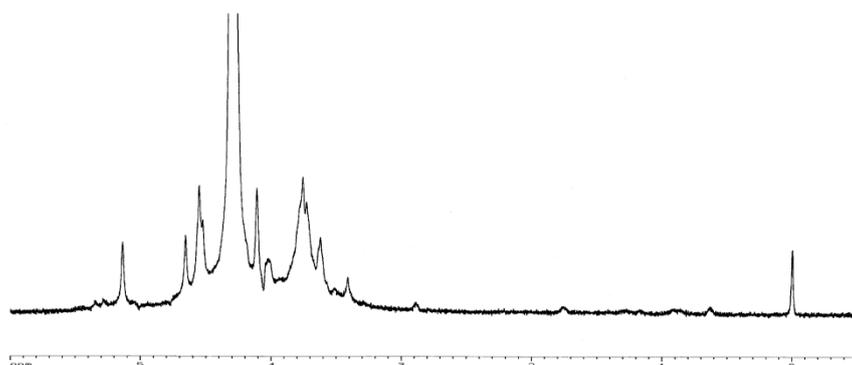
<i>G. birdiae</i>	LA/L-6S
Jan/07	1,18
Abr/07	1,95
Ago/07	3,14



(a)



(b)



(c)

FIGURA 14. Espectro de RMN ^1H do polissacarídeo de *G. birdiae*: (a) Janeiro/07, (b) Abril/07, (c) Agosto/07.

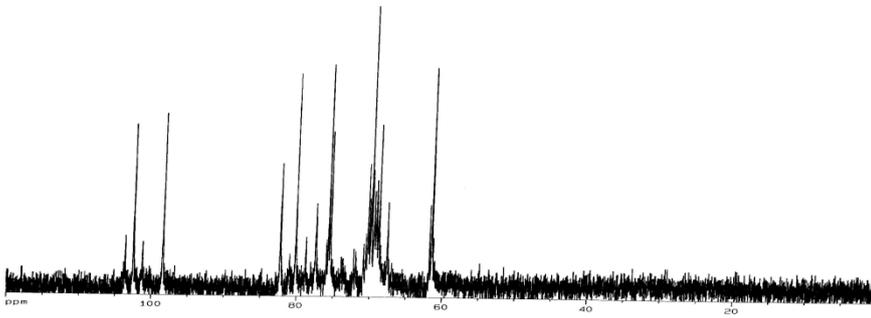
Os espectros de RMN de ^{13}C dos polissacarídeos extraídos nos meses de janeiro, abril e agosto de 2007 são mostrados na FIGURA 15 (a, b e c). Na região de carbono anomérico (δ 90 – 110) os espectros das amostras coletas em janeiro e abril, apresentaram quatro sinais principais, os quais foram atribuídos tomando como base os dados da literatura (USOV *et al.*, 1997, USOV *et al.*, 1980 e VALIENTE *et al.*, 1992) como C-1 de β -D-galactose (unidade G') ligado a α -L-galactose-6-sulfato (L-6S) em δ 103,6; C-1 de β -D-galactose (unidade G) ligado a 3,6 α -L-anidrogactose em δ 102,5, C-1 do resíduo de α -L-galactose-6-sulfato (L-6S) em δ 101,3 e C-1 de 3,6 α -L-anidrogactose (LA) em δ 98,4. A amostra coletada em agosto não mostra sinais de C-1 devido aos resíduos G' e L-6S, indicando a ausência ou a baixa quantidade do precursor biológico da 3,6 α -L-anidrogactose. Na extração a frio do polissacarídeo de *G. birdiae*, os sinais de CH₂ do C-6 foram observados em δ 69,6, 67,7, 61,9 e 61,6 e atribuídos aos resíduos LA, L-6S, G' e G, respectivamente. Observa-se nos três espectros que o sinal devido a L-6S (δ 67,2) diminui de janeiro a agosto, confirmando a diminuição do precursor biológico do 3,6 α -L-anidrogactose.

A TABELA 12 apresenta a composição estimada das unidades presentes nos polissacarídeos extraídos a quente nos meses de janeiro, abril e agosto de 2007, essa composição aproximada foi realizada comparando a área dos carbonos anoméricos.

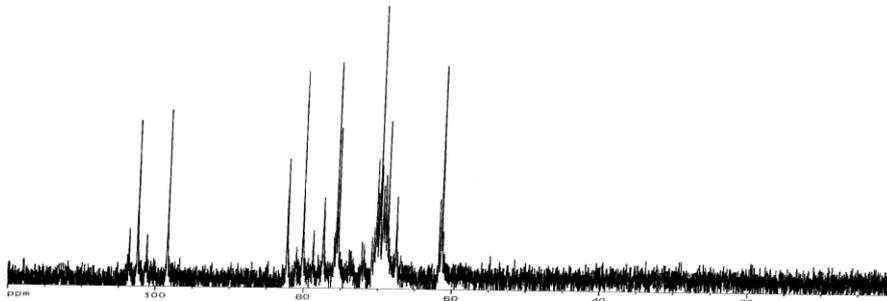
TABELA 12. Composição estimada das unidades presentes nos polissacarídeos extraídos a quente de *G. birdiae*.

Polissacarídeo <i>G. birdiae</i> Extração a quente	LA	L-6S	G e G'
Janeiro	35,2	12,0	52,8
Abril	39,5	6,1	54,4
Agosto	54,3	-	46,1
Extração a frio (Maciel, 2008)	40,5	9,2	50,3

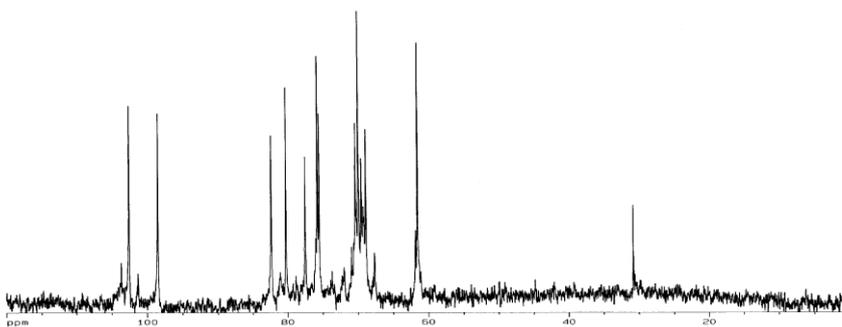
Observa-se um aumento no teor de 3,6 α -L-anidrogactose de janeiro a agosto de 2007. Comparando o polissacarídeo de *G. birdiae* extraída a frio com a amostra extraída em agosto (a 100°C), o teor de 3,6 α -L-anidrogactose aumentou 34%.



(a)



(b)



(c)

FIGURA 15. Espectro de RMN ^{13}C do polissacarídeo de *G. birdiae*: (a) Janeiro/07, (b) Abril/07, (c) Agosto/07.

TABELA 13: Assinalamentos de RMN de ^1H e ^{13}C para resíduos de Gb-f (fração a frio).

Resíduo	^1H assinalamento químico (ppm)					
	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6
β -D-galactopiranosil	4.54	3.62	3.75	4.12	3.72	3.76
3,6- α -L-anidrogalactose	5.13	4.09	4.53	4.64	4.55	4.10
α -L-galactose-6-sulfato	5.28	3.85	3.94	nd	nd	4.30
β -D-galactose ligada a L-6S	4.43	3.72	nd	nd	nd	3.51
	^{13}C assinalamento químico (ppm)					
	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
β -D-galactopiranosil	102.6	70.5	82.4	68.9	75.5	61.6
3,6- α -L-anidrogalactose	98.5	70.0	80.5	77.7	75.9	69.6
α -L-galactose-6-sulfato	101.3	69.9	69.3	78.9	71.0	67.7
β -D-galactose ligada a L-6S	103.7	70.8	80.3	69.2	76.0	61.9

nd: não detectado

As TABELAS 13 e 14 referem-se aos dados de RMN (^1H e ^{13}C) obtidos por MACIEL *et al.* (2008) e outros autores da literatura, respectivamente. Estes, serviram de base para determinação dos sinais das amostras de polissacarídeos extraídos à quente de *G. birdiae* nos meses de janeiro, abril e agosto de 2007 (TABELAS 15, 16 e 17).

TABELA 14: Assinalamentos de referência do espectro de RMN de ^{13}C .

Unidade de resíduo	^{13}C Carbono sinais químicos (PPM)							
	C1	C2	C3	C4	C5	C6	Me	
Usov et al. (1980)								
(G-LA)n	G	102.3	70.1	82.2	68.6	75.2	61.3	
	LA	98.2	69.7	80.0	77.2	75.5	69.7	
G6M-4S		102.4	70.0	80.0	71.5	70.8	70.0	59.0
Lahaye et al. (1989)								
(G-LA)n	G	102.4	70.2	82.2	68.8	75.3	61.4	
	LA	98.3	69.9	80.1	77.4	75.7	69.4	
(G'-L6S)	G'	103.7	69.8	81.2	69.1	75.9	61.8	
	L6S	101.3	69.3	71.1	79.1	70.3	67.9	
Miller e Furneaux (1997)								
(G6M-A)	G6M	102.3	70.1	82.1	69.0	73.5	71.7	59.1
	LA	98.2	69.9	80.1	77.3	75.5	69.3	
Lai e Lii (1998)								
(G-LA)n	G	102.4	70.2	82.3	68.7	75.3	61.4	
	LA	98.2	69.9	80.1	77.3	75.6	69.4	
Valiente et al.(1992)								
(G-LA)n	G	102.4	70.1	82.1	68.4	75.6	61.4	
	LA	98.3	69.8	80.1	77.4	75.6	69.3	

TABELA 15 : Assinalamentos de RMN de ^1H e ^{13}C para resíduos de G.b. jan/07

Resíduo	^1H assinalamento químico (ppm)					
	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6
β -D-galactopiranosil	4.55	3.62	3.76	4.11	3.73	3.76
3,6- α -L-anidrogactose	5.14	nd	nd	4.66	4.55	3.94
α -L-galactose-6-sulfato	5.28	3.86	3.94	nd	3.62	nd
β -D-galactose ligada a L-6S	4.45	3.73	nd	nd	nd	3.52
	^{13}C assinalamento químico (ppm)					
	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
β -D-galactopiranosil	102.5	70.1	82.3	69.1	75.7	61.5
3,6- α -L-anidrogactose	98.4	nd	nd	77.5	75.9	69.5
α -L-galactose-6-sulfato	101.2	69.9	nd	78.9	70.6	nd
β -D-galactose ligada a L-6S	103.6	70.9	nd	69.2	nd	nd

nd: não detectado

TABELA 16: Assinalamentos de RMN de ^1H e ^{13}C para resíduos de G.b. abr/07

Resíduo	^1H assinalamento químico (ppm)					
	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6
β -D-galactopiranosil	4.55	3.62	3.76	4.11	3.73	3.76
3,6- α -L-anidrogalactose	5.14	4,01	4,53	4.66	4.55	3.93
α -L-galactose-6-sulfato	5.28	nd	3.93	nd	3.62	4.29
β -D-galactose ligada a L-6S	nd	3.73	nd	nd	nd	nd
	^{13}C assinalamento químico (ppm)					
	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
β -D-galactopiranosil	102.5	70,5	82.3	68.9	75.7	61.5
3,6- α -L-anidrogalactose	98.4	69,6	80,5	77.7	76,0	69.5
α -L-galactose-6-sulfato	101.2	nd	nd	nd	nd	67.6
β -D-galactose ligada a L-6S	103.6	70.9	nd	69.2	nd	nd

nd: não detectado

TABELA 17: Assinalamentos de RMN de ^1H e ^{13}C para resíduos de G.b. ago/07

Resíduo	^1H assinalamento químico (ppm)					
	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6
β -D-galactopiranosil	4.55	3.62	3.76	4.11	3.73	3.76
3,6- α -L-anidrogalactose	5.14	3,95	4.53	4.66	4.55	3,94
α -L-galactose-6-sulfato	5.29	nd	nd	nd	3.62	4.29
β -D-galactose ligada a L-6S	nd	nd	nd	nd	nd	3.51
	^{13}C assinalamento químico (ppm)					
	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
β -D-galactopiranosil	102.5	70,4	82.3	68.8	75.7	61.5
3,6- α -L-anidrogalactose	98.4	69,9	80,2	77.5	75,7	69.5
α -L-galactose-6-sulfato	nd	nd	nd	nd	nd	nd
β -D-galactose ligada a L-6S	nd	nd	nd	nd	nd	nd

nd: não detectado

4.6. Espectro de Absorção na Região do Infravermelho

A espectroscopia de infravermelho é muito utilizada na identificação de estruturas de polissacarídeos. Trata-se de uma técnica importante tanto para o meio acadêmico quanto para a indústria, pois conduz a um breve levantamento da estrutura química de ficocolóides que possam despertar interesse industrial. A TABELA 18 apresenta algumas atribuições de bandas características para polissacarídeos de algas vermelhas.

Os espectros de infravermelho dos polissacarídeos extraídos a 100° C (FIGURA 16 a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, l e m) demonstram perfis espectroscópicos semelhantes. Bandas características de agarocolóides foram observadas para o polissacarídeo de *G. birdiae* (1375, 1076, 933, 893, 850, 775 cm^{-1}). Podemos observar a presença da banda em 1076 cm^{-1} referente à vibração C – O – C do esqueleto de galactanas. As bandas 1258 e 930 cm^{-1} podem ser atribuídas às vibrações S = O dos grupos sulfato e C – O – C de 3,6-anidro- α -L-galactose, respectivamente. A banda de 893 cm^{-1} presente em todos os espectros analisados, corresponde a uma banda específica de agar.

A região entre 800 e 850 cm^{-1} é usada para inferir a posição dos grupos sulfato na posição 4 nos agarocolóides. Apenas o espectro de infravermelho do mês de janeiro apresentou baixa intensidade na banda de 850 cm^{-1} , nos demais meses investigado essa banda não foi detectada. As bandas 845, 830 e 820 cm^{-1} são atribuídas à presença de 4-sulfato, 2-sulfato e 6 sulfato da D-galactose, respectivamente. A ausência de sinal significativo em 820 cm^{-1} e 805 cm^{-1} indica que a posição 6 da galactose e a 2 da 3,6-anidrogalactose não estão sulfatadas ou estão presentes em concentrações muito baixas.

TABELA 18: Atribuições no espectro do infravermelho para polissacarídeos de algas marinhas.

Número de onda (cm⁻¹)	Atribuições	Referência
1653	(COO ⁻), Amida I	A
1640	H ₂ O	C
1562	Amida II	A
1380 – 1355	Éster Sulfato	Bc
1250 – 1240	O = S = O (estiramento assimétrico)	Bcd
1080 – 1040	Esqueleto de galactanas (C - O + C – OH)	Be
930	C – O – C de 3,6-anidrogalactose	Bcd
900 – 890	Banda específica do ágar	E
850	Galactose-4-sulfato	F
820 – 810	Galactose-6-sulfato	Bcd
805 – 800	3,6-anidrogalactose-2-sulfato	Cd
740 – 725	C – O – C de ligação glicosídica	E
716	C – O – C de ligação glicosídica	E
705	Galactose-4-sulfato (axial secundário)	Bc
615 - 608	O = S = O	B
580	O = S = O	B

a: Grosev; Bozac; Puppels, 2001.

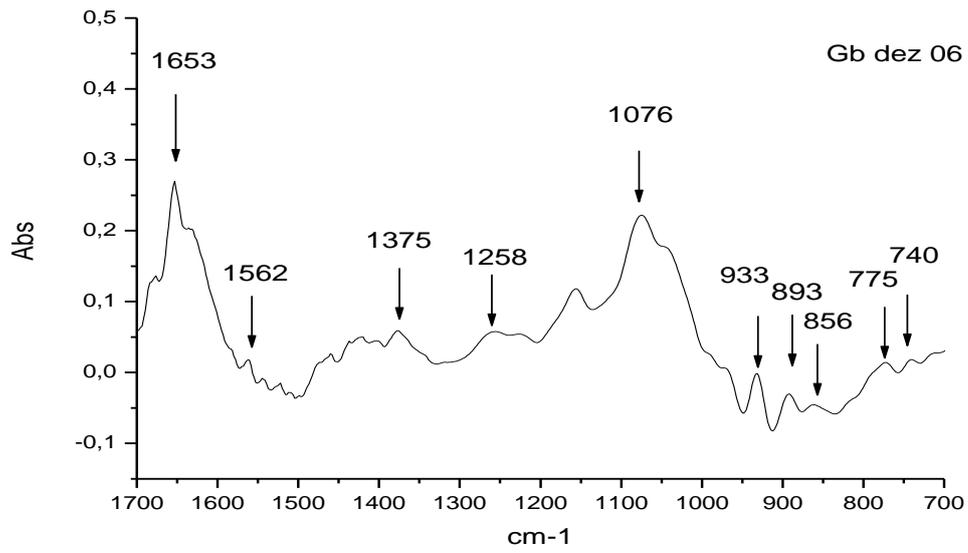
b: Prado-Fernández *et al.*, 2003.

c: Rochas; Lahaye; Yaphe, 1986.

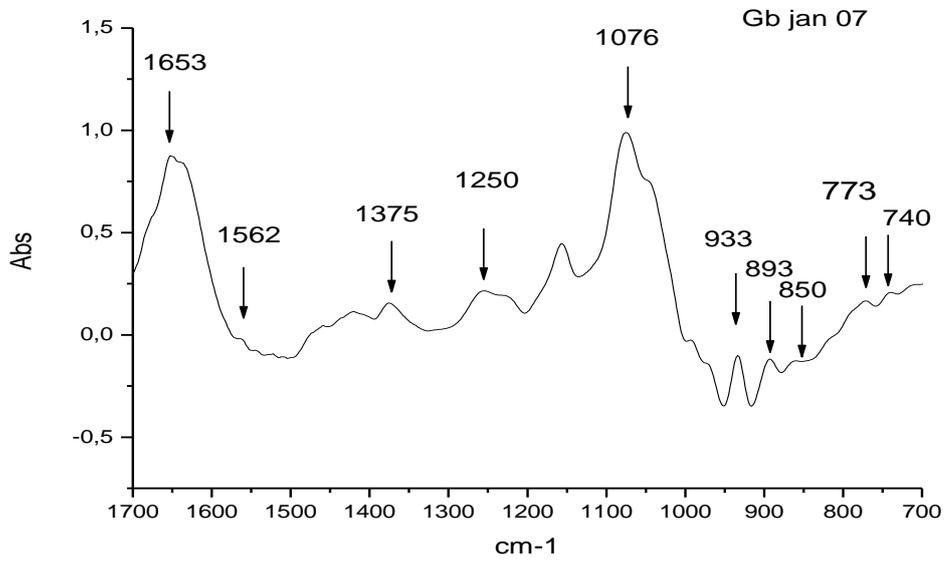
d: Chopin; Whalen, 1993.

e: Mollet; Rahaoui, Lemoine, 1998.

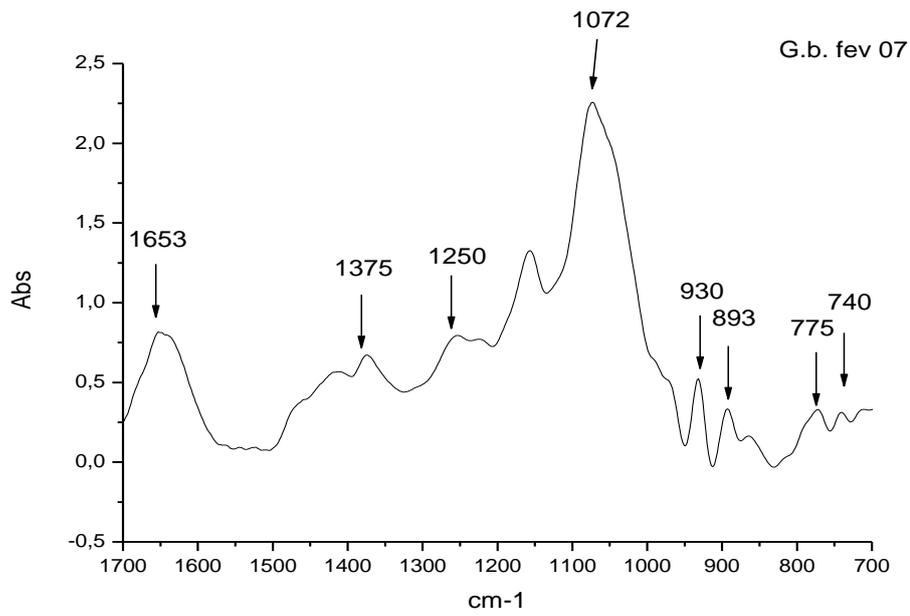
f: Chopin ; Kerin ; Mezerolle. 1999.



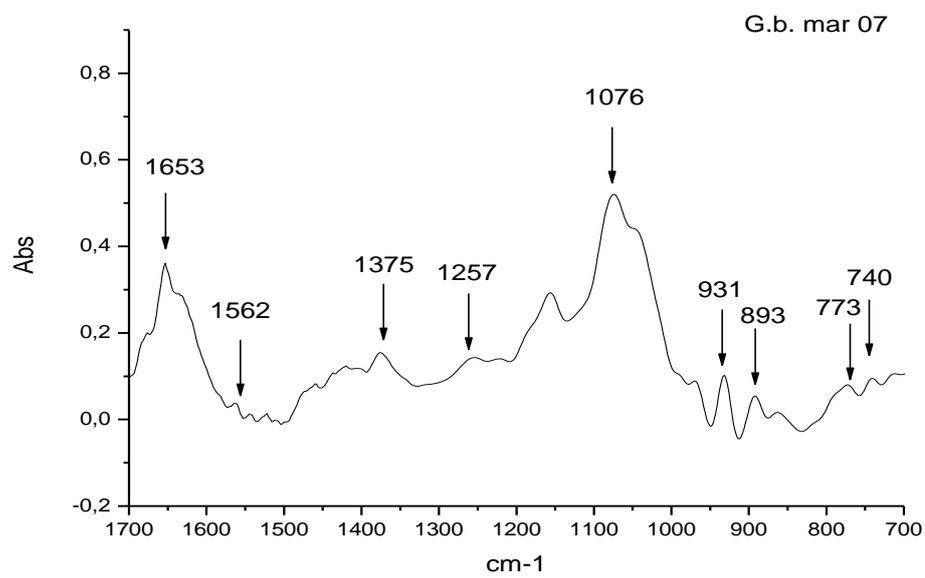
(a)



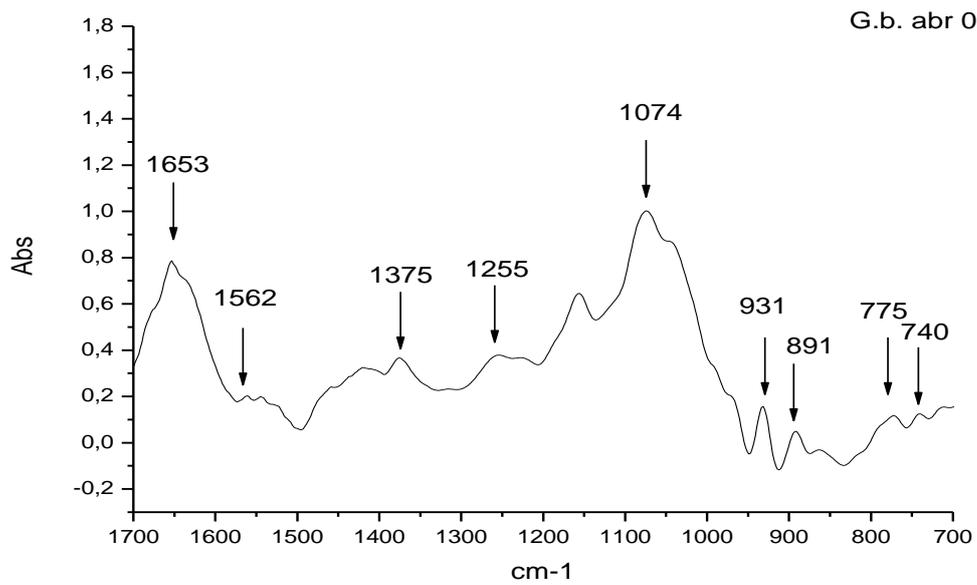
(b)



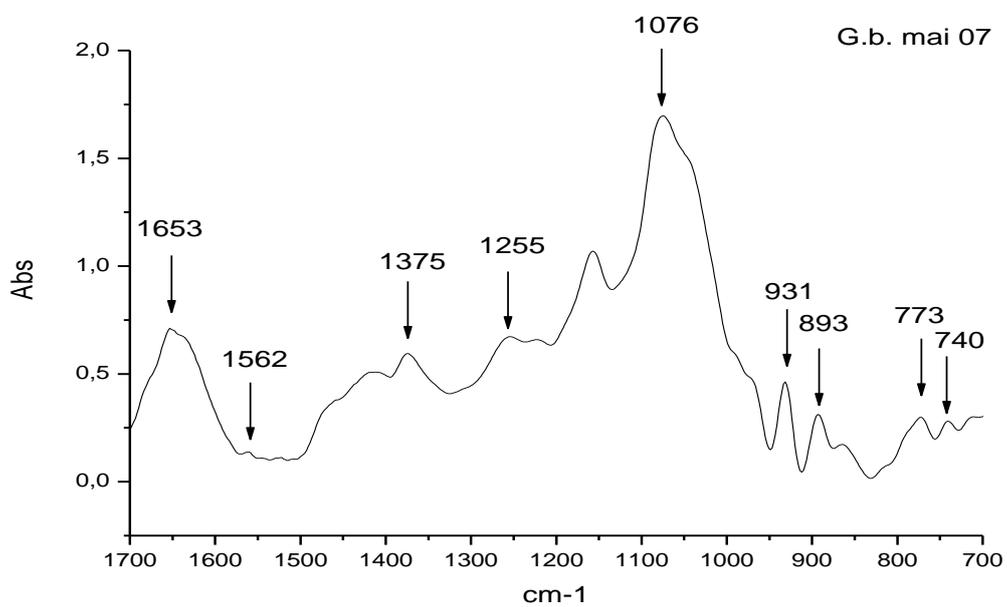
(c)



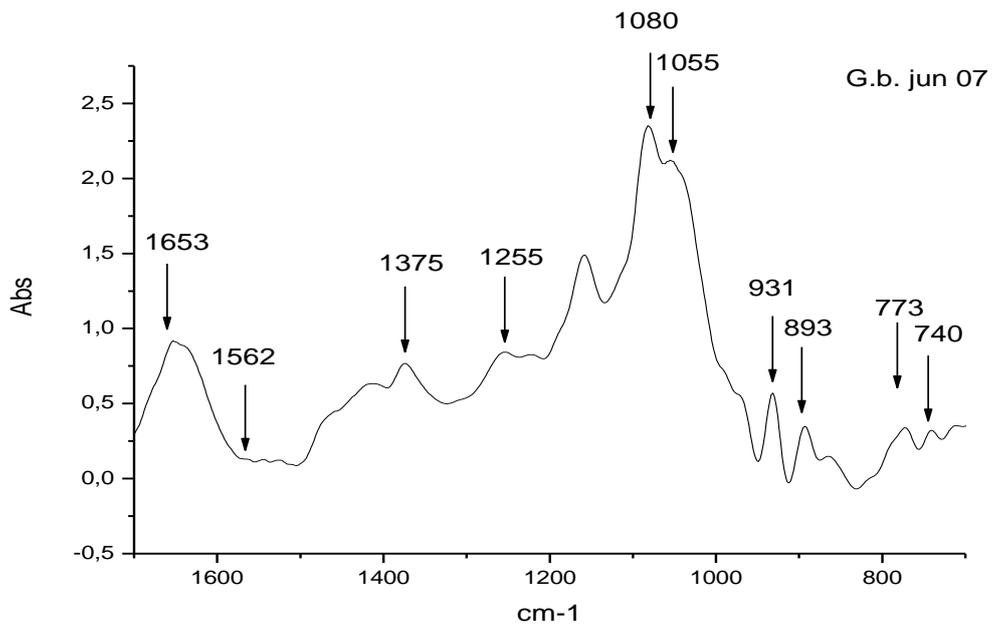
(d)



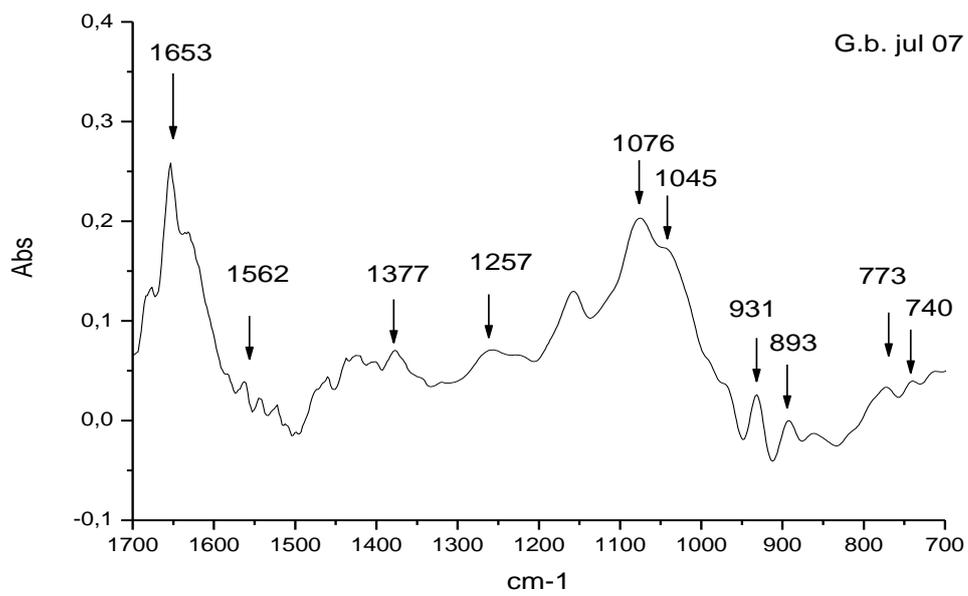
(e)



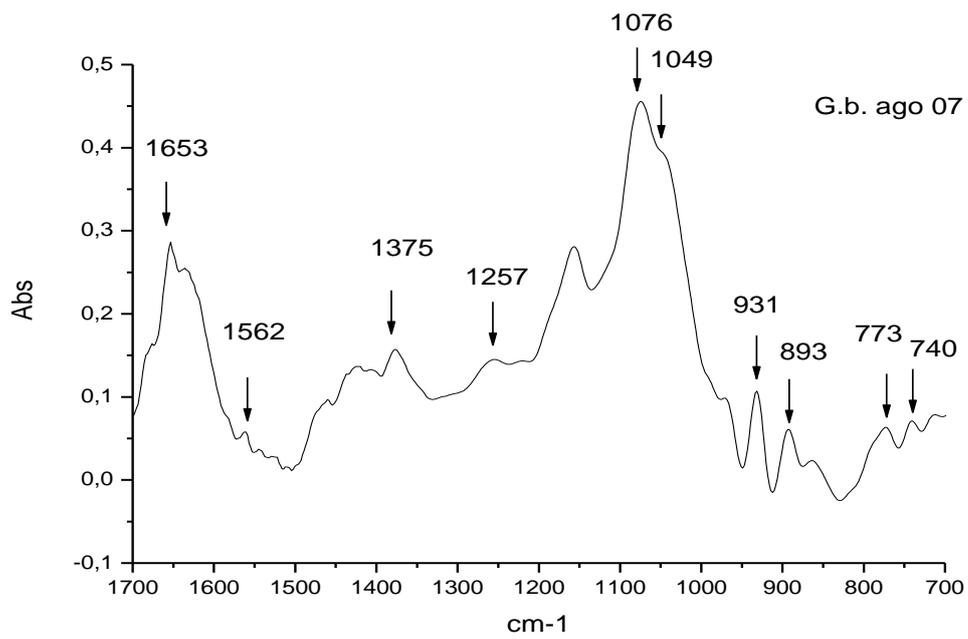
(f)



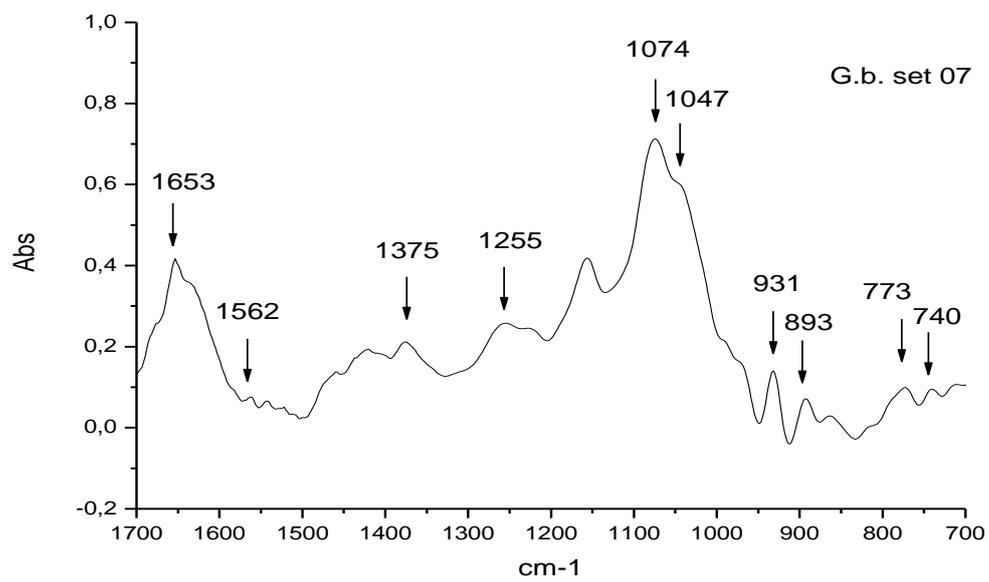
(g)



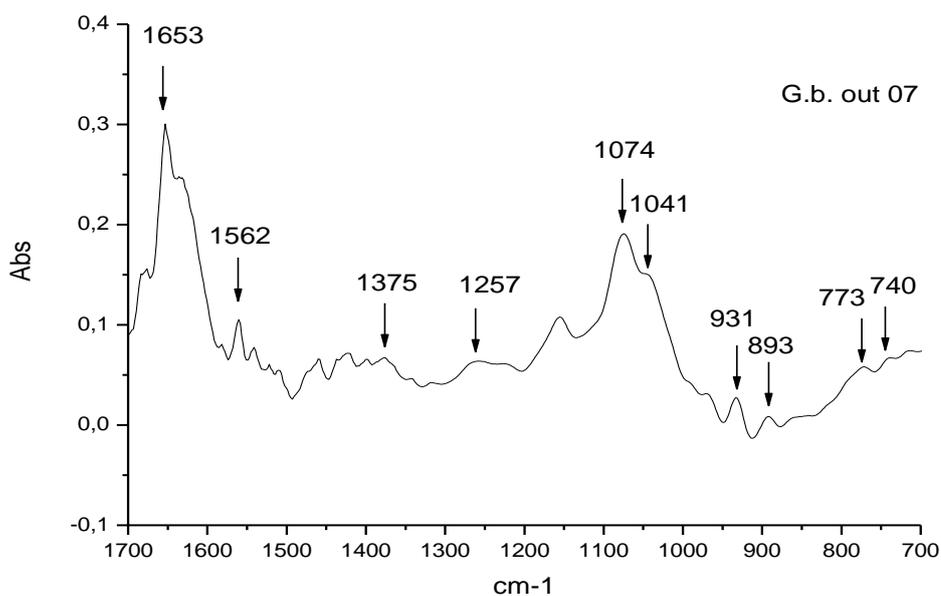
(h)



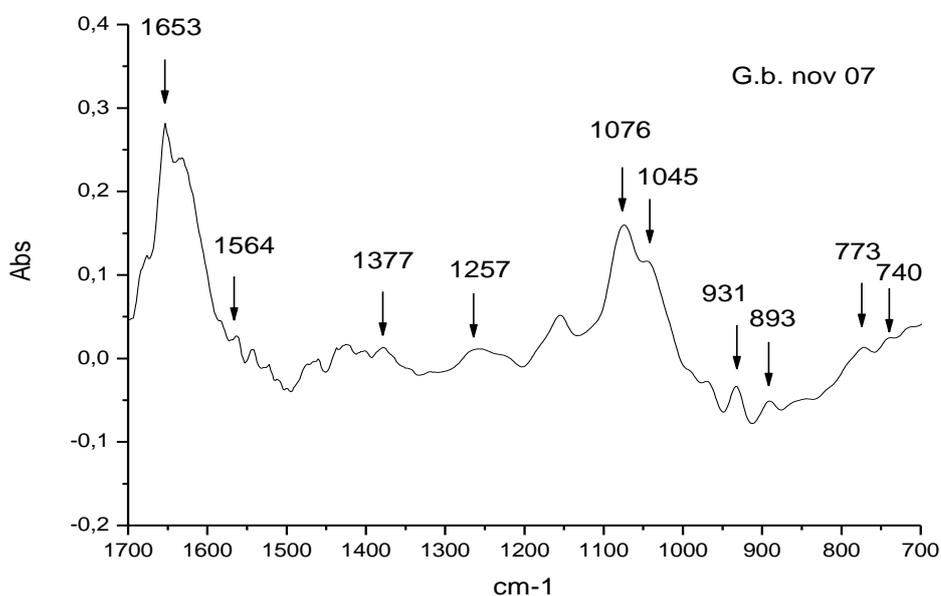
(i)



(j)



(l)



(m)

FIGURA 16. Espectro na região de infravermelho do polissacarídeo extraído a 100°C de *G. birdiae*. (a) *G. birdiae* dez/06, (b) *G. birdiae* jan/07, (c) *G. birdiae* fev/07, (d) *G. birdiae* mar/07, (e) *G. birdiae* abr/07, (f) *G. birdiae* mai/07, (g) *G. birdiae* jun/07, (h) *G. birdiae* jul/07, (i) *G. birdiae* ago/07, (j) *G. birdiae* set/07, (l) *G. birdiae* out/07, (m) *G. birdiae* nov/07.

5. Conclusões

O estudo de sazonalidade na composição centesimal da farinha da alga *G. birdiae* revelou variação, com diferentes níveis de intensidade, em todos os constituintes da alga. A variação nos percentuais de matéria seca e carboidratos totais (obtido por diferença) foi muito pequena. Já para proteína bruta, foi detectada uma maior variação, onde os valores mais elevados e comparáveis foram detectados entre os meses de julho a novembro de 2006, e nos meses subsequentes (entre dezembro/06 a março/07) os valores reduziram cerca de 39%. O teor de lipídeos foi o que variou mais expressivamente, onde em julho/06, foi detectado 2,99% de lipídeos na matéria seca e em abril/07 o conteúdo de lipídeos praticamente desapareceu (0,03%). O maior valor para fibra bruta foi encontrado em julho/06 (9,91%) e o menor valor em abril/07 (6,52%) e o conteúdo de resíduo mineral aumentou aproximadamente 2,67 vezes de abril/06 (4,24%) a dezembro/06 (11,35%). Através da atividade hemaglutinante, frente a eritrócitos de galinha tratados com tripsina, foi possível constatar a presença da lectina no extrato protéico durante todo o ano, exceto no mês de dezembro de 2006.

A caracterização estrutural, realizada por métodos químicos e espectroscópicos do polissacarídeo de *Gracilaria birdiae*, extraído a 100 °C constatou que a alga biossintetiza galactanas do tipo agarana, constituída basicamente por resíduos de β -D-galactose e 3,6 α -L-anidrogactose, e com baixa substituição por grupos *O*-metil. Os espectros de infravermelho dos polissacarídeos demonstraram perfis semelhantes, sendo que apenas nos meses de dezembro/06 e janeiro/07 foi detectado um sinal (850 cm^{-1}) relativo a sulfatação na posição 4. A estrutura do polissacarídeo de *G. birdiae*, apresentou pequena variação, durante o período estudado, no conteúdo 3,6 α -L-anidrogactose, que aumentou de janeiro a agosto de 2007. Esse resultado indica uma maior viscosidade do polissacarídeo extraído em agosto, com a ausência ou pouca quantidade de α -L-galactose-6-sulfato. Os polissacarídeos extraídos durante o período investigado apresentaram massa molar variando entre $0,24 \times 10^4$ a $8,51 \times 10^5$ g/mol.

6. Referências Bibliográficas

- AGUILERA-MORALES, M., CASAS-VALDEZ, M., CARRILLO-DOMÍNGUEZ, S., GONSÁLEZ-ACOSTA, B., PÉREZ-GIL, F. Chemical composition and microbiological assays of marine algae *Enteromorpha sp.* As a potential food source. *Journal of Food Composition and Analysis* 18, 79-88, 2005.
- AOAC, 1990. *Official Methods of Analysis* (15th Ed.). Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA
- ANDRIAMANANTOANINA, H., CHAMBAT, G., & RINAUDO, M. Fractionation of extracted Madagascar *Gracilaria corticata* polysaccharides: Structure and properties. *Carbohydrate Polymers*, 68, 77-88, 2007.
- ALVEAL, K.; VALENZUELA, J. Implicâncias sociais Del cultivo y manejo de algas em Chile. *Congresso Latino Americano de Ficologia*, São Paulo, 2: 125-148, 1998.
- AMIMI, A.; MOURADI, A.; GIVERNAUD, T.; CHIADMI, N.; LAHAYE, M. . Structural analysis of *Gigartina pistillata* carrageenans (Gigartinaceae, Rhodophyta). *Carbohydr. Res.*, v. 333, p. 271-279, 2001.
- ARASAKI, A., ARASAKI, T. *Low calorie, high nutrition. Vegetables from the sea.* Zurich, Japan Publications, Inc & Tóquio Boserbooks Inc. Limmastrasse III, p. 86-173, 1983.
- ARMISEN, R. Wolrd-wide use and importace of *Gracilaria*. *J. Appl. Phycol.* 7, 231-243, 1995.
- BENEVIDES, N. M. B.; LEITE, A. M.; FREITAS; A. L. P. Atividade hemaglutinante na alga vermelha *Solieria filiformis*. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* 8 (2): 117-122, 1996.
- BENEVIDES, N. M. B., SILVA, S. M. S., OLIVEIRA, S. R. M., MELO, F. R., FREITAS, A. L. P., HOLANDA, M.L., SAMPAIO, A.H.. Seasonal Variations in Hemagglutinating Activity and Chemical Composition of Two Red Marine Algae *Gracilaria domingensis* and *Gelidium pusillum*. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, 11(2):91-95, 1999.
- BENEVIDES, N. M. B., OLIVEIRA, S. R. M., MELO, F. R., FREITAS, A. L. P., VASCONCELOS, I. M. Proximate analysis, toxic and antinutritional factors of ten brazilian marine algae. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*. V.10, n. 1 p. 31-36, 1998^a
- BHATTACHARYA, D.; MEDLIN, L., Algal phylogeny and the origin of land plants. *Plant. Physiol.*, 116: 9 – 15, 1998.

- BOLD, H.C & WYNNE, M.J. Introduction to the algae. Structure and reproduction (2^a Ed.). Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs. 720 p. 1985.
- BROWN, B. E.; OGDEN, J. C. Coral bleaching. *Sci. Amer.*, 268: 64 – 70, 1993.
- BURIYO, A. S., KIVAISI, A. K., Standing Stock, Agar Yield and Properties of *Gracilaria salicornia* Harvested along the Tanzanian Coast Western Indian Ocean J. Mar. Sci. Vol. 2, No. 2, pp. 171–178, 2003.
- CAMMUE, B. P. A., PEETERS, B.; PEUMANS, W. J. A new lectin from tulip (*Tulipa*) bulbs. *Planta* 169, 583 – 588, 1986.
- CHAPMAN, V. J. Seaweed and their uses. London, Chapman and Hall, 135 pp., 1970.
- CHARGAFF, E., BRANCROFT, F. W., STANLEY – BROWN, M. Studies on the chemistry of blood coagulation on the inhibition of blood clotting by substances of light molecular weight. *J. Biol. Chem.*, v.115, p. 155 – 161, 1936.
- CHEVOLOT, L., MOLLOY, B., RATSKOL, J., FOUCAULT, A., COLIEC – LOVAULT, S. A disaccharide repeat unit is the major structure in fucoidans from two species of brown algae, *Carbohydrate Res.*, v. 330, p.523 – 529, 2001.
- CHOPIN, T., WHALEN, E., A new and rapid method for carrageenan identification by FT IR diffuse reflectance spectroscopy directly on dried, ground algal material. *Carbohydr. Res.* 246: 51–59, (1993)
- CHOPIN, T., KERIN, B.F., MAZEROLLE. R., Phycocolloid chemistry as a taxonomic indicator of phylogeny in the Gigartinales, Rhodophyceae: A review and current developments using Fourier transform infrared diffuse reflectance spectroscopy. *Phycological Research.* 47 47, 167-88, 1999.
- CRAIGIE, J.S., WEN, Z-C., VAN DER MEER, J.P., Interspecific, intraspecific and nutritionally-determined variations in the composition of agars from *Gracilaria* spp. *Bot. Mar.* 27, 55–61, 1984.
- CRAIGIE, J. S. Cell walls. In: COLE, K. M.; SHEATH, R. G. (eds), *Biology of the Red Algae*. Cambridge: Cambridge University Press, 1990, p. 221-257.
- CUMMINGS, R, D. Lectins as tools for glycoconjugate purification and characterization. In: *Glyco-sciences, status and perspectives*. Edit by GABIUS, H. J. & GABIUS, S. Chapter 10. Published by Chapman & Hall GmbH, Weinheim, Germany, p. 191-199, 1997.
- DARCY-VRYLLON. Nutritional aspects of the developing use of marine macroalgae for the human food industry. *Journal of the Food Science and Nutrition*, v. 44, n. 1, p. 523-535, 1993.
- DUARTE, M. E. R.; CARDOSO, M. A.; NOSEDA, M. D.; CEREZO, A. S. Structural studies on fucoidans from the Brown seaweed *Sargassum stenophyllum*. *Carbohydr. Res.*, v. 333, p. 281-293, 2001a.

DE RUITER, G. A., RUDOLPH, B. Carrageenan biotechnology. Trends in Food Science & Technology, 8, 389–395 (1997).

DUBOIS, M., GILLES, K. A., HAMILTON, J. K., REBERS, P. A., SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Analytical Chem 28 (3): 350-356, 1956.

ERICSON, L. E.; LEWIS, L. On the vitamin B12 factors in marine algae. Arkiv for Kemi, v. 6, 427-442, 1953.

ESTEVEZ, J. M.; CIANCIA, M.; CERZO, A. S. The system of low-molecular-weight carrageenans and agaroides from the room-temperature-extracted fraction of *Kappaphycus alvarezii*. Carbohydr. Res., v. 325, p. 287-299, 2000.

FARIAS, W. R. L.; VALENTE, A. P.; PEREIRA, M. S.; MOURÃO, P. A. S. Structure and Anticoagulant Activity of Sulfated Galactans. J. Biol. Chem., v. 275, p. 29299–29307, 2000.

FALSHAW, R., FURNEAUX, R.H., Carrageenan from the tetrasporic stage of *Gigartina decipiens* (Gigartinaceae, Rhodophyta). Carbohydr. Res. 252: 171–182, 1994.

FALSHAW, R., FURNEAUX, R. H., STEVENSON, D. E. Structural analysis of carrageenans from the red alga, *Callophyllis hombroniana* Mont. Kütz (Kallymeniaceae, Rhodophyta) Carbohydrate Research 340, 1149–1158, 2005.

FOSTER, G.G., HODGSON, A.N. Consummation and apparent dry matter digestibility of six intertidal macroalgae by *Turbo sarmaticus* (Mollusca: Vetigastropoda: Turbinidae). Aquaculture 167, 211-227, 1998.

FREIRE-PELEGRÍN, Y., MURANO, E., Agars from three species of *Gracilaria* (Rhodophyta) from Yucatán Peninsula Bioresource Technology 96, 295–302, 2005.

GOLDSTEIN, I.J., HUGHES, R.C., MONSIGNY, M., OSAWA, T.; SHARON, N. What should be called a lectin? Nature, 285: 66, 1980.

GOLDSTEIN, I.J. & PORETZ, R.D. Isolation, physicochemical, characterization and carbohydrate-binding specificity of lectins. In: LIENER, I.E., SHARON, N. & GOLDSTEIN, I.J. eds.: The Lectins: Properties, Functions and Applications in Biology and Medicine. Inc. 600pp. Academic. Press. New York, 1986.

GÜVEN, K. C., GÜLER, E., AKITIN, E.; KOYUNCUOGLU, H., Studies on *Pterocladia capollacea*, Born. Et thur. Part II. Pharmacological investigations. Planta Médica. 29:8-20, 1979

HARVEY, W. Cracking open marine algae. Biological Treasure Chest. Bio/Technology, v. 6, n. 5, p. 487-492, 1988.

HOLANDA, M.L. Iota Carragenana da Alga Marinha Vermelha *Solieria filiformis* Versus Iota Carragenana Comercial: Propriedades Estruturais e Reológicas. Tese

(Doutorado em Bioquímica e Biologia Molecular) – Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, 2007.

HORI, K, OIWA, C., MIYAZAWA, K.; ITO, K. Evidence for wide distribution of agglutinins in marine algae. *Botanica Marine* 31 (2): 133-138, 1988a.

HORI, K. MIYAZAWA,K.; ITO,K. Some common properties of lectins from marine algae. *Hydrobiologia*, v. 204/205, p. 561-566,1990.

KARSTEN, U., WEST, J., ZUCCARELLO, G.C., NIXFORD, O., BARROW, K.D., KING, R. J. Low molecular weight carbohydrate patterns in the *Bangiophyceae* (Rhodophyta). *J. Phycol.* Lawrence, v. 35, p 967-976, 1999.

KLOAREG, B.; QUATRANO, R .S. Structure of the cell walls of marine algae and ecophysiological functions of the matrix polysaccharides. *Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev.*, v. 26, p. 259-315, 1988.

KNUTSEN, S. H.; MYSLABODSKY, D. E.; LARSEN, B.; USOV, A. I. A modified system of nomenclature for red algal galactans. *Bot. Mar.*, v. 37, p. 163-169, 1994.

LAHAYE, M., Developments on gelling algal galactans, their structure and physico-chemistry *Journal of Applied Phycology* 13: 173–184, 2001.

LAHAYE, M., YAPHE, W., The chemical structure of agar from *Gracilaria compressa* (C. Agardh) Greville, *G. cervicornis* (Turner) J. Agardh, *G. damaecornis* J. Ag and *G. domingensis* Sonder ex Kützing (Gigartinales, Rhodophyta). *Bot. Mar.* 32, 369–377, 1989.

LEE, R. E. *Phycology*. 2th Ed. Cambridge University Press, New York, NY 10011-4211, USA, 1997.

LEITE, E. L., ROCHA, H.A.O., ABREU, L.R.D., CAVALCANTE, S.F., DIETRICH, C.P., NADER, H.B. Structure and pharmacological activities of a sulfated xylofucoglucuronan from the alga *Spatoglossum schroederi*. *Plant. Science Shannon*, v. 132, p. 215 – 228, 1998.

LIS, H.; SHARON, N. Lectins: Carbohydrate-specific proteins that mediate cellular recognition. *Chemical Reviews*, v. 98, p. 637-674, 1998.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L. & RANDAL, R.J. Protein measurement, with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193: 256 – 275, 1951.

MABEAU, S., CAVALOC, E., FLEURENCE, J. & HAYE, M. New seaweed based ingredient for the food industry. *International Food Ingredient*, v.3, p. 38 – 44, 1992.

MACIEL, J.M., CHAVES, L.S., SOUZA, B.W.S., TEIXEIRA, D.I.A., FREITAS, A.L.P., FEITOSA, J.P.A., PAULA, R.C.M. Structural characterization of cold extracted fraction of soluble sulfated polysaccharide from red seaweed *Gracilaria birdiae*. *Carbohydrate Polymers* 71, 559-565, 2008.

- MARINHO-SORIANO, E. Agar polysaccharides from *Gracilaria* species (Rhodophyta, Gracilariaceae). *J Biotechnol* 89:81–84, 2001.
- MARINHO-SORIANO, E., BOURRET, E. Effects of season on yield and quality of agar from *Gracilaria* species (Gracilariaceae, Rhodophyta). *Bioresource Technology* 90, 329-333, 2003.
- MARINHO-SORIANO, E.; BOURRET, E. Polysaccharides from the red seaweed *Gracilaria dura* (Gracilariales, Rhodophyta) *Bioresource Technology*, 96, 379-382, 2005.
- MARINHO-SORIANO, E.; FONSECA, P.C.; CARNEIRO, M.A.A.; MOREIRA, W.S.C. Seasonal variation in the chemical composition of two tropical seaweeds. *Bioresource Technology* 97, 2402-2406, 2006.
- MARKS, D.L., BAUM, R.B., SWAIN, T., Measurement of total protein in plant samples in the presence of tannins, *Analytical Biochemistry* 147, pp. 136–140, 1985.
- MCHUGH, D.J., . Worldwide distribution of commercial sources of seaweeds including *Gelidium*. *Hydrobiologia* 221, 19-21, 1991.
- MELO, M. R. S., FEITOSA, J. P. A., FREITAS, A. L. P., & DE PAULA, R. C. M., Isolation and Characterization of soluble sulfated polysaccharide from the red seaweed *Gracilaria cornea*. *Carbohydrate Polymers*, 49, 491-498, 2002.
- MELO, F. R Purificação, Caracterização Parcial e Variação Sazonal de uma Lectina Presente na Alga *Vidalia obitusaloba* C. Agardh. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Biologia Molecular) – Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, 2000.
- MELO, F. R.; PEREIRA, M. S.; FOGUEL, D.; MOURÃO, P. A. S. Antithrombin-mediated Anticoagulant Activity of Sulfated Polysaccharides. *J. Biol. Chem.*, v. 279, p. 20824-20835, 2004.
- MOLLET, J. C., RAHAOUI, A., & LEMOINE, Y. Yield, chemical composition and gel strength of agarocolloids of *Gracilaria gracilis*, *Gracilariopsis longissima* and the newly reported *Gracilaria* cf. *vermiculophylla* from Roscoff (Brittany, France). *Journal of Applied Phycology*, 10, 59-66, 1998.
- MONTEIRO – MOREIRA, A. C. O. Caracterização estrutural de três lectinas apresentando especificidades por açúcares distintas, isoladas de sementes de fruta – pão (*Artocarpus incisa* L.) Tese (Doutorado em Bioquímica e Biologia Molecular) – Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, 2002.
- MORANO, P. E.; BRYAND. X. Excessive Growth of Macroalgae: A Symptom of Environmental Disturbance. *Botânica Marina*. V. 39, 1991.

NOSEDA, M.D. Polissacarídeos sulfatados isolados da fase tetraesporofítica de *Gigartina skottsbergii* (Rhodophyta, Gigartinales). Tese de Doutorado. Departamento de Bioquímica da UFPR, Curitiba, 180 pp., 1994.

NOSEDA, M. D.; CERREZO, A. S. Alkali modification of carrageenans. The cyclization of model compounds containing non-sulfated β -D-galactose units. *Carbohydr. Polym.*, v. 26, p. 1-3, 1995.

NOSEDA, M. D.; VIANA, A. G.; DUARTE, M. E. R.; CERREZO, A. S. Alkali modification of carragenans. Part IV. Porphyrans as model compounds. *Carbohydr. Polym.*, v. 42, p. 301-305, 2000.

OGAWA, M., KOIKE, J., Manual de Pesca – Associação dos Engenheiros de Pesca do Estado do Ceará, Fortaleza, CE, p. 113, 1987.

OHYAMA, Y., HIHABAYASHI, J., ODA, Y., OHNO, S., KAWASAKI, H., SUZUKI, K.; KASAI, K. Nucleotide sequence of chick 14K β -galactoside-binding lectin mRNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 134: 51-56, 1986.

OKAMOTO, R. ; HORI, K.; MIYAZAWA, K.; ITO, K. Isolation and characterization of a new hemagglutinin from the red alga *Gracilaria bursa-pastoris*. *Experientia* 46 : 975-977, 1990.

OLIVEIRA, E.C. Is there a relation among the global warming the missing carbon and the calcareous algae? *An. Acad. bras. Ci.* 68(supl 1): 17-21, 1996.

OLIVEIRA, E. C.; MIRANDA, G. E. C. Aspectos sociais e econômicos da exploração de algas marinhas no Brasil. Congresso Latino Americano de Ficologia, São Paulo, 2: 149-156, 1998.

PANORAMA DA AQUICULTURA. Macroalgas marinhas de valor comercial: técnicas de cultivo. V. 7, n. 42, p. 42 – 45, 1997.

PAINTER, T.J. Algal Polysaccharides. In: *The Polysaccharides*; ASPINALL, G.O., Ed., 1st ed.; Academic Press: New York, 1983; v. 2, pp 195-285.

PAULA, E. J., PEREIRA, R. T. L.; OSTINI, S. Introdução de espécies exóticas de *Euchema* e *Kappaphylkus* (Gigartinales, Rhodophyta) para fins de maricultura no litoral brasileiro: uma abordagem teórico experimental. Congresso Latino Americano de Ficologia, São Paulo, 2:341-347, 1998.

PEUMANS, W. J., VAN DAMME, E. J. M. The role of lectins in plant defence. *Histochemical Journal*, v. 27, p. 253-271, 1995.

PERCIVAL, E.G.V. Carbohydrate sulphate. *Quart. Rev.*, v. 3, p. 369-384, 1949.

PEREIRA, M. G., Isolamento e caracterização parcial de uma lectina da alga marinha verde *Ulva fasciata* Delile, Fortaleza, CE, 107pp, Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Ceará, 2000.

- PICULELL, L. Gelling Carrageenans. In: STEPHEN, A.M. Food Polysaccharides and their Applications. New York: Marcel Dekker. Inc., 1995. p. 205-244.
- PLASTINO, E.M.; OLIVEIRA, E.C. *Gracilaria birdiae* (Gracilariales, Rhodophyta), a new species from the tropical South American Atlantic with a terete frond and deep spermatangial conceptacles. *Phycologia*, 41: 389-396, 2002.
- PRADO-FERNANDEZ, J., RODRIGUEZ-VAZQUEZ, J. A., TOJO, E., ANDRADE, J. M. Quantitation of k-, i- and l- carrageenans by mid-infrared spectroscopy and PLS regression. *Analytica Chimica Acta*, 480, 23-37, 2003.
- PRAIBOON, J., CHIRAPART, A., AKAKABE, Y., BHUMIBHAMOND, O., KAJIWARA, T., Physical and Chemical Characterization of Agar Polysaccharides Extracted from the Thai and Japanese Species of *Gracilaria* ScienceAsia 32 Supplement 1: 11-17, 2006.
- RAMOS, M. V., FREITAS, A. L. P., MELO, V. M. M., CARVALHO, A. F. F. U., Protein content and amino acid composition in some brazilian marine algal species, *Physiol. Mol. Biol. Plants*, v. 4, p. 165-169, 1998.
- RAMOS, M. V., MONTEIRO, A. C. O., MOREIRA, R. A., CARVALHO, A. F. F. U. Amino acid composition of some brazilian seaweed species. *Journal of Food Biochemistry*, v. 24, p. 33-39, 2000.
- RAVEN, P. H., EVERT, R. F., EICHHORN, S. E., *Biology of Plants*. 5^a ed., Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, 735pp., 1996.
- RAVEN, P. H., EVERT, R. F., EICHHORN, S. E., *Biologia Vegetal*, 6^a ed., Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, 906pp., 2001.
- REAKA-KUDLA, M. L. The global biodiversity of coral reefs: a comparison with rain forest. In Reaka-Kudla, M. L.; Wilson, D. E. & Wilson, E. O. (eds.), *Biodiversity II*. Joseph Henry Press. Washington, D.C., USA. 83 - 108 p, 1997.
- ROCHAS, C., LAHAYE, M., YAPHE, W., Sulfate content of carageenan and agar determined by infrared spectroscopy. *Bot. Mar.* 29, 335-340, 1986.
- ROGERS, D.J.; HORI, K. Marine algal lectins: new developments. *Hydrobiologia*, 260/261: 589-593, 1993.
- ROUND, F.E., *Biologia das Algas*, 2^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Dois, S.A., 262 p., 1983.
- ROBLEDO, D., FREILE-PELEGRIN, Y. Chemical and mineral composition of six potentially edible seaweed species of Yucatán. *Botanica Marina* 40, 301-306, 1997.
- ROSEMBERG, G., RAMUS, J., Ecological growth strategies in the seaweeds *Gracilaria follifera* (Rhodophyceae) and *Ulva sp.* (Chlorophyceae): soluble nitrogen and reserve carbohydrates. *Marine Biology* 66, 251-259, 1982.

- SAITO, R.M.; OLIVEIRA, E.C. Chemical screening of Brazillian marine algae producing carrageenans. *Hydrobiol.*, Bucharest, v. 204/205, p. 585-588, 1990.
- SAMPAIO, A.H. Lectins from *Ulva* and *Ptilosa* species. Inglaterra, 191pp. Tese de Doutorado apresentada no Division of Biomedical Science, University of Portsmouth, 1997.
- SAMPAIO, A. H., HOGERS, D. J.; BARWELL, C. J. Isolation and characterization of the lectin from the green marine alga *Ulva lactuca* L. *Botanica marina* 41: 427-433, 1998a.
- SAMPAIO, A. H., HOGERS, D. J.; BARWELL, C. J. A galactose-specific lectin from the red marine alga *Ptilota filicina*. *Phytochemistry*, 48: 5, 765-769, 1998b.
- SHIOMI, K.; YAMANAKA, H.; KIKUCHI, T. Purification and physicochemical properties of a hemagglutinin (GVA-1) in the red alga *Gracilaria verrucosa*. *Bulletin Japanese Society of Scientific Fisheries*, 47(8): 1079-1084, 1981.
- SOGIN, M. L.; GUNDERSON, J. H.; ELWOOD, H. J.; ALONSO, R. A.; PEATTIE, D. A. Phylogenetic significance of the Kingdom concept: an unusual eukaryotic 16S-like ribosomal RNA from *Giardia lamblia*. *Science*, 243: 75 – 77, 1989.
- STANLEY, N.F., Agars. In Stephen AM (ed.), *Food Polysaccharides and Their Applications*. Marcel Dekker Inc., New York, pp. 187–204, 1995.
- STENECK, R.S.; V. TESTA, Are calcareous algae important to reefs today or in the past? *Proc. 8th Int. Coral Reef. Sym.*, 1: 685-688, 1997.
- STORTZ, C. A.; CERESO, A. S. Novel findings in carragenans, agaroids and “hybrid” red seaweed galactans. *Cur. Topics Phytochem.*, v. 4, p. 121-134, 2000.
- TAYLOR, W. R. A synopsis of the marine algae of Brasil. *Ver. Algae. Paris*, v. 5, p. 279 – 313, 1960.
- USOV, A. I.; BILAN, M.I.; SHASHKOV, A.S. Structure of a sulfated xylogalactan from the calcerous red alga *Corallina pulifera* (Rhodophyta, Corallinaceae). *Carbohydr. Res.*, Amsterdan, v. 303, p. 93-102, 1997.
- USOV, A. I. Structural analysis of red seaweed galactans of agar and carrageenan groups. *Food Hydrocolloids*, v.12, p. 301-308,1998.
- USOV, A. I., YAROTSKY, S. V., & SHASHKOV, A. S. ¹³C-NMR spectroscopy of red algal galactans. *Biopolymers*, 19, 977-990, 1980.
- VALIENTE, O., FERNANDEZ, L. E., PEREZ, R. M., MARQUINA, G., & VELEZ, H. Agar polysaccharides from red Seaweeds *Gracilaria domingensis* Sonder ex Kutzing and *Gracilaria mammillaris* (Montagne) Howe. *Botanica Marina*, 35, 77-81, 1992.

VAN DE VELDE, F. Structure and function of hybrid carrageenans Food Hydrocolloids 22, 727–734, 2008.

VAN DE VELDE, F.; KNUTSEN, S. H.; USOV, A. I.; ROLLEMA, H. S.; CEREZO, A. S. ¹H and ¹³C high resolution NMR spectroscopy of carrageenans: application in research and industry. Trends Food Sci. Technol., v. 13, p. 73-92, 2002.

VAN DAMME, E. J. M., BALZARINI, J., SMEETS, K., VAN LEUVEN, F.; PEUMANS, W. J. The monomeric and dimeric mannose – binding proteins from the Orchidaceae species *Listera ovata* and *Epipactis helleborine*: sequence homologies and differences in biological activities. Glycoconjugates journal 11, 321 – 332, 1994.

VAN DEN HOEK, C.; MANN, D.G. & JAHNS, H.M. ALGAE, An introduction to phycology, First edition. Cambridge University Press, Cambridge. 627pp. (1989).

VAN PARIJS, J., BROEKAERT, W. F., GOLDESTEIN, I. J.; PEUMANS, W.J. Hevein: na antifungal protein from rubber-tree (*Hevea brasiliensis*) latex. Planta 183, 258-262, 1991.

VIDOTTI, E. C., ROLLEMBERG, M. C. E. Algas: da economia nos ambientes aquáticos à bioremediação e à química analítica, Química nova, vol. 27, No 1, 139-145, 2004.

YAMAGATA, M.; YAMAGATA, N. Iodine content of thyroid glands of normal Japanese. Journal of Radiat Research, v. 13, p. 81-90, 1972.

YAPHE, W., 1984. Properties of Gracilaria agars. Hydrobiologia 116/117, 171-186.

WINTON, A.L.; WINTON, K.B. Análises de alimentos. Buenos Aires: Hispano Americano, 75 p., 1958.

WONG, K.H., CHEUNG, P.C.K. Nutritional evaluation of some subtropical red and green seaweeds. Part I. Proximate composition, amino acid profile and some physico-chemical properties. Food chemistry 71, 475-482, 2000.