



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

**CULTIVO DA MICROALGA *Dunaliella* sp, EM LABORATÓRIO- EXTRAÇÃO  
E PURIFICAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS SULFATADOS**

**MARIA ALZENIR COSTA DE OLIVEIRA**

---

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

---

**FORTALEZA - CEARÁ - BRASIL  
JANEIRO/2007**

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

---

**Prof. Wladimir Ronald Lobo Fárias, D.Sc.**  
**Orientador/Presidente**

---

**Prof. Alexandre Holanda Sampaio, PhD.**  
**Membro**

---

**José Ariévilto Gurgel Rodrigues, M.Sc.**  
**Membro**

**VISTO:**

---

**Prof. Moisés Almeida de Oliveira, D.Sc**  
**Chefe do Departamento de Engenharia de Pesca**

---

**Prof. Raimundo Nonato de Lima Conceição, D.Sc**  
**Coordenador do Curso de Engenharia de Pesca**

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

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

---

O48c Oliveira, Maria Alzenir Costa de.

Cultivo da microalga *Dunaliella* sp, em laboratório-extração e purificação de polissacarídeos sulfatados / Maria Alzenir Costa de Oliveira. – 2007.

32 f. : il.

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

Orientação: Prof. Dr. Wladimir Ronald Lobo Fárias.

1. Microalga - Cultivo. 2. Algas - Cultivo. 3. Engenharia de Pesca. I. Título.

CDD 639.2

---

## AGRADECIMENTOS

Quando o menor apoio nos pareceu distante e os objetivos inatingíveis, com fé, rogamos pela única força de que realmente precisamos a força de DEUS.

Aos meus pais, que me deram à vida, revestiram na criança todos os valores que me transformaram em um adulto responsável. Abriram à porta do meu futuro, iluminando meu caminho, muito obrigada.

Ao professor Dr. Wladimir Ronald Lobo Farias pela orientação, paciência, compreensão e disposição em todo momento.

Aos colegas de laboratório, em especial Daniel Barroso e Tatiany Freitas.

Aos colegas que conviveram comigo durante o curso.

A todos os meus professores que contribuíram diretamente para a conclusão no curso de Engenharia de Pesca.

**SUMÁRIO**

	Página
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	v
<b>LISTA DE TABELAS</b>	vi
<b>LISTA DE ANEXOS</b>	vii
<b>RESUMO</b>	viii
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	1
1.1. $\beta$ - caroteno	3
1.2. Polissacarídeos Sulfatados	5
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS</b>	9
2.1. Cultivo da microalga marinha <i>Dunaliella</i> sp	9
2.1.1. Manutenção das cepas	9
2.1.2. Preparo da água do mar artificial e do meio de cultivo	9
2.1.3. Início do cultivo	10
2.1.4. Acompanhamento do cultivo	10
2.1.5. Obtenção das curvas de crescimento	11
2.2. Extração de polissacarídeos sulfatados	12
2.3. Fracionamento dos polissacarídeos sulfatados em coluna de troca iônica	13
<b>3. RESULTADOS</b>	15
3.1. Curva de crescimento da microalga <i>Dunaliella</i> sp.	15
3.2. Extração de polissacarídeos sulfatados.	17
3.3. Fracionamento dos polissacarídeos sulfatados em DEAE-celulose	18
<b>4. CONCLUSÕES</b>	20
<b>5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	21

## LISTA DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1. Microalga marinha <i>Dunaliella</i> sp	3
FIGURA 2: Cultivo, estocagem e liofilização para extração de polissacarídeos sulfatados da microalga marinha <i>Dunaliella</i> sp	11
FIGURA 3: Fluxograma de extração dos polissacarídeos sulfatados	13
FIGURA 4: Curva de crescimento da microalga <i>Dunaliella</i> sp em meio de cultivo Guillard/F2, expressa em valores de absorbância a 680 nm.	15
FIGURA 5: Curva de crescimento da microalga <i>Dunaliella</i> sp, expressa em números de células. mL <sup>-1</sup> .10 <sup>-4</sup> por dias de cultivo.	17
FIGURA 6: Cromatografia em coluna de DEAE-celulose do extrato bruto dos polissacarídeos sulfatados extraídos da microalga <i>Dunaliella</i> sp. A partir do monitoramento a 525 nm.	19

**LISTA DE TABELAS**

TABELA 1: Reagentes utilizados no preparo da água do mar artificial.	Página 9
--	-------------

## LISTA DE ANEXOS

Preparação do Meio de cultura- Guillard F/2

Página  
25



## RESUMO

A microalga *Dunaliella* sp é cultivada mundialmente em diversos laboratórios e em ambientes abertos, para obtenção de compostos com atividades biológicas como o  $\beta$ -caroteno, por exemplo. Os polissacarídeos são uma das moléculas mais estudadas em algas, devido ao fato de possuírem atividades antivirais, imunomodulatórias, anticoagulantes entre outras, despertando um grande interesse na biotecnologia. Este trabalho teve como objetivo realizar o cultivo da microalga *Dunaliella* sp em meio de cultivo Guillard F/2 modificado, visando à determinação da curva de crescimento do cultivo através de espectrofotometria e a extração de polissacarídeos sulfatados da biomassa produzida. O acompanhamento do cultivo foi realizado através de leituras de absorbância a 680 nm e pela contagem de células em câmara de Neubauer (hematocitômetro). Assim, foi estabelecida uma regressão linear entre os valores de absorbância e o nº de células por mL dada pela fórmula  $Y = 0,13 + 654,3 X$ , onde  $Y = \text{N}^\circ \text{ de células. ml}^{-1} \cdot 10^{-4}$  e  $X = \text{Abs}_{680 \text{ nm}}$ , com um coeficiente de correlação linear ( $r$ ) de 0,99. Foram realizados um total de 4 cultivos em garrafões de 3 L, onde o crescimento logarítmico foi alcançado no quinto dia, entrando rapidamente em fase estacionária ao sétimo dia. os quais renderam cerca de 1 g de biomassa seca, que foi utilizada para a extração de polissacarídeos sulfatados. A extração resultou em cerca de 20 mg de PS totais, os quais, após fracionados em coluna de DEAE-celulose, resultaram em 4 frações, sendo a maior metacromasia obtida com a eluição na concentração 1,0 M de NaCl. Desta forma, a microalga *Dunaliella* sp cultivada em laboratório, produz polissacarídeos sulfatados, que poderão, futuramente, serem utilizados em ensaios de atividade biológica. Vale salientar que não existem relatos na literatura especializada da extração destas moléculas da microalga em questão.

# CULTIVO DA MICROALGA MARINHA *Dunaliella* sp, EM LABORATÓRIO-EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS SULFATADOS.

MARIA ALZENIR COSTA DE OLIVEIRA

## 1. INTRODUÇÃO

O fitoplâncton é a base dos ecossistemas aquáticos, pois é através da fotossíntese realizada pelas microalgas que a energia entra na cadeia alimentar. Esses organismos microscópicos são em sua grande maioria autotróficos, unicelulares solitárias ou coloniais.

A busca de novas alternativas alimentares que possam diminuir o déficit nutricional existente em uma parcela significativa da população, a um custo acessível, envolve a pesquisa de novos processos e matérias primas. Deste modo, as pesquisas envolvendo a biotecnologia, por meio da utilização de microrganismos ou enzimas para produção de novos produtos, estão revolucionando a sociedade moderna (BENEMANN et al., 1987).

Segundo NAVALHO (1998), a utilização de microalgas na alimentação humana ocorre há séculos, tendo sido usadas como fonte de proteínas por tribos indígenas do Chad e pelos Astecas, que as secavam em lamelas para serem ingeridas.

Quando cultivadas em meios equilibrados, certas espécies de microalgas podem duplicar sua biomassa diariamente, produzindo matéria seca com teor protéico superior a 50% e alcançando produtividades de 30 a 50 gm<sup>-2</sup>. dia<sup>-1</sup> em peso seco (GOLDMAN, 1980). Esta característica, aliada à simplicidade nas técnicas de cultivo, torna as microalgas um dos objetos de pesquisa prioritários das mais modernas áreas de investigação (BENEMANN et al., 1987).

As microalgas apresentam uma distribuição global, podendo ser cultivadas em locais variados, tais como lagos salinos adjacentes a desertos ou nos mares do Ártico e Antártico. Elas possuem um enorme potencial de

aproveitamento, quer como fonte de alimento, quer como reservatórios dos mais diversos compostos de interesse biológico. Entre as maiores dificuldades no cultivo em massa de microalgas, destaca-se a eficiência de um método para o acompanhamento detalhado do desenvolvimento do cultivo e o emprego de um meio de cultura de baixo custo (LIM, 1991; GONZALEZ, 1983; BUITRAGO, 1998).

Existem vários fatores que influenciam durante o crescimento das microalgas. Os fatores ambientais mais importantes são a luz e a temperatura. Entretanto, a temperatura é extremamente necessária porque a formação e a manutenção dos pigmentos é necessária de forma constante durante o crescimento. Já a temperatura afeta as atividades metabólicas e a produção de compostos químicos. Esses são os fatores que mais limitam a produção em escala. Outro fator de grande importância é a salinidade do meio de cultivo que afeta diretamente no incremento da biomassa (VONSHAK, 1997).

As microalgas pertencem às ordens do gênero *Dunaliella* pertencem à divisão Charophyta, ordem Volvocales. Essa ordem se caracteriza por um grupo conhecido principalmente por algas unicelulares de água doce, sendo que a maioria dos membros são unicelulares ou coloniais e suas células vegetativas são flageladas e móveis (figura 1). Esta ordem possui aproximadamente 110 gêneros com cerca de 1000 espécies e as famílias mais importantes são a Chlamydomonadaceae e Volvocaceae (HOEK et al., 1998). O gênero *Dunaliella* compreende espécies de grande importância, sendo alvo da curiosidade científica, industrial e comercial. Estas microalgas crescem, comumente, em lagos hipersalinos, suportando uma alta concentração de sais, alta luminosidade e pH geralmente ácido, em torno de 4,0. São de fácil cultivo, pois possuem reprodução rápida e são organismos halotolerantes (BEN-AMOTZ; AVRON, 1990), podendo se adaptar a uma variedade de concentrações salinas e ocorrer em vários habitats marinhos. Produzem uma grande quantidade de compostos químicos como carotenos, principalmente o  $\beta$ -caroteno, clorofilas *a* e *b*, glicerol, entre outros compostos. Com relação à sua morfologia, suas células possuem paredes celulares não rígidas, com

núcleos inseridos em uma fina e elástica membrana que permitem mudarem facilmente de forma e volume como resposta aos estímulos do meio.

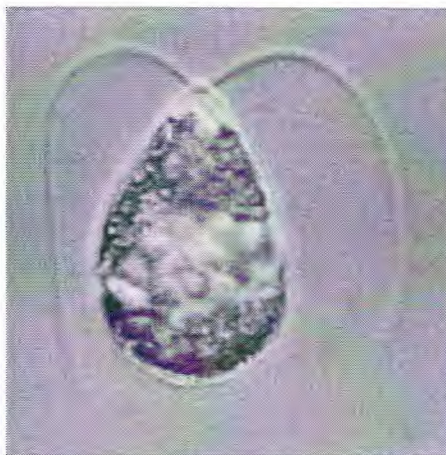


Figura 1: Microalga marinha *Dunaliella* sp

Os registros científicos referentes à espécie *Dunaliella salina* datam de 150 anos, quando o engenheiro francês Dunal mostrou interesse pela coloração avermelhada dos cristalizadores de sal nas salinas mediterrâneas que conhecia. Ele percebeu que a cor vermelha das águas ocorria em salinas onde não existia *Artêmia*, supondo que ela seria a responsável por este fenômeno. Ao examinar no microscópio uma amostra dessa água, constatou uma grande quantidade de células vermelhas e biflageladas, identificando-as como pertencentes ao gênero *Haematococcus*, por se assemelharem as outras algas unicelulares. Entretanto, mais tarde, o cientista, Teodoresco voltou a estudar estas células, provenientes de um lago salgado da Romênia, e percebeu que não se tratava de células de *Haematococcus*, pois estas possuíam uma outra estrutura celular, sendo atribuído o novo gênero, *Dunaliella*, em homenagem ao cientista Dunal (AIRES, 1999).

### 1.1. $\beta$ - caroteno

Todas as algas produzem determinadas quantidades de  $\beta$ -caroteno de modo a assegurarem a manutenção de sua integridade durante a fotossíntese. A alta luminosidade estimula a produção desse carotenóide, que é acumulado nos cloroplastos, provavelmente para proteger a alga de uma alta radiação luminosa. O gênero *Dunaliella* é uma fonte natural de  $\beta$ -caroteno usado em

alimentos como corante e em fármacos, sendo pela primeira vez considerada como uma possível fonte produtora de beta-caroteno por MASSYUK, em 1966 (BOROWITZKA; BOROWITZKA, 1988).

O  $\beta$ -caroteno é um dos compostos carotenóides mais bem estudados. Este carotenóide confere a muitos frutos e vegetais uma pigmentação amarelada, a qual desempenha um importante papel fisiológico, sendo convertido em vitamina A e ácido retinóico no corpo humano (YAMANO et al., 1994; ARMSTRONG, 1997). A espécie *Dunaliella salina* produz cerca de 10 a 100 vezes mais  $\beta$ -caroteno do que a segunda maior fonte desse carotenóide, a cenoura. Porém, é muito difícil efetuar a separação do  $\beta$ -caroteno a partir de fibras de cenoura, sendo apenas 20 a 25% absorvido como nutriente. O gênero *Dunaliella* possui um amplo espectro de carotenóides, quando comparado com os presentes na cenoura. A cenoura apresenta em sua composição, em proporções significantes, apenas os carotenóides  $\alpha$ -caroteno e trans- $\beta$ -caroteno. *Dunaliella* contém, em proporções iguais, os isômeros cis e trans (50%-50%) do  $\beta$ -caroteno, além de possuir  $\alpha$ -caroteno (6 a 10%). Em *Dunaliella*, estão igualmente presentes carotenóides oxigenados (xantofilas), como a luteína e zeaxantina em percentagens que podem chegar a atingir 10% do total (BEN-AMOTZ, 1980).

Quando cultivada sob condições não indutoras de carotenogênese, a espécie *Dunaliella salina* apresenta uma coloração verde, contendo apenas cerca de 0,3% de  $\beta$ -caroteno. No entanto, após a indução da carotenogênese e sob condições de cultivo adequadas, o  $\beta$ -caroteno começa a ser acumulado no interior das vesículas lipídicas, podendo atingir cerca de 10% de seu peso seco, o qual representa o mais elevado conteúdo de  $\beta$ -caroteno que qualquer alga, planta ou outro organismo já estudado (BEN-AMOTZ; AVRON, 1989).

Recentemente, vários estudos foram publicados mostrando diferentes condições de cultivo para otimizar a produção de  $\beta$ -caroteno, a partir de várias espécies do gênero *Dunaliella*.

CELEKLI; DONMEZ (2006) determinaram as condições ótimas requeridas para o maior acúmulo de  $\beta$ -caroteno pela espécie *Dunaliella* sp, isolada de um lago hipersalino. Foram observados parâmetros como o efeito do pH, intensidade luminosa, concentração de sal e nitrogênio durante o crescimento do cultivo. Segundo os autores, o maior número de células

contendo  $\beta$ -caroteno foi obtido em pH 9, com concentração de 20% de NaCl e intensidade luminosa de  $48 \text{ k.ergs cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$ . No final do experimento, foi observado que o máximo teor de  $\beta$ -caroteno acumulado foi de  $0,261 \text{ ng.célula}^{-1}$  e o número de células obtidas foi de  $4,2 \times 10^6$  para um pH de 7,5 e 20% de NaCl.

A espécie *Dunaliella salina* pode ser cultivada para produção de  $\beta$ -caroteno em tanques abertos e em condições climáticas adversas (TAFRESHI; SHARIAT, 2006). Segundo AGUILAR et al. (2004), a espécie também pode ser cultivada em laboratório para acúmulo de  $\beta$ -caroteno em diferentes salinidades com temperatura controlada e sem aeração. Entretanto, a salinidade pode influir na quantidade e na qualidade do  $\beta$ -caroteno (GÓMEZ et al., 2003).

GARCIA et al., (2005) avaliaram a produção de biomassa de *Dunaliella salina* rica em 9-cis-beta-caroteno e luteína em cultivo externo e em um fotobioreator, sendo este último utilizado para otimizar as condições envolvidas no rendimento de biomassa e carotenóides. Os autores observaram que o nível de  $\beta$ -caroteno celular aumentou significativamente durante o período de luz, como também de luteína. A remoção do sombreamento acentuou o acúmulo de carotenóides nas células, atingindo 10% de biomassa seca.

## 1.2. Polissacarídeos Sulfatados

As algas marinhas também possuem outros compostos químicos de elevada importância, tais como os polissacarídeos, que são as macromoléculas mais abundantes nos organismos vivos, garantindo suporte, proteção, forma, rigidez e elasticidade aos tecidos animais e vegetais. Neste grupo destacam-se os polissacarídeos sulfatados, que são moléculas biologicamente ativas e de extrema relevância econômica devido ao fato de serem atóxicos e possuírem propriedades gelatizantes e espessantes com considerável valor comercial (MCLACHAM, 1985; OLIVEIRA, 1997). Além disso, também apresentam atividades farmacológicas (NEUSHUL, 1990; FRANZ, 1989), sendo assim, um dos compostos mais estudados atualmente (KANNO et al, 1990; USOV, 1992).

Os polissacarídeos sulfatados, extraídos de diversas algas marinhas, podem ser aplicáveis em diferentes áreas, como na indústria alimentícia, onde

são utilizados como emulsificantes, estabilizantes e espessantes de alimentos; na indústria cosmética, no preparo de xampus, condicionadores e cremes para o corpo; na biotecnologia, no preparo de culturas gelatinosas e na área das ciências biomédicas (HOEK et al., 1995).

As microalgas também possuem polissacarídeos sulfatados e, recentemente, diversos estudos foram publicados mostrando as diferentes atividades que esses compostos podem apresentar.

Segundo GUZMAN et al. (2003), os extratos brutos de polissacarídeos sulfatados obtidos das microalgas *Chlorella stigmatophora* e *Phaeodactylum tricomutum* apresentaram atividade anti-inflamatória em um modelo de edema induzido por carragenana. Em microalgas vermelhas (Rhodophyta), como por exemplo, *Porphyridium*, sendo esse o único gênero, os polissacarídeos sulfatados apresentaram também propriedades anti-inflamatórias *in vitro* e *in vivo*, quando utilizados em processos inflamatórios da pele humana. Neste estudo, os polissacarídeos sulfatados causaram uma inibição de eritemas cutâneos induzidos através de irritação da pele e os dados obtidos sugeriram que estas moléculas têm um grande potencial para o uso clínico (MATSUI et al., 2003).

Os polissacarídeos sulfatados extraídos da microalga *Porphyridium* sp apresentaram atividade antiviral, *in vitro* e *in vivo*, contra o vírus do herpes simplex tipos I e II (HSV- I e II) (HUHEIHEL et al., 2002). Além disso, esses polissacarídeos também exibiram efeito inibitório contra o vírus *Moloney murine*, onde os autores sugerem que sua inibição é mais eficaz se o mesmo for acrescido antes ou na ocasião da infecção (HULEIHEL; ARAD, 2001). Os polissacarídeos sulfatados extraídos da microalga *Porphyridium* sp, apresentaram uma impressionante atividade antiviral contra o vírus herpes simplex tipo I e II (HSV I e II) e o vírus *Varicella zoster* (VZV) onde foi observado que o tratamento com células com  $1 \text{ mg.ml}^{-1}$  do polissacarídeo resultou em 50% de inibição do HSV. A inibição da produção de novas partículas do vírus também foi inibida quando o cultivo de células pré-infectadas foi tratado com o polissacarídeo e, dependendo da concentração, a molécula ou inibe completamente o desenvolvimento da infecção ou retarda em células pré-infectadas com HSV ou VZV. Deste modo, os autores sugerem que

a referida alga é uma forte candidata ao desenvolvimento de uma nova droga antiviral (HULEIHEL et al., 2001).

Outro polissacarídeo sulfatado, denominado de “cálcio spirulan” (Ca-SP), isolado da microalga marinha *Spirulina platensis*, é um potente agente antiviral. Esse polissacarídeo foi capaz de inibir a replicação do vírus da imunodeficiência humana tipo I (HIV-I) e do herpes simples tipo I (HSV-I). Além disso, o Ca-SP pode ser considerado como um agente anti-HIV bastante promissor já que, mesmo em baixas concentrações, ele foi capaz de inibir a formação de sincício induzida pelo vírus, apresentou uma baixa atividade anticoagulante e uma meia vida bem elevada no sangue de ratos (HAYASHI et al., 1996).

Dentre todas as atividades biológicas relatadas para os polissacarídeos sulfatados de algas e outros organismos marinhos, os estudos se concentram, principalmente, nas atividades anticoagulante e antitrombótica. Farias et al. (2000) purificou e caracterizou a estrutura de uma galactana sulfatada extraída da alga marinha vermelha *Botryocladia occidentalis*. Esta D-galactana sulfatada possui uma elevada atividade anticoagulante (semelhante à heparina) determinada pela presença de dois ésteres de sulfato em um único resíduo de galactose. O mecanismo desta atividade anticoagulante ocorre através da potencialização da inibição da trombina via antitrombina e cofator II da heparina. Essa galactana sulfatada também apresentou atividade antitrombótica, quando testada em um modelo experimental de trombose venosa em ratos e não apresentou efeito hemorrágico quando comparada com a heparina (FARIAS et al., 2001).

Em relação a outros organismos, foi observada uma elevada atividade anticoagulante e antitrombótica em um condroitim fucosilado extraído da parede do corpo do pepino-do-mar *Ludwigothurea grisea*, sendo uma alternativa promissora para substituir a heparina (MOURÃO et al., 1998). A heparina é o polissacarídeo sulfatado atualmente usado na clínica médica, no entanto apresenta uma série de efeitos colaterais como o risco de sangramentos e queda na contagem de plaquetas (THOMAS, 1997; WARKENTIN et al., 1998). Também foram isolados e caracterizados dermatam sulfatos de várias espécies de ascídias, os quais foram utilizados em ensaios de atividade anticoagulante, incluindo a ativação do cofator II da heparina. Todos os dermatam sulfatos das



ascídias possuem um alto teor de  $\alpha$ -L-ácido idurônico 2-O sulfatados, mas, diferem no padrão de sulfatação dos resíduos de N-acetil- $\beta$ -D-galactosamina. Os dermatam sulfatos das ascídias *S. plicata* e *H. pyriformis*, que possuem unidades 4-O-sulfatadas, são potentes anticoagulantes devido à potencialização da inibição da trombina pelo cofator II da heparina e não pela antitrombina. Estes dermatam sulfatos possuem atividade anticoagulante ~10 e ~6 vezes maiores do que os dermatam sulfatos de mamíferos nativos e "oversulfatado", respectivamente (PAVÃO et al., 1998).

Outro grupo de polissacarídeos sulfatados encontrados em algas marinhas são principalmente as carragenanas e o fucoidam. Esses compostos geralmente são encontrados no espaço extracelular ou na matriz mucilaginosa de várias espécies de algas marinhas. As carragenanas são polímeros lineares constituídos de unidades alternadas de  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4) D-galactopiranosose e  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 3) galactopiranosose. A complexidade da estrutura destes compostos decorre da presença de diferentes proporções de  $\alpha$ -D - ou L-galactopiranosose, da presença de grupamentos sulfatos nas posições 2,4 ou 6 dos resíduos de  $\beta$ -D-galactopiranosose ou nas posições 2 e/ ou 6 dos resíduos de  $\alpha$ -galactopiranosose e da formação de 3,6-anidro-galactose, decorrente da eliminação do sulfato da posição 6 dos resíduos de  $\alpha$ -galactopiranosose. Vários aspectos da estrutura e metabolismo dos polissacarídeos de algas marinhas são descritos em revisões específicas (PERCIVAL; MCDOWELL, 1967; PAINTER, 1983).

Apesar de vários trabalhos terem sido publicados utilizando o gênero *Dunaliella*, ainda não existe relato de extração de polissacarídeos sulfatados destas microalgas.

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

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. Cultivo da microalga marinha *Dunaliella* sp:

#### 2.1.1. Manutenção das cepas:

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

#### 2.1.2. Preparo da água do mar artificial e do meio de cultivo

A água utilizada no meio de cultivo foi uma água do mar artificial preparada a partir de água clorada obtida do fornecimento urbano (Cia. CAGECE), previamente aerada por, no mínimo, 3 dias para a completa evaporação do cloro (Tabela1). Dos reagentes utilizados, apenas o cloreto de magnésio e o brometo de potássio foram de grau analítico, enquanto os demais de grau comercial.

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

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

O cultivo da microalga *Dunaliella* sp foi realizado utilizando o meio de cultivo Guillard F/2 modificado, constituído de uma solução de nitrato de sódio (solução 1), uma solução de fosfato de sódio (solução 2), uma solução de metais traço (solução 4) e uma solução de vitaminas (solução 3) (Anexo 1). Para cada 1 L de água do mar artificial, previamente preparada, foi adicionado 1 mL das soluções 1, 2 e 3 e 0,5 mL da solução 3.

### **2.1.3. Início do cultivo**

Após a repicagem, o cultivo da microalga *Dunaliella* sp (figura 1) foi iniciado com um volume de 10 mL em um erlenmeyer de 100 mL, no qual, a cada 2 dias, foi acrescentado o mesmo volume de meio de cultura esterilizado. Após 8 dias, o conteúdo do erlenmeyer de 100 mL foi transferido para outro erlenmeyer de 250 mL. Mais uma vez o volume foi aumentado com a adição de mais meio de cultivo, a cada dois dias e, finalmente, o conteúdo do erlenmeyer de 250 mL foi transferido para um recipiente de 3 L. Neste momento, o volume foi completado para 3 L com a adição de meio de cultivo esterilizado e a cultura passou a ser submetida a uma aeração constante e iluminância de aproximadamente 1.000 Lux .

### **2.1.4. Acompanhamento do cultivo**

O acompanhamento do crescimento populacional das microalgas foi realizado no recipiente de 3 L por espectrofotometria e por contagem de células. Desta forma, a cada 2 dias, foi retirada uma alíquota do volume, a qual foi levada a um espectrofotômetro para a leitura da absorbância no comprimento de onda de 680 nm. Em seguida, as células contidas na amostra foram fixadas com solução de formalina neutralizada com bórax e feita a contagem celular em câmara de Neubauer (hemacitômetro). Os dados obtidos foram utilizados para traçar a curva de crescimento e todo o volume do cultivo (3 L) foi centrifugado (3.500 x g; 15 min; 4° C) para a obtenção da biomassa algal, a qual foi conservada sob congelamento (-20 °C). Em seguida, novos cultivos foram realizados com a finalidade de obter uma quantidade suficiente de microalgas para a extração de polissacarídeos sulfatados (figura 2).

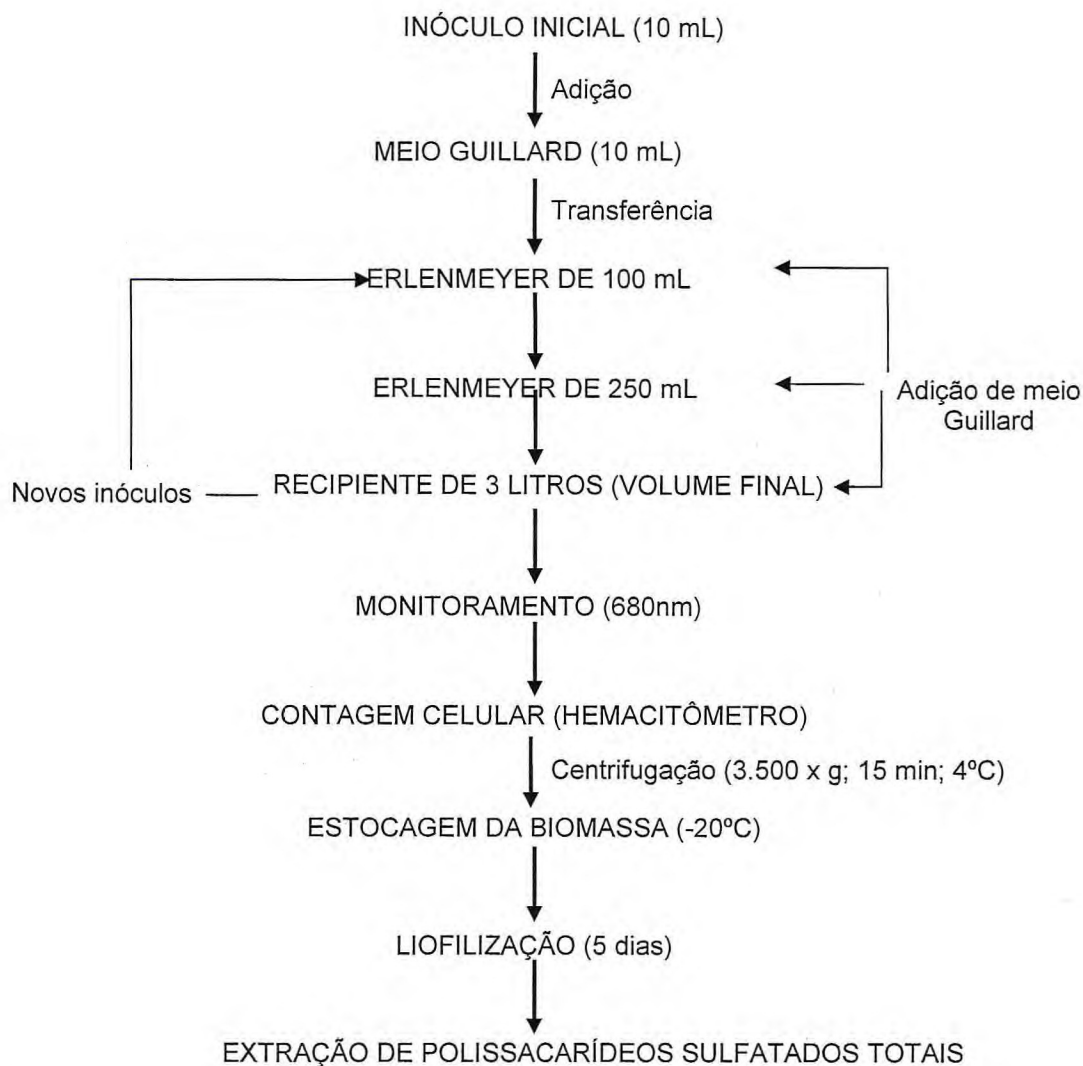


Figura 2: Cultivo, estocagem e liofilização para extração de polissacarídeos sulfatados da microalga marinha *Dunaliella sp*

### 2.1.5. Obtenção das curvas de crescimento

Os valores de absorbância e seus respectivos valores de contagens de célula foram, inicialmente, submetidos a uma análise de correlação linear utilizando o programa Excell. Em seguida, os dados foram utilizados para a obtenção da reta de regressão linear entre os valores de absorbância e o nº de células.  $\text{mL}^{-1}$ , sendo as curvas de crescimento expressas tanto em valores de absorbância como em nº de células.  $\text{mL}^{-1}$ . Após a obtenção da equação de regressão linear, os cultivos foram monitorados apenas através de espectrofotometria.

## 2.2. Extração de polissacarídeos sulfatados

Esse procedimento foi realizado no Laboratório de Bioquímica Marinha do Departamento de Engenharia de Pesca/CCA/UFC. Inicialmente, a biomassa algal produzida e congelada foi lavada com água destilada e, posteriormente, liofilizada. A extração foi realizada a partir de 1 g de biomassa seca, a qual foi hidratada com 50 mL de tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 5,0, contendo EDTA 5mM e cisteína 5mM. Em seguida, foram adicionados 3,4 mL de uma solução de papaína (30 mg/mL), sendo a mistura incubada a 60°C por 24 horas.

Após esse período, a mistura foi filtrada e centrifugada (6.500 x g; 20 min; 4°C), separando-se o resíduo do sobrenadante. Ao sobrenadante, foram adicionados 3,4 mL de solução de CPC 10% (cloreto de cetilpiridínio) para precipitar os polissacarídeos sulfatados por 24 horas, à temperatura ambiente. Após a precipitação, a mistura foi novamente centrifugada, descartando-se o sobrenadante. O precipitado foi lavado com 100 mL de CPC 0,05% e, posteriormente, dissolvido em 35 mL de uma solução de NaCl 2M:etanol (100:15;v:v). Em seguida, os polissacarídeos foram novamente precipitados com a adição de 60 mL de etanol absoluto, por 24 horas a 4°C. Finalmente, os polissacarídeos sulfatados foram lavados duas vezes com 100 mL de etanol 80% e uma vez com 60 mL de etanol absoluto, sendo levados à estufa a 60°C para secagem, obtendo-se os polissacarídeos sulfatados totais (figura 3).

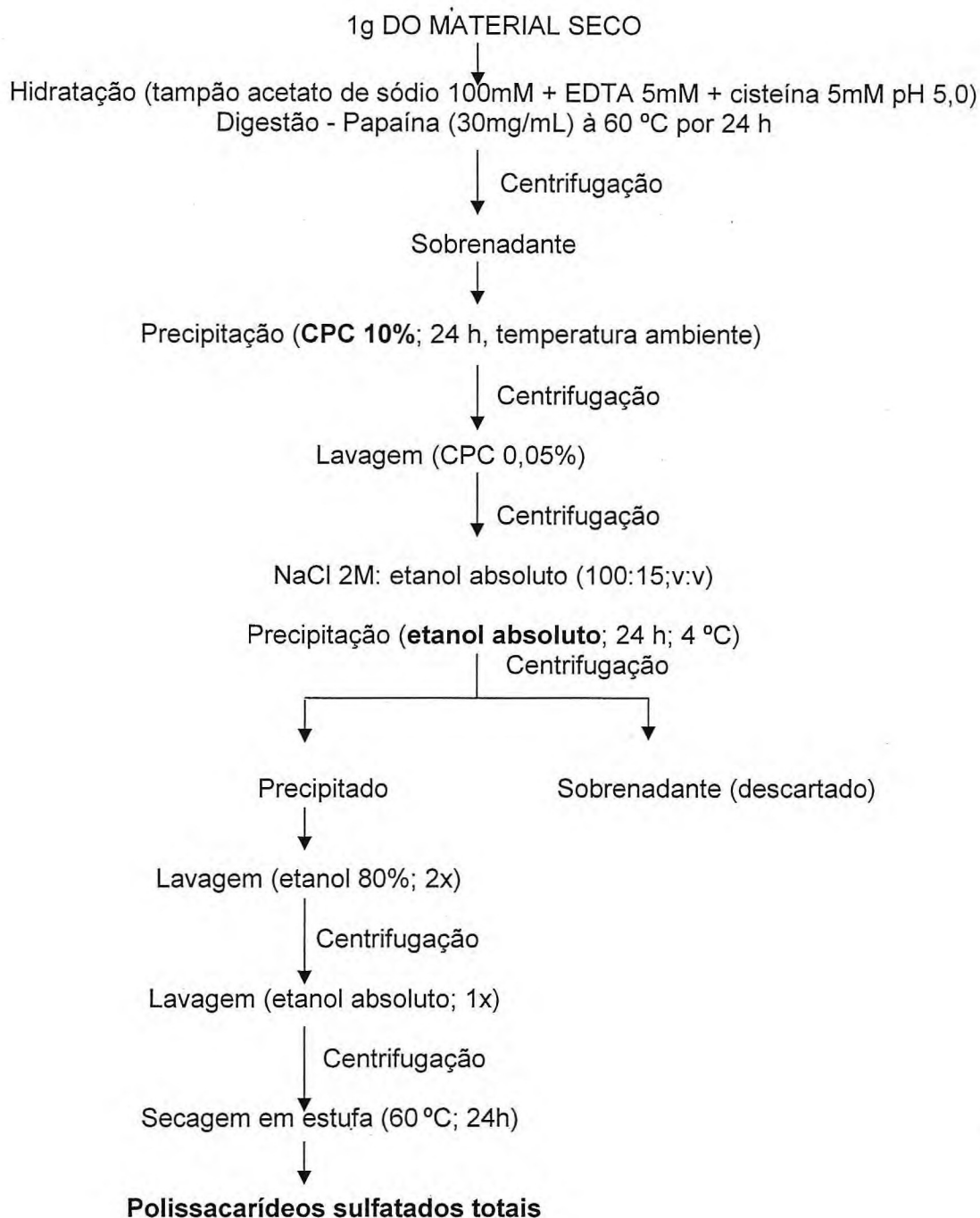


Figura 3: Fluxograma de extração dos polissacarídeos sulfatados.

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

O extrato bruto (EB) obtido na extração foi fracionado em coluna de DEAE-celulose (6,5 cm x 1,5 cm) acoplada a um coletor de frações, a fim de separar os polissacarídeos sulfatados. A coluna foi, inicialmente, equilibrada

com tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 5,0 + cisteína 5 mM e EDTA 5mM. Em seguida, foi aplicado no topo do gel, 3,0 mL de uma solução de 3mg/mL de EB sendo o fluxo da coluna ajustado para 60 mL/h. A eluição dos polissacarídeos sulfatados presentes no EB foi realizada passo a passo, utilizando soluções com diferentes concentrações de NaCl (0,25; 0,50; 0,75; 1,0; 1,25; 1,50; 1,75; e 2,0 M), preparadas no mesmo tampão de equilíbrio. Durante a eluição da coluna, foram coletadas frações de 1mL e a presença dos PS foi evidenciada através da reação metacromática. Para isso, 200  $\mu$ L de cada fração foram misturados com 1 mL de azul-dimetil-dimetileno (DMB), que é um indicador específico para grupos sulfatados, mudando sua coloração na presença de polissacarídeo sulfatado. Todo o monitoramento foi determinada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 525 nm.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1. Curva de crescimento da microalga *Dunaliella* sp.

Inicialmente, a curva de crescimento da microalga foi expressa em valores de absorvância a 680 nm (Figura 4). Analisando o perfil da curva de crescimento de *Dunaliella* sp, foi possível observar que houve uma nítida fase de indução até o 3º dia, após o início do cultivo. A partir do 3º dia, o cultivo entrou em crescimento exponencial, o qual se prolongou até o 5º dia. Do 5º dia até o 7º dia, o cultivo passou para a fase de diminuição do crescimento relativo. Segundo Da SILVA (2004), nesta fase, o aumento do número de células é limitado pela quantidade de nutrientes presentes no meio de cultivo. Desta forma, a centrifugação das microalgas foi realizada nesse período, pois a partir desse momento, a taxa de mortalidade aumentará devido a uma maior competição por nutrientes e luz, prejudicando a qualidade da microalga. A partir do 7º dia de cultivo, a cultura entrou em fase estacionária, não havendo mais aumento no nº de células.

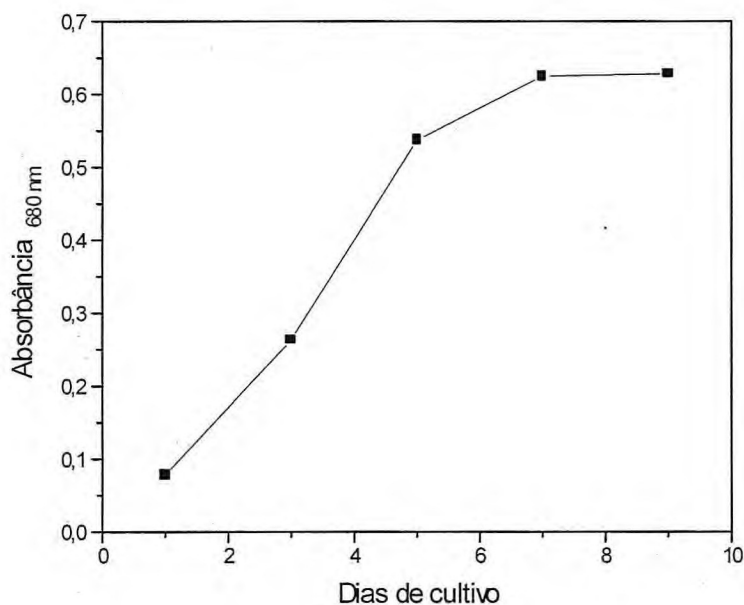


Figura 4: Curva de crescimento da microalga *Dunaliella* sp em meio de cultivo Guillard/F2, expressa em valores de absorvância a 680 nm.



Segundo PELCZAR (1996), a primeira fase em um cultivo estacionário é a fase lag ou espera, onde o crescimento da cultura é mínimo, devido a uma adaptação fisiológica às novas condições de cultivo. A segunda fase é chamada de exponencial, ou fase log, na qual ocorre uma duplicação do nº de células em intervalos regulares de tempo. Nesta fase, as microalgas estão bem adaptadas ao meio, sendo este período considerado o momento ideal para a transferência das culturas (repicagem) e/ou extração de compostos biológicos, pois as células estão em seu melhor momento fisiológico. Se não houver a transferência da cultura, o cultivo entra na terceira fase que é a de diminuição do crescimento relativo, no qual o aumento do número de células é limitado, principalmente, pela escassez de nutrientes. Em seguida, a cultura entra na fase estacionária onde ocorre um equilíbrio entre as taxas de crescimento e mortalidade, não havendo incremento líquido no nº de células. Após esta fase, o cultivo declina completamente com a taxa de mortalidade superando a taxa de crescimento da cultura.

A intensidade da cor do cultivo, medida através de espectrofotometria aumenta proporcionalmente com a elevação do nº de células das microalgas. Um exemplo é a forte relação existente entre a absorbância e o número de tricomas. mL<sup>-1</sup> obtida em um cultivo da microalga cianofícea *Spirulina platensis*, a qual apresentou um coeficiente de correlação linear (r) de 0,9 para um nível de significância de 95% (Da SILVA, 2004). Desta forma, a partir dos valores de absorbância e respectivos valores de contagem de células de *Dunaliella* sp, foi realizada uma análise de correlação linear, sendo verificada, também, a existência de uma forte relação com um coeficiente de correlação "r" de 0,99 para um nível de significância de 95%. Desta forma, os dados de absorbância e contagem de células foram utilizados para a obtenção da reta de regressão linear, cuja equação resultante foi a seguinte  $Y = 0,13 + 654,3 X$ , onde  $Y = \text{N}^\circ \text{ de células} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot 10^{-4}$  e  $X = \text{Abs}_{680 \text{ nm}}$ .

A partir da obtenção da reta de regressão linear, foi traçada a curva de crescimento da microalga *Dunaliella* sp, sendo expressa através dos valores calculados pela equação, bem como pelos valores observados (contagem de células) durante o cultivo (Figura 5).

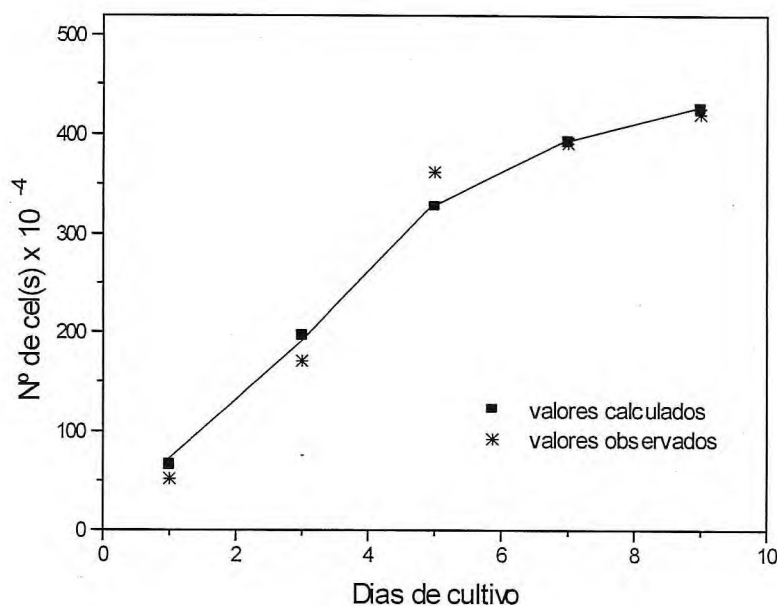


Figura 5: Curva de crescimento da microalga *Dunaliella* sp, expressa em números de células. mL<sup>-1</sup>.10<sup>-4</sup> por dias de cultivo.

### 3.2. Extração de polissacarídeos sulfatados.

Foram realizados 4 cultivos em garrafrões de 3 L, a biomassa úmida, centrifugada e liofilizada, resultou em aproximadamente 1g de *Dunaliella* sp seca. O material foi utilizado para a extração de polissacarídeos sulfatados, sendo obtidos, ao final do processo, cerca de 20 mg de extrato bruto, o que corresponde a um rendimento de 2%. Em trabalhos envolvendo a extração de polissacarídeos sulfatados de macroalgas marinhas, foram obtidos rendimentos bastante superiores, sendo de 21,4% para alga vermelha *Gracilaria cornea* (MELO et al., 2002), 22,3% para a alga marinha parda *Sargassum polycistum* (CHOTIGEAT et al., 2004), 13% para a alga verde *Caulerpa racemosa* (RODRIGUES; FARIAS, 2005) e 7,1% para a alga verde *Caulerpa sertularioides*. Rendimentos bem mais significativos foram obtidos a partir das algas marinhas vermelhas *Solieria filiformis*, alcançando 46,8% (PONTES, 2005) e *Champia feldmanni*, a qual rendeu 36,2% (TORRES, 2005).

No entanto, o rendimento de 2%, obtido a partir da microalga *Dunaliella* sp, poderá ainda ser otimizado, submetendo o resíduo da primeira extração às novas extrações, já que, em alguns casos, o rendimento aumenta, como relatado por Torres (2005) quando foi possível extrair uma considerável

quantidade de polissacarídeos sulfatados em até quatro incubações utilizando o mesmo resíduo, sendo o melhor rendimento obtido na segunda, decrescendo na terceira e quarta incubações. Além disso, no caso das microalgas, a produção é toda realizada em laboratório o que permite a possibilidade de um elevado acúmulo de biomassa, enquanto que para as macroalgas marinhas, existe a dependência da coleta no ambiente natural.

### **3.3. Fracionamento dos polissacarídeos sulfatados em DEAE-celulose**

Após o fracionamento do extrato bruto contendo os polissacarídeos sulfatados, obtido da microalga *Dunaliella* sp em coluna de troca iônica DEAE-celulose, foram obtidas 4 frações, sendo eluídas com 0,5; 0,75; 1,0 e 1,5 M de NaCl. A fração que apresentou uma maior metacromasia foi a eluída com 1,0 M de NaCl, seguida das eluições com 0,75 e 0,5 M de NaCl (Figura 6). Este é o primeiro relato do fracionamento de PS de uma microalga na literatura, pois até o presente momento, apenas foram fracionados polissacarídeos sulfatados extraídos de macroalgas marinhas (FARIAS et al, 2000; RODRIGUES; FARIAS, 2005; PONTES, 2005; TORRES, 2005). O referido fracionamento foi realizado a partir do extrato obtido da primeira extração da biomassa algal, sendo necessárias novas extrações, da mesma biomassa inicial, para a realização de outros fracionamentos. Futuramente, as frações obtidas poderão ser concentradas por liofilização e submetidas a ensaios de atividade biológica.

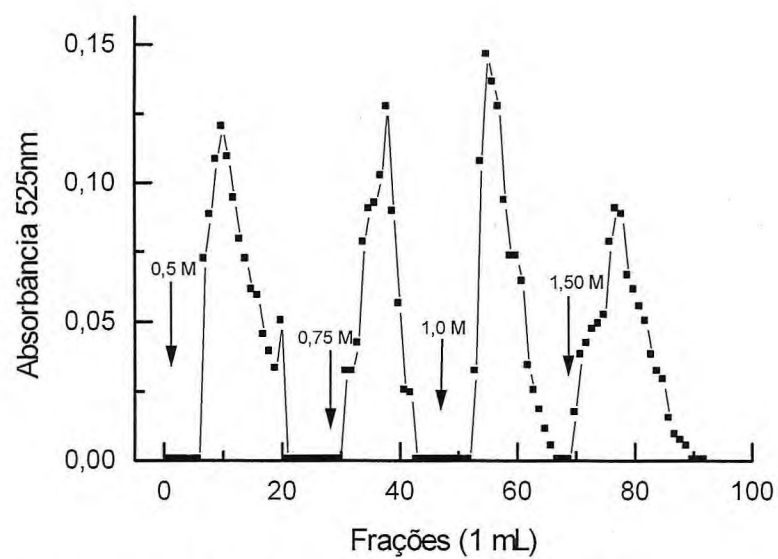


Figura 6: Cromatografia em coluna de DEAE-celulose do extrato bruto dos polissacarídeos sulfatados extraídos da microalga *Dunaliella* sp. A partir do monitoramento a 525 nm.

#### 4. CONCLUSÕES

Após a realização do presente trabalho, pode-se concluir que a microalga *Dunaliella* sp obteve um excelente desenvolvimento em meio Guillard F/2 modificado, atingindo a fase estacionária de crescimento no 7º dia e que, o estabelecimento de uma correlação entre os dias de cultivo e o número de células por mL desta espécie, possibilitou seu acompanhamento através de espectrofotometria. Além disso, foi o primeiro relato da extração de polissacarídeos sulfatados a partir da biomassa seca do gênero, o qual também revelou perfil cromatográfico bem rico dessas moléculas. Assim, sugerem-se futuros ensaios biológicos do uso de suas frações obtidas durante o fracionamento em DEAE-celulose.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUILAR C.P.; GONZALEZ M.; CIFUENTES A.S.; SILVA M. Growth and accumulation of total carotenoids in two strains of *Dunaliella salina* Teodoresco (chlorophyceae) from the northern and central coast of Peru. **Journal of The Chilean Chemical Society**, Concepcion, v.49 ,n.1,p.69-74, Mar 2004.

AIRES, A. C. V. **Separação e análise de pigmentos em culturas de *Dunaliella salina***. v.1, p.12, 1999. Disponível em: <[http://www.ualg.pt/npfcma/docs/trabs\\_bmp/pl\\_dunaliella\\_salina.pdf](http://www.ualg.pt/npfcma/docs/trabs_bmp/pl_dunaliella_salina.pdf) Acesso em 6 ago 2006.

ARMSTRONG, G.A. Genetics of eubacterial carotenoid biosynthesis: a colorful tale. **Annu. Rev. Microbio.**v 51, p. 629-659,1997.

BEN-AMOTZ, A . Glycerol production in the alga *Dunaliella*. In Biochemical and photosynthetic aspects of energy production. Eds. A San Pietro, p.191-208, 1980.

BEN-AMOTZ, A.; AVRON, M. The wavelength dependence of massive carotene syntesis in *Dunaliella bardawil* (Clorophyceae). **Journal Phycology**, v. 25, p.175-178, 1989.

BEN-AMOTZ, A.; AVRON,M. The biotechnology of cultivanting the halotolerant alga *Dunaliella*. **Trends in biotechnology**, Amsterdam, v.8, p.121-126,1990.

BENEMANN, J. R.; TILLET, D. M.; WEISSMAN, J. C. Microalgae biotechnology. **Trends in biotechnology**, Amsterdam,v. 5, p. 47-53,1987.

BOROWITZKA, M.A.; BOROWITZKA, L.J. *Dunaliella*. In microalgal biotechnology. eds. Michael and Lesley Borowitzka. Cambridge, University Press, p. 28-59, 1988.

BUITRAGO, E.B. Concetracion y preservación de microalgas como reserve de alimento de organismos marinos cultivables. **Red Nacional de Acuicultura**. Cuba. p.47-53, 1998.

CELEKLI A; DONMEZ G. Effect of pH, light intensity, salt and nitrogen concentrations on growth and beta-carotene accumulation by a new isolate of *Dunaliella* sp. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**. v.22,n. 2,p.183-189, 2006.

CHOTIGEAT, W.; TONGSUPA, S.; SUPAMATAYA, K.; PHONGDARA, A. Effect of fucoidan on disease resistance of black tiger shrimp. **Aquaculture**, Amsterdam, v.233, n.1-4, p.23-30, Apr 2004.

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

FARIAS, W.R.L.; NAZARETH, R.A; MOURÃO, P.A.S. Dual effects of sulfated D-galactans from the red algae *Botryocladia occidentalis* preventing thrombosis and inducing platelet aggregation, **Thrombosis and Haemostasis**, Stuttgart, v.86, n.6, p.1540-1546, Dec 2001.

FARIAS, W.R.L.; VALENTE, A.P.; PEREIRA, M.S.; MOURÃO, P.A.S. Structure and Anticoagulant Activity of Sulfated Galactans. Isolation of a unique sulfated galactan from the red algae *Botryocladia occidentalis* and comparison of its anticoagulant action with that of sulfated galactans. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.275,n.38, p. 29299 - 29307, Sep 2000.

FRANZ, G. **Plant med.**, v. 55, p. 493, 1989.

GARCIA-GONZALEZ M.; MORENO J; MANZANO J.C.; FLORENCIO F.J.; GUERRERO MG. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v.115,n.1,p. 81-90, Jan 2005.

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

GOMEZ P.I.; BARRIGA A.; CIFUENTES A.S.; GONZALEZ M.A. Effect of salinity on the quantity and quality of carotenoids accumulated by *Dunaliella salina* (strain conc 007) and *Dunaliella bardawil* (strain atcc 30861) Chlorophyta. **Biological Research**, Amsterdam, v. 36, n. 2, p.185-192, 2003.

GUZMAN S; GATO A; LAMELA M; FREIRE-GARABAL M; CALLEJA JM. Anti-inflammatory and immunomodulatory activities of polysaccharide from *Chlorella stigmatophora* and *Phaeodactylum tricomutum*. **Phytotherapy Research**, Galicia, v.17, n. 6,p. 665-670, Jun 2003.

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

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

HOEK, C. VAN DEN; MANN, D.G. & JAHNS, H.M. Algae: an introduction to Phycology. Cambridge University Press, 627 p, 1998.

HUHEIHEL M; ISHANU V; TAL J; ARAD S. Activity of Porphyridium sp polysaccharide against herpes simplex viruses in vitro and in vivo. **Journal of Biochemical And Biophysical Methods**, v. 50, n. 2-3, p.189-200, Jan 2002.

- HUHEIHEL M.; ARAD S. Effect of Porphyridium sp. Polysaccharide on malignant cell transformation by moloney murine sarcoma virus. **Anticancer Research**, Amsterdam, v. 21,n.3B, p. 2073-2078, May-Jun 2001.
- HUHEIHEL M; ISHANU V; TAL J; ARAD S. Antiviral effect of red microalgal polysaccharides on herpes simplex and varicella zoster viruses. **Journal of Applied Phycology**, Dordrecht, v.13 , n.2, p.127-134, Apr 2001.
- KANNO, N., SATO, M. **Biochemistry Inter.**, v.21, p.519, 1990.
- KLEIN, V. L. M., GONZALEZ, A. A. N. Cultivo da microalga *Tetraselmis chuii* Prings em diferentes meios de cultura. **Ciência Agrônômica**, Fortaleza, v. 24, p. 91-100, 1983.
- MATSUI MS; MUIZZUDIN N; ARAD S; MARENUS K. Sulfated polysaccharides from red microalga have antiinflammatory properties in vitro and in vivo. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 104, n. 1, p.13-22, Jan 2003.
- MCLACHLAM, J. **Plant and Soil**, v.89, p.137,1985.
- MOURÃO, P.A.S., GUIMARÃES, M.A.M, MULLOY, B., THOMAS, S. GRAY, E., Antithrombotic activity of a fucosilated chondroitin sulphate from echinoderm: sulphated fucose branches on the polysaccharide account for its antithrombotic action. **British Journal of Hematology**, London, v.101, p.647-652, 1998.
- MELO, M.R.S.; FEITOSA, J.P.A.; FREITAS, A.L.P. PAULA, R.C.M. Isolation and chacterization of soluble sulfated polysaccharide from the red seaweed *Gracilaria cornea*. **Carbohydrate Polymers**, Oxford, v.49, n.4, p.491-498, Sep 2002.
- NAVALHO, J. **Biotechnologia de *Dunaliella salina* para a produção de beta-caroteno**. Dissertação de Mestrado em aqüicultura apresentada à unidade de Ciências e Tecnologia dos Recursos Aquáticos da Universidade do Algarve, p.112,1998.
- NEUSHUL, M. **Hydrobiologia**, v.99, p.204-205, 1990.
- OLIVEIRA, E. C. **Panorama da Aquicultura**, maio/junho, 24,1997.
- PAINTER , T.J. **The Polysaccarides**. New York: Academic Press, v.2, p. 195,1983.
- PAVÃO, M.S.G.; AIELLO, K.R.M.; WERNECK, C.C.; SILVA, L.C.F.; VALENTE, A.P.; MULLOY, B.; COLWELL, N.S.; TOLLEFSEN, D.M.; MOURÃO, P.A.S. highly sulfated dermatan sulfates from ascidians: structure versus anticoagulant activity of these glycosaminoglycans. **Journal of Biological Chemistry**, Besthesda, v. 273, p. 27848-27857, Oct 1998.
- PELCZAR, J. JOSEPH MICHAEL. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. Editora Makron Books, 2 edição, v.1, c.6, p. 179-182, 1996.



PERCIVAL, E.; MACDOWELL, R.H. **Chemistry and Enzymology of Marine Algal Polysaccharides**. New York: Academic Press, 1967.

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

RODRIGUES, J.A.G.; FARIAS, W.R.L. Extração, fracionamento, purificação e atividade anticoagulante dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha verde *Caulerpa racemosa* (Caulerpales, Chlorophyta). In: **XIV CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA DE PESCA**, 1., p. 1693-1701, 2005, Fortaleza. **Anais....Ceará, XIV CONBEP**, 2005. CD-Rom.

TAFRESHI AH, SHARIATI M. Pilot culture of three strains of *Dunaliella salina* for beta-carotene production in open ponds in the central region of Iran. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.22, n.9, p.1003-1006, Sep 2006.

THOMAS, D.P. Does low molecular weight heparin cause less bleeding? **Thrombosis and Haemostasis**, Stuttgart, v.78, n.6, p.1422-1425, Dec 1997.

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

USOV, A. J. **Foods Hydrocolloids**, v.6, p.9, 1992.

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

WARKENTIN, T.E.; CHONG, B.H.; GREINACHER, A. Heparin-induced thrombocytopenia: Towards consensus: Review article. **Thrombosis and Haemostasis**. Stuttgart. v.79, n.1, p. 1-7, Jan 1998

YAMANO, S.; ISHII, T.; NAKAGAWA, M.; IKENAGA, H.; MISAWA, N. Metabolic engineering for production of beta-carotene and lycopene in *Saccharomyces cerevisiae*. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**. v.58, p.1112-1114, 1994.

## ANEXO

### Preparação do Meio de cultura- Guillard F/2

#### Solução 1. Nitrato de sódio

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

#### Solução 2. Fosfato de sódio

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

#### Solução 3: Vitamina

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

#### Solução 4: Metais Traços

Primeiro passo: preparar as seguintes soluções.

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

Segundo passo: preparar a solução.

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

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