

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E RECURSOS NATURAIS

FABRÍCIO SEBASTIANI MECCHERI

**Diversidade e possíveis aplicações quimiotaxonômicas dos polissacarídeos
extracelulares de microalgas verdes cocoides**

São Carlos

2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E RECURSOS NATURAIS

**Diversidade e possíveis aplicações quimiotaconômicas dos polissacarídeos
extracelulares de microalgas verdes cocoides**

FABRÍCIO SEBASTIANI MECCHERI

Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Ecologia e Recursos Naturais
da Universidade Federal de São Carlos, como
parte dos requisitos para obtenção do título de
Doutor em Ciências, área de concentração:
Ecologia e Recursos Naturais

Orientador: Prof, Dr. Armando Augusto Henriques Vieira

SÃO CARLOS -SP

2016

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da Biblioteca Comunitária UFSCar
Processamento Técnico
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

M486d Meccheri, Fabrício Sebastiani
Diversidade e possíveis aplicações
quimiotaxonômicas dos polissacarídeos extracelulares
de microalgas verdes cocoides / Fabrício Sebastiani
Meccheri. -- São Carlos : UFSCar, 2017.
116 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São
Carlos, 2016.

1. Quimiotaxonomia. 2. Polissacarídeo extracelular.
3. Microalga. 4. Ligações glicosídicas. 5.
Selenastraceae. I. Título.

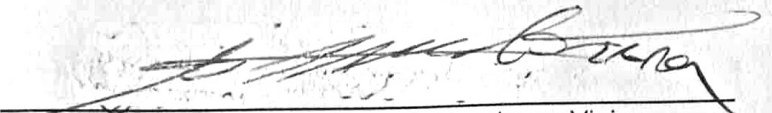


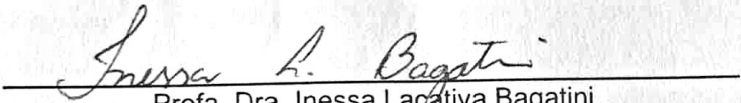
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

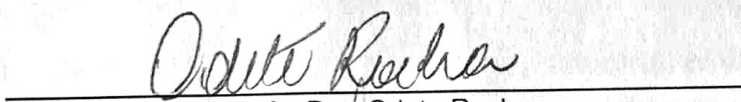
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais


Folha de Aprovação

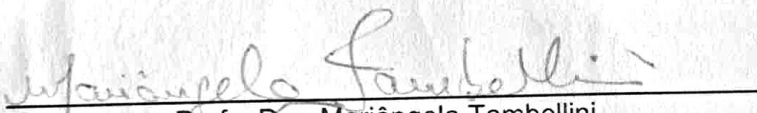
Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado do candidato Fabrício Sebastiani Meccheri, realizada em 09/09/2016:


Prof. Dr. Armando Augusto Henriques Vieira
UFSCar


Profa. Dra. Inessa Lactiva Bagatini
UFSCar


Profa. Dra. Odete Rocha
UFSCar


Profa. Dra. Cristina Souza Freire Nordi
Unifesp


Profa. Dra. Mariângela Tambellini
UFTM

“O maior bem do homem é uma mente inquieta”

(Isaac Asimov)

Agradecimentos

Acknowledgements

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro e institucional concedida durante o período, processo número 2012/00221-4

Ao Prof. Dr. Armando Augusto Henriques Vieira pela orientação, ensinamentos, dedicação, paciência, confiança e pela amizade, enfim por todos esses anos.

I would like to leave special thanks to Professor Berit for the valuable opportunity for improvement, for the patience in teaching me, believing in the study and especially for the contributions and advices. It was a relevant time for the improvement of my ability to do science.

À professora Dra. Ana Teresa Lombardi pelas contribuições ao trabalho, tanto na qualificação, quanto na defesa.

I would like to thank the staff of the Farmacognosis Department, Oslo University, for the help and pleasant days. A special thank to the technicians Suthajini Yogarajah and Hoai Aas for helping me with the technical aspects of the analysis of the monosaccharide composition and linkage studies. Their knowledge were incredibly important for this work.

Ao Luiz pelos seus conselhos construtivos e pela ajuda indispensável.

Ao Luizinho pela diversão nas coletas e pela companhia.

Aos Amigos do laboratório de Ficologia, pelas conversas, pelas discussões, pelas reuniões, pela ajuda: Helena Vieira, Guilherme de Moraes, Ingrid Moreira, Thais Garcia, Naiara Archanjo, Cilene Mori, Marcelo Malisano, e aos dois novos seguidores do mundo fantástico dos polissacarídeos, Kelly Cristina e Thiago Takeshi.

Agradecimento especial à Letícia Tessarolli pelos tantos e tantos anos de amizade, pelas trocas de idéias, principalmente as mais malucas, e pela amizade. A Inessa Bagatini, por as vezes sem nem precisar falar nada, já fazia novas idéias surgirem. E ao Rodrigo Mello, por acreditar nessas idéias.

Ao pessoal da secretaria do PPGERN: João, Roseli e Beth, pela resolução dos infundáveis problemas que levei até eles.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento e bolsa de doutorado concedida durante o período.

À UFSCar e ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais pela infraestrutura fornecida e pela formação acadêmica que permitiram a realização deste trabalho.

A todos os meus amigos de São Carlos pela diversão e pelos momentos de descontração: Rafael Kiyoto, Jéssica Gallo, Lais Romanholli, Danilo Dezidera e Patrícia Bacher.

Aos meus amigos espalhados pelo mundo!!!

A minha família que torce sem entender o como torcer!

A Cecy Levicovitz, pelo amor, pela paciência, pela alegria, pela felicidade, pelo estímulo, pela confiança e por acreditar em mim.

A minha mãe, Leonídia, por me auxiliar no caminho, pelo apoio, amor, carinho, fundamentais para a realização do trabalho. Sem você esse trabalho não seria realizado.

Enfim, a todos os colegas, professores, amigos e familiares que ao longo de toda a minha jornada contribuíram direta e indiretamente para a realização de mais essa etapa.

RESUMO

Os polissacarídeos extracelulares (EPS) produzidos por microalgas têm sido estudados principalmente por sua relevância para ambientes aquáticos (Myklestad 1995). Como a composição monomérica dos EPS apresentam-se como heteropolímeros, frequentemente compostos por uma diversidade de monômeros e que a diversidade do EPS entre as algas é enorme e que em organismos taxonomicamente muito próximos esses compostos apresentam-se ligeiramente diferentes, fez com que acreditássemos na sua utilidade para a quimiotaxonomia de microalgas.

A utilização do EPS para este fim, foi devida a facilidade em se extraírem os polissacarídeos das culturas, facilidade em analisa-los, aliadas a especificidade que eles apresentam e por serem constituídos por uma ou duas frações.

O objetivo geral do trabalho foi verificar a possibilidade da utilização dos EPS como características para uma possível abordagem quimiotaxonômica. Dessa forma a caracterização dos polissacarídeos das algas foi imprescindível para um melhor entendimento das diferenças e similaridades encontradas para os EPS. De fato, foram encontradas relevâncias e diferenças entre os polissacarídeos constituintes do mesmo gênero. O gênero *Monoraphidium* encontrou forte associação entre suas espécies e com a espécie *Raphidocelis subcapitata*, isso se deve principalmente a presença de ácido glicurônico comum entre eles. Apesar da fraca agregação do gênero *Kirchneriella*, esse grupo apresentou uma característica interessante, somente ele apresentou 1-3 ramnose em sua composição, assim como 1-6 manose e 1-2,3 manose foram monômeros exclusivos do gênero *Chlorolobium*.

Assim, ao longo dos capítulos nos debruçaremos na caracterização de grupos específicos os quais apresentavam maiores representantes entre os gêneros selecionados. Esses gêneros foram:

Resumo

1) *Ankistrodesmus*; 2) complexo *Selenastrum/Messastrum/Curvastrum*; 3) *Monoraphidium*; e 4) *Kirchneriella*.

A observação de monômeros/ligações específicas dentro dos gêneros, devido a caracterização dos EPS, nos mostrou que existe uma provável diferenciação possível entre cepas/espécies e até ao nível de gênero.

ABSTRACT

The extracellular polysaccharide (EPS) produced by microalgae have mainly been studied because of their relevance to aquatic environments (Myklestad 1995).

As the monomer composition of the EPS is presented as heteropolymers often composed of a diversity of monomers and that the diversity of EPS between algae is huge and taxonomically close organisms each other have compounds slightly different, made us believe in their use for chemotaxonomy of microalgae.

The use of EPS for this purpose, was due to the ease of extracting them from cultures, their facility to be analyzed, together with their specificity and their constitution by only one or two fractions.

This study goal was to verify the possibility of using EPS as features for a possible chemotaxonomic approach. Thus the characterization of algae polysaccharides was essential for a better understanding of the differences and similarities found in the EPS.

Thus, throughout the chapters we will look at the characterization of specific groups which had most representatives for the selected genres. These genera were: 1) Ankistrodesmus; 2) complex Selenastrum / Messastrum / Curvastrum; 3) Monoraphidium; and 4) Kirchneriella.

The observation of monomers / specific bond within the genera, due to the characterization of EPS, showed us that there are possible differentiation between strains / species and at the genus level.

LISTA DE ABREVIACÕES

EPS – Polissacarídeos extracelulares

TEP – Partículas de exopolímeros transparentes

DOM – Matéria orgânica dissolvida

TMS – Trimetilsilil

FID – Detector por ionização por chama

GC-MS – Cromatografia gasosa por espectro de massa

GC-FID – Cromatografia gasosa com detector por ionização de chama

FT-IR – Infravermelho por transformada de Fourier

Glucacid – Ácido glicurônico

Galacid – Ácido galacturônico

Glcnac – N-acetil-glicosamina

Glanac – N-acetil galactosamina

Esp – Especificidade

Fid – Fidelidade

LISTA DE ABREVIACOES

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Fluxograma apresentando os processos envolvidos na obtenção do EPS das sete cepas/espécies de <i>Ankistrodesmus</i> estudadas	9
Figura 1.2. Fluxograma apresentando os processos envolvidos na caracterização do EPS das sete cepas/espécies de <i>Ankistrodesmus</i> estudadas	11
Figura 1.3. Espectros de infravermelho (FT-IR) dos polissacarídeos extracelulares para as diferentes cepas/espécies de <i>Ankistrodesmus</i>	23
Figura 1.4. <i>Heatmap</i> de similaridade entre as cepas/espécies de <i>Ankistrodesmus</i> utilizando as ligações glicosídicas (vermelho = maior similaridade; verde = menor similaridade)	26
Figura 1.5. <i>Heatmap</i> de similaridade entre as cepas/espécies de <i>Ankistrodesmus</i> utilizando as ligações glicosídicas (vermelho = maior similaridade; verde = menor similaridade)	27
Figura 2.1. Espectros de infravermelho (FT-IR) dos polissacarídeos extracelulares para as diferentes cepas/espécies de <i>Selenastrum/Messastrum/Curvastrum</i>	41
Figura 2.2. <i>Heatmap</i> de similaridade entre as cepas/espécies de <i>Selenastrum, Messastrum e Curvastrum</i> utilizando os monômeros constituintes (vermelho = maior similaridade; verde = menor similaridade)	44
Figura 2.3. <i>Heatmap</i> de similaridade entre as cepas/espécies de <i>Selenastrum, Messastrum e Curvastrum</i> utilizando as ligações glicosídicas (vermelho = maior similaridade; verde = menor similaridade)	45
Figura 3.1. Espectros de infravermelho (FT-IR) dos polissacarídeos extracelulares para as diferentes espécies de <i>Monoraphidium</i>	60
Figura 3.2 <i>Heatmap</i> de similaridade entre as espécies de <i>Monoraphidium</i> utilizando os monômeros constituintes (vermelho = maior similaridade; verde = menor similaridade)	62
Figura 3.3. <i>Heatmap</i> de similaridade entre as espécies de <i>Monoraphidium</i> utilizando as ligações glicosídicas (vermelho = maior similaridade; verde = menor similaridade)	63
Figura 4.1 Espectros de infravermelho (FT-IR) dos polissacarídeos extracelulares para as diferentes cepas/espécies de <i>Kirchneriella</i>	79
Figura 4.2. <i>Heatmap</i> de similaridade entre as cepas/espécies de <i>Kirchneriella</i> utilizando os monômeros constituintes (vermelho = maior similaridade; verde = menor similaridade)	83
Figura 4.3. <i>Heatmap</i> de similaridade entre as cepas/espécies de <i>Kirchneriella</i> utilizando as ligações glicosídicas (vermelho = maior similaridade; verde = menor similaridade)	84
Figura 5.1. Dendrograma obtido utilizando-se somente a composição monomérica	95

LISTA DE FIGURAS

Figura 5.2. Dendrograma obtido utilizando-se as ligações glicosídicas entre os monossacarídeos componentes de cada EPS	97
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1. Cepas/Espécies de <i>Ankistrodesmus</i> utilizadas no trabalho.....	8
Tabela 1.2. Composição monomérica expressa em porcentagem (%) do carboidrato total dos polissacarídeos extracelulares para as diferentes espécies estudadas. GLUCAACID = Ácido glucurônico; GALACID = Ácido Galacturônico; GLCNAC = n-acetil-glicosamina; GLANAC = n-acetil-galactosamina	15
Tabela 1.3. Ligações Glicosídicas encontradas para o gênero <i>Ankistrodesmus</i> . (% M = mesmo monossacarídeo e % T = total presente) (T – porção terminal no EPS)	18
Tabela 2.1. Cepas/Espécies de <i>Selenastrum/Messastrum/Curvastrum</i> utilizadas no trabalho.....	32
Tabela 2.2. Composição monomérica expressa em porcentagem (%) do carboidrato total dos polissacarídeos extracelulares para as diferentes espécies estudadas. GLUCAACID = Ácido glucurônico; GALACID = Ácido Galacturônico; GLCNAC = n-acetil-glicosamina; GLANAC = n-acetil-galactosamina	34
Tabela 2.3. Ligações Glicosídicas encontradas para os gêneros <i>Selenastrum, Curvastrum</i> e <i>Messastrum</i> (% M = mesmo monossacarídeo e % T = total presente) (T – porção terminal no EPS)	36
Tabela 3.1. Espécies de <i>Monoraphidium</i> utilizadas no trabalho	51
Tabela 3.2. Composição monomérica expressa em porcentagem (%) do carboidrato total dos polissacarídeos extracelulares para as diferentes espécies de <i>Monoraphidium</i> . GLUCAACID = Ácido glucurônico; GALACID = Ácido Galacturônico; GLCNAC = n-acetil-glicosamina; GLANAC = n-acetil-galactosamina	53
Tabela 3.3. Ligações Glicosídicas encontradas para o gênero <i>Monoraphidium</i> (% M = mesmo monossacarídeo e % T = total presente) (T= posição terminal no EPS)	56
Tabela 4.1. Espécies e cepas de <i>Kirchneriella</i> utilizadas no trabalho.....	68
Tabela 4.2. Composição monomérica expressa em porcentagem (%) do carboidrato total dos polissacarídeos extracelulares para as diferentes espécies estudadas. GLUCAACID = Ácido glucurônico; GALACID = Ácido Galacturônico; GLCNAC = n-acetil-glicosamina; GLANAC = n-acetil-galactosamina	70
Tabela 4.3. Ligações Glicosídicas encontradas para o gênero <i>Kirchneriella</i> (% M = mesmo monossacarídeo e % T = total presente) (T - posição terminal no EPS)	72
Tabela 5.1. Lista de Espécies utilizadas, seu respectivo código na coleção de culturas e local de origem	91
Tabela 5.2. Composição monomérica expressa em porcentagem (%) do carboidrato total dos polissacarídeos extracelulares para as diferentes espécies estudadas. GLUCAACID = Ácido glucurônico; GALACID = Ácido Galacturônico; GLCNAC = n-acetil-glicosamina; GLANAC = n-acetil-galactosamina	94

LISTA DE FIGURAS

Tabela 5.3. Monômeros indicadores para cada umas das 9 espécies onde ocorrem. Os valores especificidade (ESP) mostram se o monômero pode pertencer ao gênero. Fidelidade (FID), é a probabilidade de os gêneros serem encontrados nos monômeros.....96

Tabela 5.4. Ligações Glicosídicas indicadores para cada um dos 9 gêneros. Os valores especificidade mostra se o monômero pode pertencer ao gênero e fidelidade é a probabilidade de os gêneros serem encontrados nos monômeros. (Esp = Especificidade/ Fid = Fidelidade)99

APRESENTAÇÃO DA TESE

A Tese será apresentada da seguinte forma:

- 1) Introdução
- 2) Hipóteses e Objetivos
- 3) Capítulos
- 4) Conclusão final

Cada capítulo será apresentado com: Objetivo, material e método, resultados, discussão e conclusão. O formato foi escolhido para mostrar uma maior fluidez entre os resultados iniciais e o fechamento da tese.

Os quatro primeiros capítulos abordam mais especificamente a composição dos polissacarídeos, direcionando a tese para a abordagem final do trabalho tentando utilizar os polissacarídeos como uma ferramenta de abordagem quimiotaxonômica.

O Capítulo 1 aborda cepas/espécies do gênero *Anksitrodesmus*, esse gênero foi escolhido devido a escassa informação sobre a composição polissacarídica desse grupo, bem como apresentar incongruências filogenéticas.

O foco do capítulo 2 é sobre os polissacarídeos extracelulares do “complexo” *Selenastrum/Messastrum/Curvastrum*, novamente como no capítulo 1, pouca informação sobre os representantes desses grupos foi encontrada na literatura. A biologia molecular obtida para esse grupo (anteriormente pertencente ao gênero *Selenastrum*) mostrou que os mesmos morfotipos apresentavam genótipos diferentes e, portanto, é interessante avaliar se a fragmentação desse gênero apresenta suporte na quimiotaxonomia utilizando-se o EPS.

No capítulo 3 caracterizamos os polissacarídeos extracelulares de diferentes espécies de *Monoraphidium*, visto que, esse grupo, por ser considerado polifilético, deve receber uma maior

APRESENTAÇÃO DA TESE

atenção, observando-se há a possibilidade de discriminação das diferentes espécies através dos seus EPS.

O Capítulo 4 engloba os representantes do gênero *Kirchineriella*, os quais estão recebendo uma maior atenção devido à baixa similaridade obtida utilizando dados genéticos desse grupo. Portanto além de descrever o polissacarídeo de algumas cepas/espécies desse gênero, tentamos abordar um início de uma descrição quimiotaxonômica.

Finalmente, o Capítulo 5 irá englobar o uso de polissacarídeos extracelulares na quimiotaxonomia da família Selenastraceae, englobando as cepas/espécies utilizadas no capítulo de 1 a 4, bem como algumas outras espécies que não tiveram os polissacarídeos descritos nessa tese.

As algas foram escolhidas devido à sua grande plasticidade fenotípica, convergência morfológica e, também, devido ao seu reduzido tamanho. Esses fatores dificultam a taxonomia utilizando-se apenas a morfologia e, deste modo, novas abordagens devem ser sugeridas para facilitar a classificação. Para a utilização dessa abordagem a caracterização dos polissacarídeos foram feitas utilizando-se os principais gêneros da família e dentro dos gêneros, as principais espécies.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	1
------------------	---

HIPÓTESES E OBJETIVOS	6
-----------------------------	---

CAPÍTULO 1. COMPOSIÇÃO DO POLISSACARÍDEO EXTRACELULAR PRODUZIDO POR DIFERENTES ESPÉCIES DE <i>ANKISTRODESMUS</i> , E DIFERENTES CEPAS, DE <i>ANKISTRODESMUS DENSUS</i> (SELENASTRACEAE, CHLOROPHYTA	7
---	---

1.1 Objetivo	7
1.2 Materiais e Métodos	7
Organismos	7
Condições de Cultivo	8
Obtenção do EPS	8
Caracterização do EPS	9
Composição Monomérica	11
Ligações Glicosídicas	12
Análise dos polissacarídeos por espectrometria de infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR)	13
1.3 Resultados	13
Composição Monomérica	13
Análise das ligações glicosídicas	16
Análise estrutural por FT-IR	22
Similaridade entre os polissacarídeos de <i>Ankistrodesmus</i>	26
1.4 Discussão	27
1.5 Conclusão	30

CAPÍTULO 2. COMPOSIÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS EXTRACELULARES PRODUZIDOS POR QUATRO CEPAS DE <i>SELENASTRUM BIBRAIANUM</i> E PELAS ESPÉCIES <i>MESSASTRUM GRACILE</i> E <i>CURVASTRUM PANTANALE</i> (SELENASTRACEAE, CHLOROPHYTA)	31
---	----

2.1 Objetivo	31
2.2 Materiais e Métodos	31
Organismos	31
2.3 Resultados	32
Composição monomérica	32
Análise das ligações glicosídicas	35
Análise estrutural por FT-IR	40
Similaridade entre os polissacarídeos de <i>Selenastrum</i> , <i>Messastrum</i> e <i>Curvastrum</i>	44
2.4 Discussão	45
2.5 Conclusão	49

APRESENTAÇÃO DA TESE

CAPÍTULO 3. COMPOSIÇÃO DO POLISSACARÍDEO EXTRACELULAR PRODUZIDO POR DIFERENTES ESPÉCIES DE *MONORAPHIDIUM* (SELENASTRACEAE, CHLOROPHYTA)50

3.1 Objetivo	50
3.2 Materiais e Métodos	50
Organismos	50
3.3 Resultados	51
Composição monomérica	52
Análise das ligações glicosídicas	54
Análise estrutural por FT-IR	59
Similaridade entre os polissacarídeos de <i>Monoraphidium</i>	62
3.4 Discussão	63
3.5 Conclusão	66

CAPÍTULO 4. QUIMIOTAXONOMIA: INTRODUÇÃO AO ESTUDO QUIMIOTAXONÔMICO UTILIZANDO A DIVERSIDADE DOS POLISSACARÍDEOS EXTRACELULARES PRODUZIDOS POR DIFERENTES ESPÉCIES DE *KIRCHNERIELLA* (SELENASTRACEAE, CHLOROPHYTA)67

4.1 Objetivo	67
4.2 Materiais e Métodos	67
Organismos	67
4.3 Resultados	68
Composição monomérica	68
Análise das ligações glicosídicas	71
Análise estrutural por FT-IR	77
Similaridade entre os polissacarídeos de <i>Kirchneriella</i>	82
4.4 Discussão	84
4.5 Conclusão	88

CAPÍTULO 5. ABORDAGEM QUIMIOTAXONÔMICA UTILIZANDO POLISSACARÍDEOS EXTRACELULARES NA DIFERENCIAÇÃO DE MICROALGAS DA FAMÍLIA SELENASTRACEAE (CHLOROPHYCEAE, CHLOROPHYTA)90

5.1 Resumo	90
5.2 Objetivo	90
5.3 Materiais e Métodos	91
Organismos	91
Aquisição dos dendrogramas para as espécies selecionadas	92
5.4 Resultados	93
Dendrograma obtido somente com os monômeros dos EPS	95
Dendrograma utilizando as ligações glicosídicas entre os monossacarídeos	96
5.5 Discussão	103
5.6 Conclusão	107

SUMÁRIO

Conclusões Finais	108
Referência Bibliográfica	109

Diversidade e possíveis aplicações quimiotaxonômicas dos polissacarídeos extracelulares de microalgas verdes cocoides

Introdução

Os polissacarídeos extracelulares (EPS) das microalgas são produzidos no complexo de golgi e através da membrana citoplasmática são liberados para o meio ou depositados na parede celular. Nas células, formam cápsulas ou bainhas mucilaginosas com larguras variáveis, desde várias vezes o diâmetro da célula até um fino filme visualizado somente com corantes específicos (Vieira et al 2008). Podem, também, ser liberados dissolvidos ou em colóides para o meio circundante (Paulsen et a. 1992) ou em pequenas partículas oriundas da fragmentação das cápsulas e bainhas (Bittar & Vieira 2010).

EPSs produzidos por microalgas têm sido estudados principalmente por sua relevância para ambientes aquáticos (Myklestad 1995). Sob esse prisma, são estudados aspectos como complexação de metais e seu transporte para os sedimentos (Lombardi & Vieira, 1998), formação de agregados gelatinosos e TEP (transparent exopolymer particules) (Alldredge & Gotschalk 1989; Vieira et al. 2008; Bittar & Vieira 2010;), e seus efeitos na funcionalidade da biodiversidade aquática (Wood & Van Valen 1990; Colombo et al 2004; Vieira et al. 2008; Moreira et al. 2011), entre outros. Cápsulas e bainhas ou “filmes” mucilaginosos envolvendo as células fazem com que imediatamente sejam deduzidas funcionalidades direcionadas à célula, o que vem sendo confirmado em vários trabalhos. Há várias funcionalidades conhecidas ou putativas para as coberturas celulares mucilaginosas. Elas agem na fixação de microalgas epífitas em substratos (Hoagland et al. 1993), na retenção de exoenzimas e sequestro de nutrientes (Flemming & Wingender 2010) e na proteção de gametas na fecundação externa. As coberturas celulares e a ficosfera formada por polissacarídeos coloidais livres podem proteger a célula de altas

concentrações de metais tóxicos (Lombardi et al. 2002) e as cápsulas podem regular o transporte de compostos orgânicos através da parede celular (Vieira & Nascimento 1989; Freire-Nordi et al. 1998).

Ultimamente, tem-se considerado os EPSs com foco em outras aplicações que não as relacionadas com a ecologia e fisiologia das microalgas. A composição monomérica dos EPS de microalgas mostra que estes compostos são heteropolímeros, frequentemente maiores do que $2 \cdot 10^6$ Da, ácidos devido à presença de ácidos urônicos, sulfatados ou não e ligados a quantidades variáveis (0 a ~ 20%) de proteína, dependendo do grupo taxonômico. Frequentemente são compostos por mais de seis monossacarídeos entre arabinose, fucose, galactose, manose, ramnose, glicose, ácidos galacturônico e glicurônico, açúcares acetil-aminados e outros derivados destes (Allard & Casadevall 1990; Metzger *et al* 1990). A constatação de que a diversidade de EPS entre as algas é enorme, bem como que em organismos taxonomicamente muito próximos, tais compostos apresentam ou composição ligeiramente diferente, ou os mesmos açúcares ocorram em diferentes proporções, nos levou a ponderar sobre sua utilização na quimiotaxonomia de microalgas. Por exemplo, embora o trabalho de Haug & Myklestad (1976) não visasse a quimiotaxonomia (comunicação pessoal de S. Myklestad), seus dados de análise de EPS (coletados dos meios de cultura) de três espécies do gênero *Chaetoceros*, (Bacillariophyceae, diatomácea marinha) mostraram plausibilidade do uso da diversidade dos EPS na quimiotaxonomia. Os monossacarídeos do EPS das três espécies (*Chaetoceros debilis*, *Chaetoceros decipiens* e *Chaetoceros socialis*) são os mesmos, mas ocorrem em proporções diferentes. Vários estudos voltaram sua atenção para a composição polissacarídica da parede celular das algas verdes (Kloareg & Quatrano, 1988; Takeda, 1991) ou para polissacarídeos extracelular de algas marinhas, os quais apresentam quantidades variáveis de sulfato (Wijesekara *et al.* 2011), ou para algas não

relacionadas à família Selenastraceae (Oertel *et al.*, 2004; Crayto 1980). Entretanto, esses estudos não visaram o emprego destes na quimiotaxonomia de algas. A utilização de polissacarídeos na quimiotaxonomia para organismos já é empregada como, por exemplo, para bactérias (Gargiulo *et al.* 2008), líquens (Carbonero *et al.* 2002), fungos (Ahrazem *et al.* 2002) e até mesmo plantas vasculares (Wagner *et al.* 2008). Em algas, os estudos que utilizam polissacarídeos como característica diacrítica na taxonomia são referentes a espécies de macroalgas marinhas e, ainda, os polissacarídeos não são aqueles liberados para o meio nem formadores de envoltórios celulares, mas sim componentes das paredes celulares. É o caso de trabalhos com as espécies dos gêneros *Gigartina*, *Gracilaria*, *Grateloupia*, *Kappaphycus* e outros, todos da Divisão Rhodophyta, em que foram usados polissacarídeos extraídos por processos químicos (Chiovitti *et al.* 1996; Villanueva & Montaña 2003; Miller & Blunt 2005; Miller 2005; Miller & Mollion 2006; Falshaw *et al.* 2009)

Em uma espécie de alga de água doce (*Pseudodichotomosiphon constrictis*), os polissacarídeos constituintes da parede celular foram característica decisiva para se concluir que o organismo não era uma Chlorophyta (Classe Bryopsidophyceae), e sim uma Heterokontophyta (Classe Xanthophyceae) (Fukushi-Fujikura *et al.* 1991). Contudo, são poucos os trabalhos que utilizaram polissacarídeos na quimiotaxonomia de microalgas. Na quimiotaxonomia do gênero *Chlorella* (Takeda 1991), foram usados polissacarídeos constituintes de paredes celulares (não EPS), e em microalgas marinhas (Eustigmatophyceae) os monossacarídeos totais foram utilizados juntamente com lipídeos e proteínas (Volkman *et al.* 1991). Não encontramos relatos de polissacarídeos extracelulares (EPS) usados em quimiotaxonomia.

A taxonomicamente problemática família Selenastraceae (Sphaeropleales, Chlorophyceae, Chlorophyta) tem diversidade ao nível específico muito maior do que a conhecida. Fawley *et al.* (2005) citam que, de fato, devem existir centenas de *taxa* na família Selenastraceae, mas apenas

poucas dezenas são conhecidas, ainda que seja um grupo com distribuição cosmopolita. Isto se deve ao fato das características morfológicas usadas na taxonomia tradicional, como forma da célula, grau de curvatura, forma das colônias etc, não serem suficientes para definir linhagens ao nível específico. A título de exemplo, existe pouca variação morfológica entre organismos classificados como espécies de *Ankistrodesmus*, incluindo *A. fusiformis*, e *A. stipitatus*, e outros classificados como espécies do gênero *Monoraphidium*. Outro exemplo é *M. saxatile*, que é frequentemente classificado como *Ankistrodesmus falcatus*, e *Ankistrodesmus gracile* como *Selenastrum westii*.

O objetivo principal do presente trabalho foi caracterizar os polissacarídeos extracelulares (EPS) de várias espécies com sua taxonomia putativamente resolvida por métodos moleculares para que pudessem ser utilizados como característica diacrítica na identificação de espécies relacionadas a família *Selenastraceae*.

A pouca atenção dada ao polissacarídeo extracelular (EPS) não só da família *Selenastraceae*, mas de toda ordem *Sphaeropleales*, torna importante a análise desses compostos, não só dentro de uma abordagem quimiotaxonômica, mas também para adquirirmos maiores entendimentos da dinâmica desses polissacarídeos junto ao ambiente.

Extrações químicas de polissacarídeos componentes das paredes celulares (não EPS) rendem diferenças maiores de composição, incluindo a ocorrência de diferentes monossacarídeos (Percival, 1979). Entretanto, as extrações químicas, frequentemente contaminam os polissacarídeos extraídos com material intracelular e não é raro encontrarmos ribose e altas taxas de glicose entre os polímeros extraídos. Frequentemente, há a necessidade de se utilizar vários processos de extração e purificação desses carboidratos. Problemas com contaminações e processos de extração/purificação são relativamente simples de serem resolvidos, se o objetivo for

comparar duas ou três espécies, mas impraticável para um grande número de espécies. Por esse motivo, utilizamos apenas os EPS liberados no meio de cultura por serem, putativamente, mais específicos, definidos e mais fáceis de extrair e analisar e, geralmente, são constituídos por somente uma ou duas frações independentes (Paulsen et al.1998; Giroldo et al. 2005). Isto não significa, no entanto, que essa abordagem fique livre de problemas analíticos e interpretações. Por exemplo, sabe-se que várias espécies analisadas podem liberar mais do que um tipo de EPS (Paulsen et al. 1992, 1994), ou que o EPS liberado por determinada espécie pode ter sua composição variada ligeiramente com a idade da célula (Giroldo et al. 2003; Vieira et al. 2008). Porém, essas variações também podem ser consideradas como caracteres diacríticos na quimiotaxonomia das espécies.

HIPÓTESES E OBJETIVOS

Hipóteses:

- 1) Utilização do EPS pode ser utilizada com base na sua composição monomérica e nas proporções dos seus monossarídeos. E pode ser utilizada como característica diacrítica na classificação de algas que apresentem morfologia muito semelhante.
- 2) Devido a características específicas dos polissacarídeos poderíamos determinar marcadores específicos para diferentes espécies/gêneros e provavelmente em *taxa* muito mais elevados.

Objetivos:

Utilizando as técnicas de CG-FID, CG-MS e FT-IR, pretendeu-se:

- a) Caracterizar os EPS da família alvo, através da composição monomérica, ligações glicosídicas, análise de estrutura e análise de radicais por infravermelho.
- b) Observar as possíveis relações que os EPS das cepas/espécies poderiam ter como marcadores para distinção entre os gêneros.
- c) Analisar as relações entre os diferentes gêneros, obtendo, se possível, características específicas que possam ser utilizadas para sua diferenciação.

CAPÍTULO 1. COMPOSIÇÃO DO POLISSACARÍDEO EXTRACELULAR PRODUZIDO POR DIFERENTES
ESPÉCIES DE *ANKISTRODESMUS* E DIFERENTES CEPAS DE *ANKISTRODESMUS DENSUS*
(SELENASTRACEAE, CHLOROPHYTA)

1.1 Objetivo

O objetivo desse trabalho foi descrever a diversidade da composição química, ligações, radicais e as estruturas constituintes dos polissacarídeos extracelulares de algas do gênero *Ankistrodesmus* e ponderar se tal diversidade poderia ser utilizada na discriminação entre espécies/cepas do gênero *Ankistrodesmus*, família Selenastraceae (Sphaeropleales, Chlorophyceae), espécies essas com morfologia muito semelhante.

1.2 Materiais e Métodos

Organismos. Foram analisados os EPS de 5 espécies/strains (7 cepas) do gênero *Ankistrodesmus*. Os organismos utilizados neste trabalho (Tabela 1.1) foram isolados de diferentes lugares do Brasil e estão sendo mantidos em cultivo axênico na coleção de Culturas de Microalgas de Água Doce do Departamento de Botânica da Universidade Federal de São Carlos (WDCM 835) com os códigos indicados para cada alga.

Tabela 1.1. Espécies de *Ankistrodesmus* utilizadas no trabalho

Espécie	Descrição	Cepa	Local de Isolamento	Ano	GPS
		003	Itirapina - SP	1979	22°12'20.6"S 47°52'37.6"W
<i>Ankistrodesmus densus</i>	Korshikov 1953	128	Foz Do Iguaçu - PR	2009	25°23'56.1"S 54°35'26.2"W
		239	Matão - SP	2010	21°38'31.0"S 48°19'56.8"W
<i>Ankistrodesmus flexuosus</i>	(Komárek) Ergashev	083	Foz do Iguaçu - PR	2009	25°23'56.1"S 54°35'26.2"W
<i>Ankistrodesmus stipitatus</i>	(Chodat) Komárková-Legnerová 1969	278	São João Batista do Glória - MG	2011	20°32'01.0"S 46°31'32.9"W
<i>Ankistrodesmus fusiformis</i>	Corde ex Korshikov 1953	333	Porto Velho - RO	2011	8°35'17.9"S 63°37'12.3"W
<i>Ankistrodesmus bernardii</i>	Komárek 1983	423	Dourado-SP	2012	22°09'57.8"S 48°17'25.0"W

Condições de cultivo. Os cultivos foram feitos em meio WC (Guillard & Lorenzen 1972) com pH 7,0 e adição de Tris, a $23 \pm 1^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12:12 horas, com intensidade luminosa de $200 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, sob agitação constante com ar comprimido filtrado ($1 \text{ mL} \times \text{min}^{-1} \times 20\text{L}^{-1}$). As taxas de crescimento foram medidas através de quantificação de clorofila-a, segundo Nush (1980) e contagem do número de células segundo Griffiths et al (2011), e a quantificação de carboidratos extracelulares nos meios de cultura, pelo método de Dubois et al. (1956). Após 25 dias de crescimento as culturas foram coletadas seguindo o método abaixo.

Obtenção do EPS. Os EPS liberados nos meios de cultivos em garrações de 20L, seguindo as mesmas condições de cultivo apresentado para as curvas de crescimento, foram coletados na fase estacionária do crescimento. Após retirada das células por filtração tangencial (cartucho de fibra oca Xampler™ CEP-6-D-4-A, com poros de $0,65 \mu\text{m}$, em plataforma QixStand™ Benchtop System (GE), os meios de cultura mais os excretados foram novamente filtrados e lavados com água deionizada em cartuchos de fibra oca (Xampler™ CEP-30-E-4-A) com poros de 30 kDa .

As células retiradas na primeira filtração foram lavadas com tampão WC (meio WC sem nitrogênio, fósforo e vitaminas) a 38°C para retirada de EPS preso às paredes celulares e o tampão com o EPS extraído foi adicionado aos meios já filtrados tangencialmente. A fração dissolvida com o EPS extraído das paredes celulares foram concentradas até cerca de 200 mL, com filtração tangencial utilizando-se os cartuchos de fibra oca com poros de 30 kDa; o polissacarídeo retido foi congelado com nitrogênio líquido, liofilizado e, posteriormente, armazenado hermeticamente a -5° C. A Figura 1.2 resume os procedimentos utilizados para a obtenção do EPS das espécies de *Ankistrodesmus* (e outras utilizadas em outros experimentos deste trabalho).

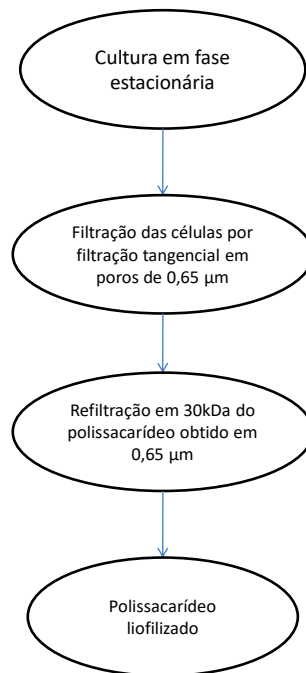


Figura 1.1. Fluxograma apresentando os processos envolvidos na obtenção do EPS das sete espécies fitoplanctônicas estudadas.

Caracterização do EPS. A proteína associada ao EPS foi quantificada pelo método de Lowry et al. (1951). Através de cromatografia por exclusão de massa foi possível a identificação das frações com diferentes massas moleculares. Para esse fim, foi montada uma coluna com 370

mL de volume, preenchida com gel Sephadex CL6B (Pharmacia®), com faixa de exclusão entre 1×10^4 e 1×10^6 D, acoplada a um aparelho Äkta Prime Pharmacia/GE equipado com coletor de frações e ajustado a um fluxo de 2 mLmin^{-1} . As amostras de EPS foram diluídas em água deionizada (1 mg / 1 mL), injetadas na coluna (5 mL) e coletadas em frações de 5 mL no coletor do aparelho. Os carboidratos nas diversas frações coletadas foram detectados pelo método de Dubois *et al.* (1956).

A ocorrência de frações ácidas e/ou neutras foi verificada por cromatografia de troca iônica, em uma coluna com 175 mL de volume, preenchida com gel Sepharose Dietilaminoetil (DEAE) fast flow *chloride form*, acoplada ao aparelho Äkta Prime Pharmacia/GE equipado com coletor de frações e ajustado a um fluxo de 1 mL / min^{-1} . As amostras foram diluídas em água deionizada (1 mg / 1 mL) e foi injetado um volume de 5 mL . A água deionizada foi gradualmente sendo substituída por uma solução de $\text{NaCl } 2 \text{ M}$, dessa forma, o gradiente salino é a mistura fracionada de NaCl durante a passagem desse eluente pela coluna de cromatografia. O gradiente salino, na cromatografia de troca iônica, foi utilizado para evidenciar se o polissacarídeo apresentaria frações ácidas e frações neutras. A Figura 1.2 resume os processos utilizados para a caracterização do polissacarídeo das espécies fitoplanctônicas em estudo.



Figura 1.2. Processos envolvidos na caracterização do EPS das sete espécies/cepas de *Ankistrodesmus*.

Composição monomérica. Os monossacarídeos componentes dos EPS foram identificados e quantificados por cromatografia de gás como trimetilsilil-derivados de metil-glicosídeos obtidos por metanólise usando 4M HCl em metanol anidro a 80°C por 24 h (Reinhold, 1972; Barsett *et al*, 1992) e será apresentada em resumo: em *vials* de 4,0 mL com tampa de rosca forrada com septo de teflon, amostras com 1mg \pm 0,2 de polissacarídeo em pó, às quais foi adicionado manitol como padrão interno (1,02 mg dissolvido em 4M HCl/metanol) e, em seguida, foi metanolizado com 4M HCl/Metanol anidro. Os *vials* com as amostras foram colocados em estufa a 80°C por 24 h para a quebra das ligações glicosídicas e concomitante geração de metil-glicosídeos que, em seguida, foram tratados com 0,5 mL/200 μ l de manitol da solução “TMS”: Piridina: Trimetilclorosilano: Hexametildisilano (5,0:1,0:2,0) para a formação de O-trimetilsilil derivados (Reinhold, 1972). Os O-trimetilsilil derivados foram identificados por cromatografia de gás (HP 5980 série II) equipado com colunas DB-5 (J e W Scientific) de sílica com 30m e 0,32mm de

diâmetro interno. Como as substâncias são excluídas em tempos diferentes dependendo das propriedades físicas da molécula, este tipo de cromatografia pode separar os gases ou as substâncias volatilizáveis através da coluna de sílica e o uso de um detector adequado (FID - *Flame Ionization Detector*) na saída da coluna, possibilitando a detecção e a quantificação dessas substâncias. Hélio foi usado como gás carreador a uma taxa de 5.0 ml/min. O-trimetilsilil derivados foram analisados utilizando-se as seguintes condições: temperatura no injetor a 250°C, detector 260°C, coluna 140°C quando injetado, seguido de um acréscimo de 5°C/min até 250°C e mantido a 300° por 5 min.

Ligações Glicosídicas. Para determinar as ligações glicosídicas entre os monossacarídeos nos EPS foi feita a metilação dos polímeros segundo Kim & Carpita (1992) seguido de análise por cromatografia gasosa - acoplada com espectrometria de massa - dos acetatos de alditois parcialmente metilados (Barsett & Paulsen, 1992), o método envolve a metilação dos grupos hidroxil presente nos polissacarídeos, hidrólise, redução do carbono 1 e acetilação dos alditois parcialmente metilados. Os derivativos foram analisados em GC-MS usando um GCMS-QP2010 (Shimadzu) com uma coluna Restek Rxi-5MS (30 m; 0.25 mm i.d.; 0.25 µm film) acoplada ao aparelho. A temperatura do injetor foi de 280 ° C, a temperatura da fonte de 200 ° C e a temperatura de interface de 300 ° C. A temperatura da coluna foi de 80 ° C, quando injetada e, em seguida, aumentada em 10 ° C / min até 140 ° C, seguido de 4 ° C / min até 210 ° C e, em seguida, 20 ° C / min até 300 ° C. Hélio foi o gás de arraste (controle de pressão: 80 kPa). O composto foi caracterizado pela interpretação do tempo de retenção dos picos obtidos e através do espectro de massa característico. A estimativa das quantidades relativas de cada tipo de ligação foi correlacionada com a quantidade de cada tipo de monossacarídeo, tal como foi determinado por metanólise.

Análise dos polissacarídeos por espectrometria de infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR). A análise do EPS foi obtida utilizando-se o aparelho de infravermelho Thermo Scientific modelo Nicolet iS5 para detectar os grupos funcionais. Um miligrama (1mg) do polissacarídeo foi transformado em pastilha para a medição no FT-IR na frequência de 4000-400cm⁻¹.

1.3 Resultados

Composição monomérica.

Os EPS de *Ankistrodesmus densus* (003) e *A. densus* (128) apresentam um complexo de monossacarídeos composto principalmente por fucose, galactose e manose (Tabela 1.2); praticamente as mesmas quantidades de xylose, ramnose e glucose; e pequenas quantidades de ácido glicurônico, n-acetil galactosamina e traço de n-acetil glucosamina. Já o EPS de *A. densus* (239) apesar de pertencer à mesma espécie, apresentou um polissacarídeo ligeiramente diferente, apresentando como monossacarídeos principais manose, fucose e glucose; mesmas quantidades de galactose, ácido glicurônico e xylose; menores quantidades de xylose, n-acetil-galactosamina e arabinose, não se observando n-acetil glucosamina (Tabela 1.2).

Ankistrodesmus flexuosus (083) apresentou como monossacarídeos principais: fucose, glucose, xylose; mesmas quantidades de manose e galactose; pequenas quantidades de n-acetil galactosamina, n-acetil glucosamina e ramnose. *Ankistrodesmus stipitatus* (278) apresentou como monossacarídeos principais fucose, xylose e ramnose; mesmas quantidades de galactose, glucose e manose; pequenas quantidades n-acetil glucosamina e traço de n-acetil-galactosamina.

Ankistrodesmus fusiformis (333) apresentou como monossacarídeos principais glucose, xylose e fucose, mesmas quantidades de galactose e manose, menor quantidade de ramnose e

pequena quantidade de n-acetil glucosamina. *Ankistrodesmus bernardii* (423) apresentou como monossacarídeos principais xylose, fucose, galactose e glucose; menores quantidades de manose e ramnose; e pequenas quantidades de n-acetil galactosamina, n-acetil glucosamina, ácido glicurônico e ácido galacturônico.

Tabela 1.2. Composição monomérica expressa em porcentagem (%) do carboidrato total dos polissacarídeos extracelulares para as diferentes espécies/cepas estudadas. GLUCAACID = Ácido glicurônico; GALACID = Ácido Galacturônico; GLCNAC = n-acetil-glicosamina; GLANAC = n-acetil-galactosamina

	XYLOSE	FUCOSE	ARABINOSE	RAMNOSE	MANOSE	GLUCOSE	GALACTOSE	GLUCACID	GALACID	GLCNAC	GLANAC
<i>A.densus (003)</i>	9.5	38.6	0	9.9	14	8.2	14.2	3.2	0	Traço	2.3
<i>A.densus (128)</i>	8.4	37.2	0	9.5	14.4	8.9	14.4	4.4	0	Traço	2.7
<i>A.densus (239)</i>	5.5	20.6	1	7.3	28.4	13.8	11.5	8.3	0	0	3.6
<i>A.stipitatus (278)</i>	17.2	37.3	0	17.1	8.2	8.4	10.4	0	0	1.2	Traço
<i>A.fusififormis (333)</i>	19.7	19	0	7.1	15	22.1	15.8	0	0	1.3	0
<i>A.flexuosus (083)</i>	15.4	28.5	0	1.4	12.4	25.8	12	0	0	2.2	2.3
<i>A.bernardii (423)</i>	28.1	19.5	0	4.1	8.7	16.1	16.3	1.1	1.1	2.1	2.9

Análise das ligações glicosídicas.

A metilação do polissacarídeo das algas *A. densus* (003) e *A. densus* (128) mostrou similaridade entre eles, sendo que a cadeia principal é composta por fucose, principalmente pela parte terminal desse monômero (12.9% e 10.5%), 1-3 fucose (8.5% e 8.9%) e 1-2,4 fucose (11.0% e 9.8%) (Tabela 1.3). Xylose, ramnose, manose e galactose também apresentam ligações dominantes no polissacarídeo dessas algas (1-2 xylose, T-ramnose, T-manose, 1-4 galactose e 1-3 galactose). É interessante ressaltar a presença de porção terminal de ácido glicurônico (1% em ambas as algas) e de porção terminal de n-acetil-glicosamina (traço) (Tabela 1.3)

Uma outra cepa da espécie *A. densus* (239) apresenta na cadeia principal manose, ácido glicurônico e glucose (Tabela 1.3), sendo 1-3 manose (8.8%) a ligação glicosídica mais abundante, seguida por 1-4 ácido glicurônico (7.8%), 1-2 manose (7.1%) e T-glucose (6.8%). T-ramnose (5.7%) e 1-4 galactose (6.2%) também apresentam ligação dominante no polissacarídeo, o que já foi notado nas outras cepas de *A. densus*, além da presença de ácido glicurônico terminal (1.0%). É importante notar a presença de 1-2 arabinose furanose (1.0%) nessa alga.

A ligação glicosídica do EPS de *A. stipitatus* (278) é composto principalmente de fucose, ramnose e xylose (Tabela 1.3), sendo 1-2,3 fucose (19.4%) a ligação mais abundante, seguida por 1-2 ramnose e T-xylose (10.1%). Fucose ainda apresenta as ligações T-fucose (6.1%) e 1-2 fucose (6.0%) como ligações importantes no polissacarídeo. Essa alga não apresentou uma porção de ligações de monômeros ácidos, porém apresentou T-n-acetil-glucosamina (1.7%).

Para *A. fusiformis* a cadeia é composta principalmente de xylose, fucose e glucose (Tabela 1.3), sendo T-xylose (12.2%) a ligação mais abundante, seguida por T-glucose (10.6%), 1-4 glucose (7.9%) e 1-2,3 fucose (7.3%). Galactose terminal (6.9%) e 1-2 ramnose (6.3%) também

são ligações importantes na cadeia. *A. fusiformis* também não apresentou ligações glicosídicas de monômeros ácidos, porém apresentou n-acetil glucosamina terminal (1.2%).

Tanto *A. bernardii* (423) quanto *A. flexuosus* (083), ainda que não apresentem composição parecidas entre si, apresentaram-se mais semelhantes se comparadas com as demais *Ankistrodesmus* estudadas (Tabela 1.3). As duas algas apresentaram uma fração de ligação terminal muito maior do que as encontradas nas outras. *A. bernardii* apresentou uma T- xylose (17.7%) enquanto *A. flexuosus* apresentou T-glucose (21.6%) como seus componentes principais da cadeia. *A. bernardii* ainda apresentou 1-4 xylose (10.7%), 1-4 glucose (8.5%) como componentes principais do seu polissacarídeo, além de apresentar T-n-acetil-galactosamina, T-ácido galacturônico (1.2%), inédito nas outras *Ankistrodesmus* e traços de T-ácido glicurônico. Já *A. flexuosus* apresentou T-fucose (11.9%) e 1-2 xylose (11.5%) como componentes principais do seu polissacarídeo, apresentando T-n-acetil glucosamina (2.3%) e não apresentou ligações glicosídicas de monomêros ácidos.

Tabela 1.3. Ligações Glicosídicas encontradas para o gênero *Ankistrodesums*. (% M = mesmo monossacarídeo e % T = total presente) (T – porção terminal no EPS)

Monosaccharide	linkage	A. <i>densus</i> (003)		A. <i>densus</i> (128)		A. <i>densus</i> (239)		A. <i>stipitatus</i> (278)		A. <i>fusiformis</i> (333)		A. <i>flexuosus</i> (083)		A. <i>bernardii</i> (423)	
		(%M)	(%T)	(%M)	(%T)	(%M)	(%T)	(%M)	(%T)	(%M)	(%T)	(%M)	(%T)	(%M)	(%T)
Xylose															
	T-xyl	0.0	0.0	0.0	0	0	0	58.7	10.1	59.5	12.2	26.8	4.2	62.3	17.7
	1-2 xyl	77.9	7.4	78.6	6.6	100	4.1	8.1	1.4	16.6	3.4	73.2	11.5	0	0
	1-3 xyl	22.1	2.1	21.4	1.8	0	0	27.3	4.7	0	0	0	0	0	0
	1-4 xyl	0.0	0.0	0.0	0	0	0	5.9	1	23.9	4.9	0	0	37.7	10.7
	Total	100.0	9.5	100.0	8.4	100	4.1	100	17.2	100	20.5	100	15.7	100	28.4
Fucose															
	T-fuc	33.1	12.9	28.2	10.5	19	4	16.4	6.1	12.9	2.4	41	11.9	33.8	6.7
	1-2 fuc	0.0	0.0	0.0	0	0	0	16.1	6	9.7	1.8	17.9	5.2	20.7	4.1
	1-3 fuc	21.8	8.5	23.9	8.9	16.6	3.5	5.9	2.2	6.5	1.2	17.9	5.2	0	0
	1-4 fuc	3.1	1.2	4.0	1.5	14.7	3.1	2.9	1.1	12.4	2.3	0	0	0	0
	1-3,4 fuc	3.1	1.2	2.7	1	20.8	4.4	6.7	2.5	13.4	2.5	15.2	4.4	5.6	1.1
	1-2,3 fuc	10.8	4.2	14.8	5.5	28.9	6.1	52	19.4	39.2	7.3	8	2.3	28.8	5.7
	1-2,4 fuc	28.2	11.0	26.3	9.8	0	0	0	0	5.9	1.1	0	0	11.1	2.2
	Total	100.0	39.0	100.0	37.2	100	21.1	100	37.3	100	18.6	100	29	100	19.8
Arabinose															
	T-ara	0.0	0.0	0.0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1-2 ara (f)	0.0	0.0	0.0	0	100	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	Total	0.0	0.0	0.0	0	100	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Ramnose															
	T-rha	45.5	4.5	53.7	5.1	77	5.7	32.2	5.5	13.7	1	0	0	0	0
	1-2 rha	44.4	4.4	35.8	3.4	23	1.7	62	10.6	86.3	6.3	100	1.4	48.8	2
	1-3 rha	0.0	0.0	0.0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1-4 rha	0.0	0.0	0.0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	51.2	2.1
	1-2,3 rha	0.0	0.0	0.0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1-2,4 rha	10.1	1.0	10.5	1	0	0	5.8	1	0	0	0	0	0	0
	1-3,4 rha	0.0	0.0	0.0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Total	100.0	9.9	100.0	9.5	100	7.4	100	17.1	100	7.3	100	1.4	100	4.1

<hr/>															
Manose	T-man	39.4	5.6	41.0	5.9	24.1	7	31.7	2.6	9.8	1.4	12.7	1.6	29.9	2.6
	1-2														
	man	33.8	4.8	29.2	4.2	24.4	7.1	41.5	3.4	25.9	3.7	50.8	6.4	0	0
	1-3														
	man	0.0	0.0	0.0	0	30.2	8.8	0	0	27.3	3.9	36.5	4.6	40.2	3.5
	1-4														
	man	0.0	0.0	0.0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1-6														
	man	0.0	0.0	0.0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1-2,3														
	man	0.0	0.0	0.0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1-3,4														
	man	8.5	1.2	6.9	1	0	0	26.8	2.2	37	5.3	0	0	16.1	1.4
	1-2,6														
	man	18.3	2.6	22.9	3.3	12	3.5	0	0	0	0	0	0	0	0
	1-3,6														
	man	0.0	0.0	0.0	0	9.3	2.7	0	0	0	0	0	0	13.8	1.2
	1-2,3,4														
	man	0.0	0.0	0.0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1-2,4,6														
	man	0.0	0.0	0.0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	total	100.0	14.2	100.0	14.4	100	29.1	100	8.2	100	14.3	100	12.6	100	8.7
Glucose	T-glu	12.2	1.0	30.3	2.7	48.6	6.8	30.9	2.6	49.3	10.6	82.4	21.6	16.1	2.6
	1-2 glu	47.6	3.9	34.8	3.1	32.8	4.6	0	0	0	0	0	0	8.6	1.4
	1-3 glu	0.0	0.0	0.0	0	0	0	39.3	3.3	0	0	0	0	0	0
	1-4 glu	28.0	2.3	23.6	2.1	0	0	0	0	36.7	7.9	17.6	4.6	52.5	8.5
	1-6 glu	0.0	0.0	0.0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1-2,3														
	glu	12.2	1.0	11.2	1	0	0	13.1	1.1	14	3	0	0	0	0
	1-2,4														
	glu	0.0	0.0	0.0	0	8.6	1.2	0	0	0	0	0	0	0	0
	1-3,4														
	glu	0.0	0.0	0.0	0	10	1.4	16.7	1.4	0	0	0	0	8.6	1.4
	1-3,6														
	glu	0.0	0.0	0.0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1-4,6														
	glu	0.0	0.0	0.0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8	1.3
	1-2,3,4														
	glu	0.0	0.0	0.0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1-2,3,6														
	glu	0.0	0.0	0.0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

	1-3,4,6 glu	0.0	0.0	0.0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6.2	1
	total	100.0	8.2	100.0	8.9	100	14	100	8.4	100	21.5	100	26.2	100	16.2
Galactose	T-gal	14.1	2.0	13.9	2	0	0	25	2.6	42.6	6.9	16.3	1.7	23	4
	T-gal f	0.0	0.0	0.0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1-2 gal	0.0	0.0	0.0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1-4 gal	31.7	4.5	29.9	4.3	58.5	6.2	33.7	3.5	22.2	3.6	30.8	3.2	32.8	5.7
	1-3 gal	32.4	4.6	34.0	4.9	10.4	1.1	16.3	1.7	24.1	3.9	11.5	1.2	23.6	4.1
	1-6 gal	7.0	1.0	6.9	1	9.4	1	0	0	0	0	23.1	2.4	12.6	2.2
	1-6 gal f	0.0	0.0	0.0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1-2,3 gal	14.8	2.1	15.3	2.2	21.7	2.3	15.4	1.6	11.1	1.8	0	0	0	0
	1-2,6 gal	0.0	0.0	0.0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1-3,6 gal	0.0	0.0	0.0	0	0	0	0	0	0	0	18.3	1.9	0	0
	1-4,6 gal	0.0	0.0	0.0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1-2,3,4 gal	0.0	0.0	0.0	0	0	0	9.6	1	0	0	0	0	8	1.4
	total	100.0	14.2	100.0	14.4	100	10.6	100	10.4	100	16.2	100	10.4	100	17.4
Glc Acid	T-glc acid	26.3	1.0	22.7	1	11.6	1	0	0	0	0	0	0	Traço	Traço
	1-4 glc acid	73.7	2.8	77.3	3.4	88.4	7.6	0	0	0	0	0	0	100	1
	Total	100.0	3.8	100.0	4.4	100	8.6	0	0	0	0	0	0	100	1
Gal Acid	T-gal acid	0.0	0.0	0.0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	1.2
	1-4 gal acid	0.0	0.0	0.0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Total	0.0	0.0	0.0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	1.2
Glc Nac	T-glc nac	Traço	Traço	Traço	Traço	0	0	100	1.7	100	1.2	100	2.3	0	0
	1-4 glc nac	0.0	0.0	0.0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0
	Total	0.0	0.0	0.0	0	0	0	100	1.7	100	1.2	100	2.3	0	0
Gal Nac	T-gal nac	0.0	0.0	0.0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	2.9

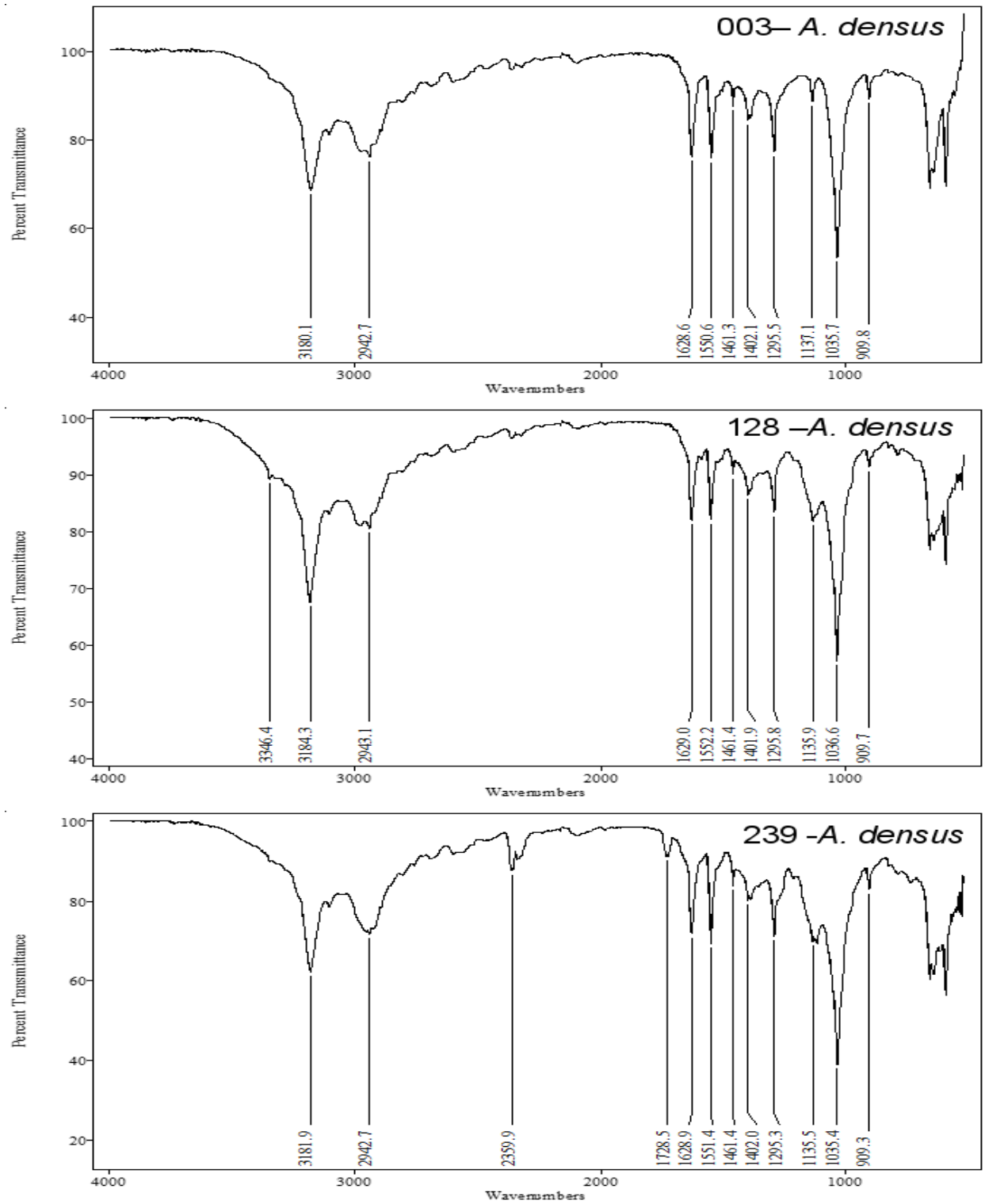
1-4 gal nac	100.0	2.3	100.0	2.7	100	3.7	0	Traço	0	0	100	2.3	0	0
1-4,6 gal nac	0.0	0.0	0.0	0	0	0	0	Traço	0	0	0	0	0	0
Total	100.0	2.3	100.0	2.7	100	3.7	0	0	0	0	100	2.3	100	2.9

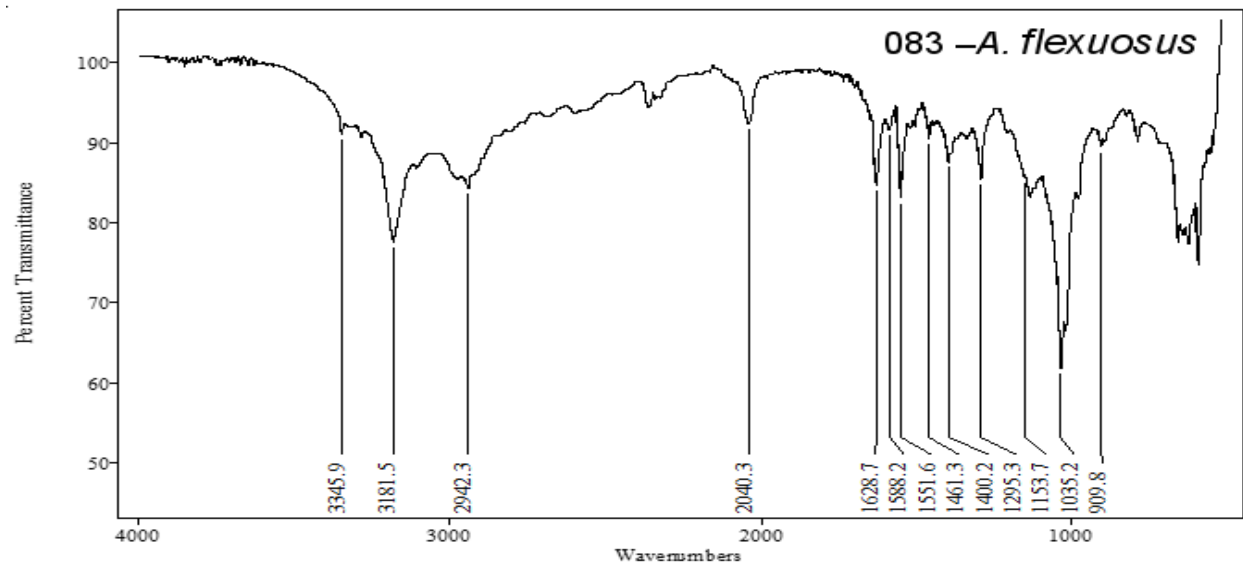
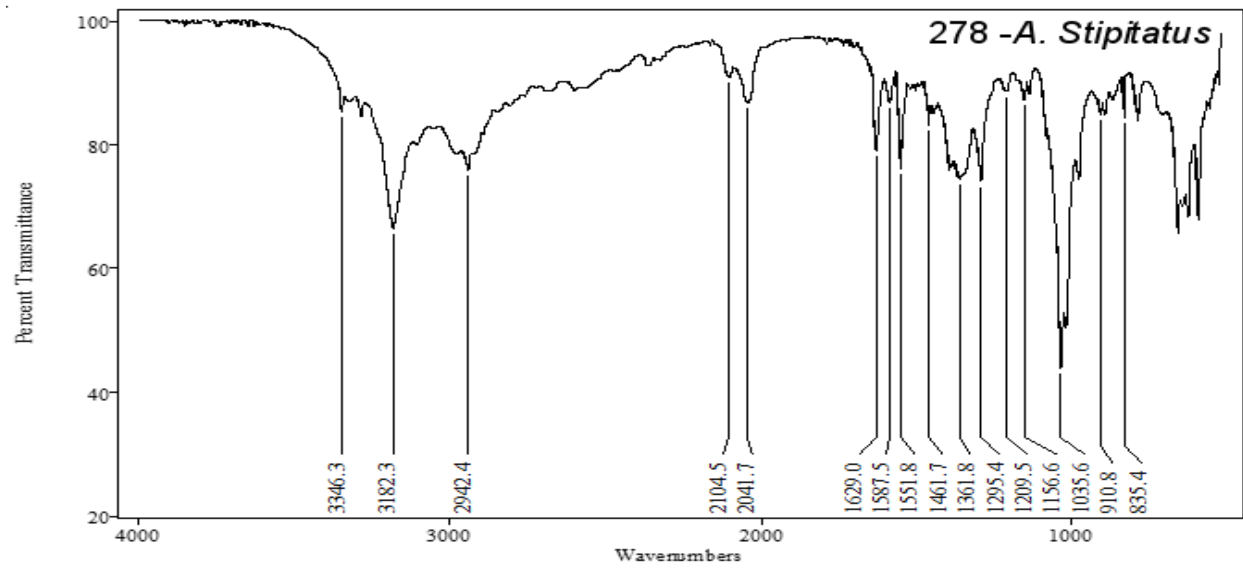
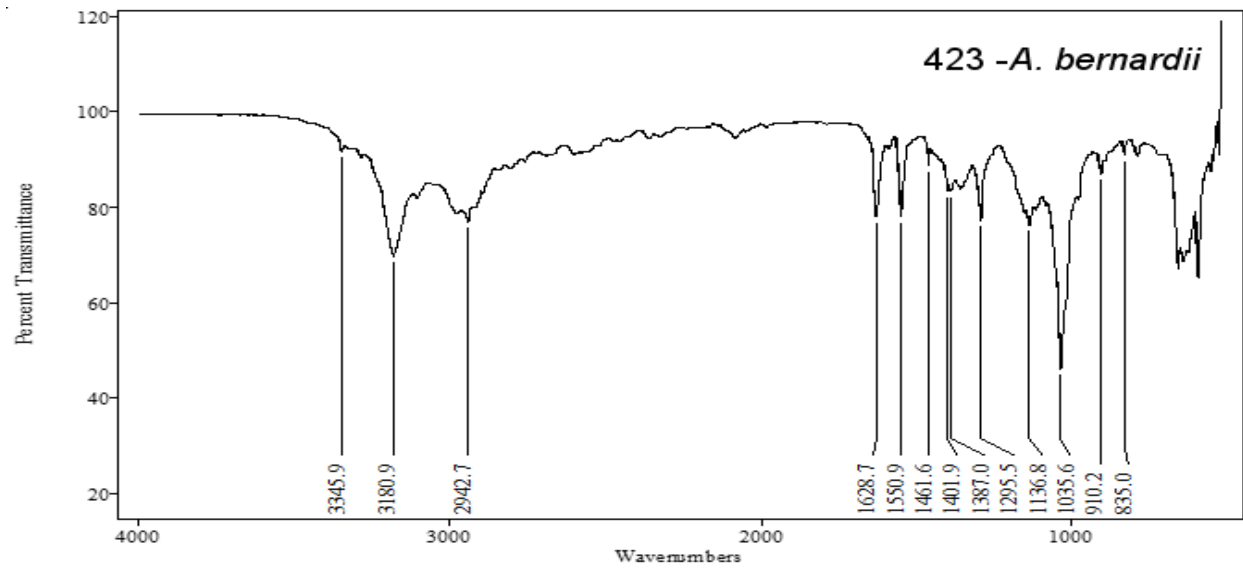
Análise estrutural por FT-IR. Os espectros obtidos por FT-IR dos polissacarídeos das algas estudadas são mostrados na Figura 1.3. Os resultados mostram características comuns ao esperado para polissacarídeos. O EPS de todas as espécies apresentou um padrão de bandas próximo à região de 3200cm^{-1} pertencente à vibração de alongamento da hidroxila no polissacarídeo (Gomez-Ordóñez & Rúperez, 2011). A banda de absorção no intervalo de $3200\text{-}2800\text{ cm}^{-1}$ foi devido à vibração de alongamento da ligação do C-H. Todos os polissacarídeos apresentaram uma absorbância na região de $1200\text{-}950\text{ cm}^{-1}$. A região entre $950\text{-}750$, denominada *fingerprint* (Mathlouthi & Koenig, 1986) apresentou uma absorção na porção 909 em todas as espécies estudadas, muito provavelmente relacionada a C-H.

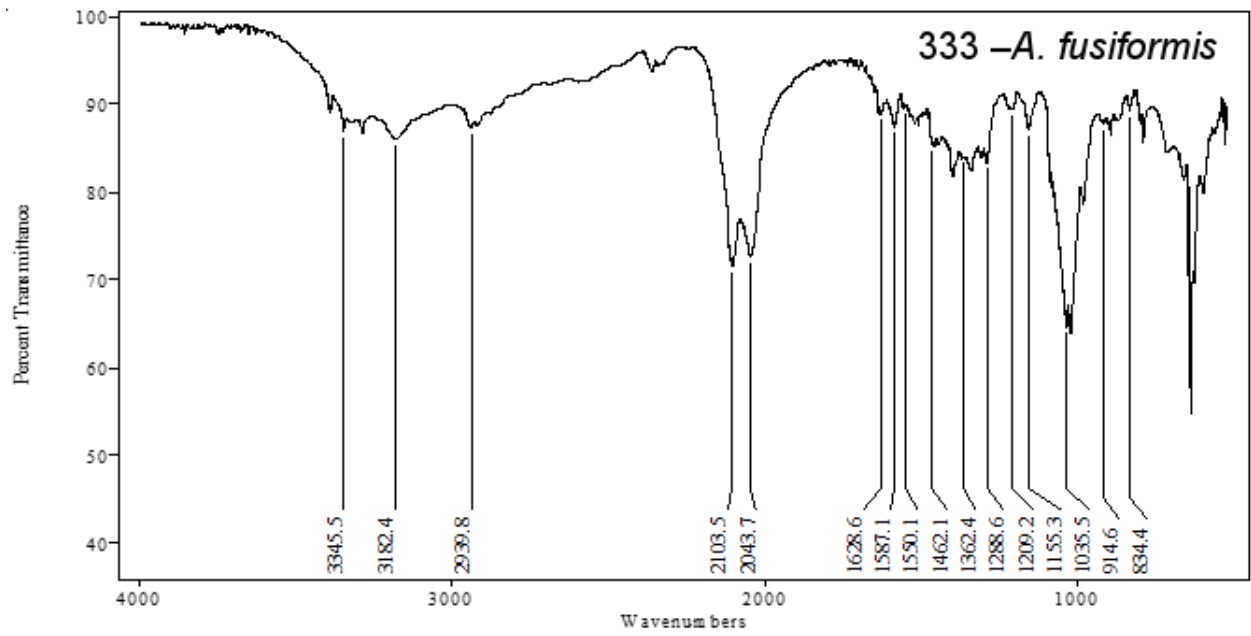
Ankistrodesmus bernardii, *Ankistrodesmus fusiformis* e *Ankistrodesmus stipitatus* apresentaram picos de absorbância na região próximo a 1150 e 830 correlacionado à presença de S = O (Tipson, 1968; Barker *et al.* 1956) e grupo sulfato (C-O-S) no carbono secundário na posição equatorial do anel (Harris & Turkey, 1970).

É interessante notar a presença P = O em *Ankistrodesmus fusiformis* e *Ankistrodesmus stipitatus* com pico de absorbância na região entre 1250 – 1200 (D'Souza *et al.* 2008 em *Padina tetrastromatica*).

Figura 1.3. Espectros de infravermelho (FT-IR) dos polissacarídeos extracelulares para as diferentes cepas/espécies de *Ankistrodesmus*







Similaridade entre os polissacarídeos de Ankistrodesmus. Os padrões de similaridade entre os polissacarídeos podem ser visualizados no *heatmap* da Figura 1.4 e da Figura 1.5.

Utilizando os monômeros constituintes, podemos observar que duas cepas de *A. densus* (003 e 128) apresentaram um alto grau de similaridade (Figura 1.4). É interessante notar que a cepa de *A. densus* (239) apresentou muito pouca similaridade com as outras espécies de *Ankistrodesmus*, principalmente quando comparada com as outras espécies que não *Ankistrodesmus densus*. *Ankistrodesmus stipitatus* apresentou uma boa similaridade em relação as cepas *A. densus* 003 e 128. *Ankistrodesmus fusiformis* e *Ankistrodesmus flexuosus* também apresentaram uma boa similaridade entre si.

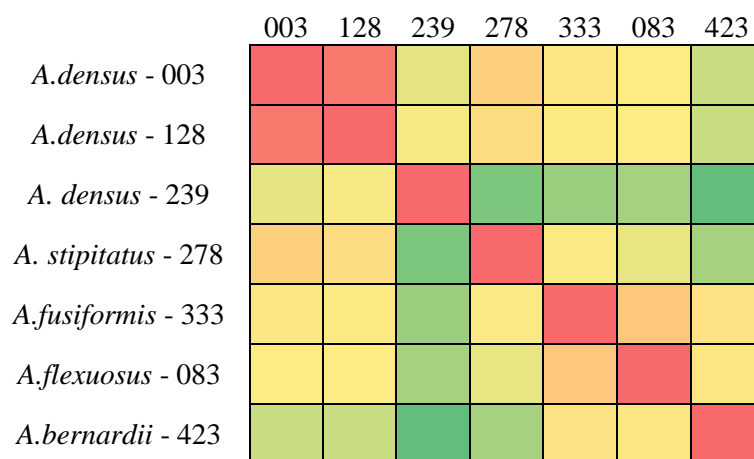


Figura 1.4. *Heatmap* de similaridade entre as espécies/cepas de *Ankistrodesmus* utilizando os monômeros (vermelho = maior similaridade; verde = menor similaridade)

Analisando a Figura 1.5, utilizando-se as ligações glicosídicas, duas cepas de *Ankistrodesmus densus* (003 e 128) apresentaram um alto grau de similaridade, quando comparadas às três cepas de *Ankistrodesmus densus* estudadas. *Ankistrodesmus densus* (cepa 239) apresentou pouca similaridade quando comparadas com as outras espécies de *Ankistrodesmus*. *Ankistrodesmus bernardii* foi a espécie que apresentou a menor similaridade em relação às outras espécies do gênero, somente apresentou uma ligeira similaridade a *Ankistrodesmus fusiformis*.

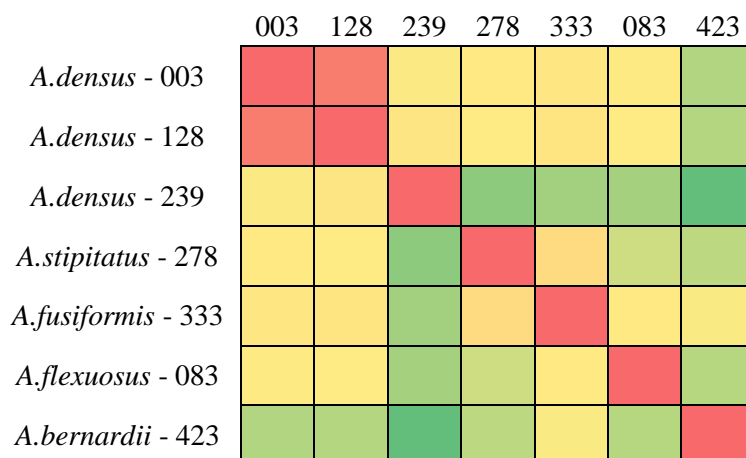


Figura 1.5. *Heatmap* de similaridade entre as espécies/cepas de *Ankistrodesmus* utilizando as ligações glicosídicas (vermelho = maior similaridade; verde = menor similaridade)

1.4 Discussão

Os EPSs produzidos pelas diferentes espécies/cepas do gênero *Ankistrodesmus* diferem na composição monomérica, ligação glicosídica e composição estrutural; entretanto, apresentam um padrão de monômeros semelhante ao encontrado por Paulsen *et al.* (1998) para uma outra cepa de *Ankistrodesmus densus*.

Os monossacarídeos mais frequentes encontrados para as Chlorophyceae são galactose, xylose, arabinose, fucose, ramnose e manose (Allard & Casadevall 1990, Metzger *et al* 1990). Esse padrão de monossacarídeos aparece em *A. densus* (003) e *A. densus* (128), com os monômeros predominantes sendo fucose, galactose e manose; *A. stipitatus* (278) com predominância de fucose, xylose e ramnose; *A. bernardii* (423) apresentou xylose, fucose e galactose.

As outras espécies desse grupo apresentaram glicose juntamente com outros monômeros, Paulsen & Vieira (1994) já haviam observado a presença de glicose como monômero frequente

para outro grupo de algas verdes, a desmídia *Spondilosium panduriforme*, enquanto Mishra & Jha (2009) encontraram a presença de glicose para *Dunaliella salina*.

A análise bioquímica mostra que o EPS é único para as diferentes espécies (Figura 1.4) o que nos leva a supor que existe uma diversidade bioquímica notável intra-gênero. Essas características de diferenciação bioquímica foram notadas por Kiemle *et al* (2007) para algumas espécies de desmídias.

As ligações glicosídicas também apresentaram um padrão único e um elevado grau de diversidade entre as espécies de *Ankistrodesmus* (Figura 1.5). Observando a Tabela 4 é possível notar a predominância de T-fucose e 1-2,4 fucose em *A. densus* (003 e 128), enquanto *A. densus* (239) apresentou predominância de 1-3 manose e 1-4 ácido glicurônico. Paulsen *et al* (1998) também encontrou essas ligações glicosídicas para o EPS de *A. densus*. O EPS de *A. stipitatus* (278) apresentou predominância de 1-2,3 fucose (19,4%) e, dessa forma, nos dá indícios de um polissacarídeo extremamente ramificado. *A. fusiformis* (333) apresentou dominância de polissacarídeos terminais (T-xylose e T-glucose) e a ligação de ramificação mais abundante foi 1-2,3 fucose. *A. bernardii* (423) e *A. flexuosus* (083) não apresentaram abundância significativa nas ligações que apresentam pontos de ramificação, apresentando um polissacarídeo mais linear se comparado com as outras espécies/cepas de *Ankistrodesmus*.

Segundo Rees & Scott (1971), é muito comum na natureza a ligação cuja parte principal é 1-2 e a ramificação é 1-4 (como exemplo para as *A. densus* na ligação glicosídica 1-2,4 fucose) compartilhar a habilidade para a formação de agregados fibrosos, formando um envoltório mucilaginoso. Já a ramificação em 1-3 (ex. *A. stipitatus* – 1-2,3 fucose) é muito menos comum por apresentar uma propriedade envoltória inferior.

A predominância de fucose em *Ankistrodesmus* é significativa, uma vez que esse monômero apresenta propriedades hidrofóbicas que ajudam a manter a matriz em forma de bainha ou cápsula (Wustman *et al* 1998; Hu *et al* 2003). A presença de polissarídeos terminais diferentes de fucose e ramnose no EPS de *Ankistrodesmus* pode ser um indicativo do motivo das colônias não apresentarem maiores aglutinações. Estudo de degradação microbiana do EPS da diatomácea *Thalassiosira sp.* (Giroldo *et al.* 2003) mostrou que conforme ocorre o aumento relativo dos deoxi açúcares (fucose e ramnose) por assimilação de outros monômeros, o polissacarídeo apresentou um caráter mais hidrofóbico, aumentando a o poder de adesão, o que contribuiu para a formação de agregados. Wustman *et al.* (1997) propuseram que polímeros compostos por alta proporção de fucose podem auxiliar na adesão célula-substrato através de interações hidrofóbicas. Porém, é improvável que para o gênero *Ankistrodesmus* um polímero enriquecido de fucose apresente essa mesma característica, uma vez que as culturas não mostraram características de adesão. No entanto, deve ser considerada a posição espacial do monômero terminal, Marszalek *et al* (1998) mostraram que a conformação do anel é variável e dependente do tipo de monômero e das ligações glicosídicas, isto dá uma característica única de elasticidade ao polissacarídeo, que dependendo de sua porção terminal pode apresentar uma rotação não característica, deixando o monômero terminal “escondido”.

A análise dos espectros obtidos por FT-IR confirmaram a presença do anel de piranose, que pode ser observada na banda de absorção na porção de 1035cm^{-1} (Figura 1.3) (Sheng *et al*, 2007). As três cepas de *Ankistrodesmus densus* e *Ankistrodesmus bernardii* apresentaram picos característicos de grupos carboxílicos (1550, 1461 e 1402), indicando um polissacarídeo ácido (Shang *et al.* 2013). Esses resultados vão ao encontro dos obtido por CG-MS que já haviam mostrado a presença de ácidos urônicos na composição de tais polissacarídeos.

O EPS de Chlorophyta, de uma forma geral, se apresenta como um heteropolissacarídeo altamente ramificado e sulfatado (Percival 1978, 1979), o que podemos observar para o polissacarídeo de *Ankistrodesmus*. Entretanto a presença de grupos sulfatados não é comum para algas de água doce, sendo mais comum para algas marinhas (Kloreg & Quatrano, 1988). De certa maneira podemos notar que a predominância para o gênero *Ankistrodesmus* foi a ausência de grupos sulfatados, apenas três espécies (*A. bernardii*, *A. stipitatus* e *A. fusiformis*) apresentaram sulfato, porém sem medida de sua concentração, como provável radical. A presença de grupo fosfato em *Ankistrodesmus fusiformis* e *Ankistrodesmus stipitatus* pode ser considerado um subproduto da reação fotossintética de produção de polissacarídeo (Beardall & Raven, 2012).

1.5 Conclusão

Ankistrodesmus apresenta um EPS composto principalmente por uma matriz complexa de polissacarídeo ramificado, presença de ácidos urônicos, ligações de éster sulfato, prováveis ligações de éster fosfato, interação hidrofóbicas e ligações de hidrogênio o que pode propiciar uma função única como biofilme. A diversidade entre os EPS observada no gênero *Ankistrodesmus* nos dá indícios de sua possível utilização como característica, podendo ser empregada na discriminação de espécies e, até mesmo, de cepas, podendo auxiliar futuros estudos filogenéticos da família Selenastraceae.

CAPÍTULO 2. COMPOSIÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS EXTRACELULARES PRODUZIDOS POR QUATRO
CEPAS DE *SELENASTRUM BIBRAIANUM*, DUAS CEPAS DE *MESSASTRUM GRACILE* E *CURVASTRUM*
PANTANALE (SELENASTRACEAE, CHLOROPHYTA)

2.1 Objetivo

Ao analisar as árvores filogenéticas obtidas por biologia molecular (Garcia et al., 2017) os autores perceberam que cepas de *Selenastrum gracile*, cujas cepas apresentavam características morfológicas encontravam-se dispostas em clados distintos e distantes entre si. Portanto, os autores propõem que o gênero *Selenastrum* seja dividido em *Messastrum* Garcia T.S. (Reinsch) e *Selenastrum* Reinsch além de um novo gênero *Curvastrum* Garcia T.S. (Reinsch). Desse modo, os autores propõem, além de um novo gênero *Curvastrum*, a realocação de um gênero *Messastrum gracile* (syn. *Selenastrum gracile*). A diversidade dos EPS destas microalgas foi obtida com base na composição monomérica, ligações glicosídicas, radicais e as estruturas constituintes possíveis de serem obtidas por espectroscopia de infravermelho (FT-IR) dos polissacarídeos extracelulares de quatro cepas de *Selenastrum bibraianum*, duas cepas da espécie *Messastrum gracile* e da espécie *Curvastrum pantanale*.

Portanto o objetivo deste trabalho foi verificar, se a fragmentação do gênero *Selenastrum*, com base em biologia molecular, tem suporte na quimiotaxonomia com o uso de EPS.

2.2 Materiais e Métodos

Organismos. Foram analisados os EPS de 3 espécies/strains (7 cepas) dos gêneros *Selenastrum*, *Messastrum* e *Curvastrum*. Os organismos utilizados no trabalho (Tabela 2.1) foram isolados de diferentes locais do Brasil e estão sendo mantidos em cultivo axênico na coleção de Culturas de Microalgas de Água Doce do Departamento de Botânica da Universidade Federal de São Carlos (WCD 835) com os códigos indicados para cada alga.

Tabela 2.1 Cepas/Espécies de *Selenastrum*/*Messastrum*/*Curvastrum* utilizados no trabalho

Espécie	Descrição	Cepa	Local de Isolamento	Ano	GPS
<i>Selenastrum bibrainum</i>	Reinsch 1866	047	São Carlos – SP	2008	21°59'08.5" S 47°52'50.6" W
	Reinsch 1866	125	Jataí – SP	1992	21°36'28.5"S 47°46'13,1"W
	Reinsch 1866	168	Jataí – SP	1992	21°36'28.5"S 47°46'13.1"W
	Reinsch 1866	317	São Paulo – SP	2010	23°44'04.3"S 46°45'44.4"W
<i>Messastrum gracile</i>	Reinsch 1866	005	Itirapina - SP	1978	22°12'20.6"S 47°52'37.6"W
	Reinsch 1866	470	Santa Cruz das Palmeiras – SP	2012	21°48'38.0"S 47°16'26.0"W
<i>Curvastrum pantanale</i>	Reinsch 1866	350	Aquidauana - MS	2011	19°17'59.0"S 55°47'45.0"W

Os procedimentos e condições de cultivo, obtenção do EPS, caracterização do EPS, composição monomérica, ligações glicosídicas, análise dos polissacarídeos por espectrometria de infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR), foram pormenorizadas no capítulo 1.

2.3 Resultados

Composição monomérica.

Podemos notar que o EPS das espécies estudadas apresenta um complexo de monossacarídeos de composição semelhante, porém com porcentagens distintas (Tabela 2.2). *Selenastrum bibrainum* (125), *Messastrum. gracile* (470) e *Messastrum gracile* (005)

apresentaram os mesmos monômeros principais: fucose, manose e glicose (Tabela 2.2). Porém enquanto *Selenastrum bibraianum* (125) apresentou fucose em maior quantidade (28.7%), seguido por manose (24.7%); as duas cepas de *Messastrum gracile* (005 e 470) apresentaram manose (29.7% e 30.5%), seguido por glicose (27.4% e 26.8%)

S. bibrainum (168) e *S. bibraianum* (317) apresentaram os mesmos monômeros principais, glicose (31.5% e 32.2%), seguido por manose (25.9% e 24.6%) (Tabela 2.2), porém o terceiro monômero principal para *S. bibraianum* (168) foi galactose e xylose (ambos com 12.1%), enquanto para *S. bibraianum* (317) o terceiro monômero principal foi fucose (19.5%). *S. bibrainum* (047) apesar de também não apresentar uma diferença muito grande nas porcentagens entre os monômeros, quando comparado com as outras espécies, apresentou uma discrepância em relação aos açúcares principais. Seus monômeros principais foram galactose (26.1%), seguido por fucose (24.2%) e ramnose (15.4%).

C. pantanale (350) não apresentou uma composição tão diferente das outras espécies, porém seus monômeros principais foram manose (27.6%), seguido por fucose (21.8%) e galactose (16.2%) (Tabela 2.2), essa espécie foi a única que apresentou uma quantidade de açúcares aminados significativos, as demais espécies ou não apresentaram esse tipo de monômero ou apresentaram apenas traços de presença desse tipo de açúcar.

Tabela 2.2. Composição monomérica expressa em porcentagem (%) do carboidrato total dos polissacarídeos extracelulares para as diferentes espécies estudadas. GLUCAACID = Ácido glicurônico; GALACID = Ácido Galacturônico; GLCNAC = n-acetil-glicosamina; GLANAC = n-acetil-galactosamina

	XYLOSE	FUCOSE	ARABINOSE	RAMNOSE	MANOSE	GLUCOSE	GALACTOSE	GLUCACID	GALACID	GLCNAC	GLANAC
<i>S. bibráianum</i> (047)	13.1	24.2	0	15.4	12.5	8.7	26.1	0	0	0	0
<i>S. bibráianum</i> (125)	15.5	28.7	0	1.4	24.7	20.7	8.8	0	0	Traço	Traço
<i>S. bibráianum</i> (168)	12.1	7.4	0	11	25.9	31.5	12.1	0	0	0	0
<i>S. bibráianum</i> (317)	7.7	19.5	0	2.6	24.6	32.2	12.2	1.1	0	Traço	0
<i>M. gracile</i> (005)	15.4	20.6	0	0	29.7	27.4	6.8	0	0	Traço	0
<i>M. gracile</i> (470)	15.6	21.1	0	0	30.5	26.8	5.8	0	0	Traço	0
<i>C. pantanale</i> (350)	10.1	21.8	0	13	27.6	9.1	16.2	0	0	1.1	1.1

Análise das ligações glicosídicas.

A metilação do polissacarídeo das algas *M. gracile* (005) e *M. gracile* (470), assim como já haviam sido observados para os monômeros, apresentaram as mesmas ligações glicosídicas como suas principais (Tabela 2.3). A cadeia principal dessas duas espécies apresentou uma grande quantidade de 1-2 manose (16.8% e 18.9%), terminal glicose (14.8% e 16.1%) e 1-4 glicose (8.8% e 8.4%). As quatro cepas de *Selenastrum bibraianum* analisadas (Tabela 2.3) mostraram similaridade de concentração em sete ligações glicosídicas, porém somente 1-3 manose pode ser considerada relevante na cadeia principal do monômero: 6.7% em *S. bibraianum* (047); 9% em *S. bibraianum* (125); 12.1% em *S. bibraianum* (168); e 14.6% em *S. bibraianum* (317). A ligação glicosídica principal para *S. bibraianum* (047) é T-galactose (21.7%), para *S. bibraianum* (125) é T-glicose (16.4%), para *S. bibraianum* (168 e 317) é 1-4 glicose (28% e 25% respectivamente).

Curvastrum pantanale apresentou como ligação glicosídica na cadeia principal de seu EPS 1-3 manose (23.8%) seguido por 1-2 ramnose.

S. bibraianum (047) apresentou ligação n-acetil diferente das demais *S. bibraianum* (125 e 317). Enquanto para *S. bibraianum* (047) apresentou 1-4,6 n-acetil galactosamina, *S. bibraianum* (125 e 317) apresentaram 1-4 n-acetil glicosamina.

A ligação 1-4,6 n-acetil-galactosamina também apareceu em *C. pantanale*, enquanto 1-4 n-acetil-glicosamina apareceu nas duas cepas de *M. gracile* (005 e 470)

S. bibraianum (317) foi a única espécie que apresentou uma ligação glicosídica ácida na cadeia, 1-4 ácido glicurônico (1.1%).

Tabela 2.3. Ligações Glicosídicas encontradas para os gêneros *Selenastrum*, *Curvastrum* e *Messastrum* (% M = mesmo monossacarídeo e % T = total presente) (T – porção terminal no EPS)

Monosaccharide	linkage	<i>S. bibraianum</i> (047)		<i>S. bibraianum</i> (125)		<i>S. bibraianum</i> (168)		<i>S. bibraianum</i> (317)		<i>C. pantanale</i> (350)		<i>M. gracile</i> (005)		<i>M. gracile</i> (470)	
		(%M)	(%T)	(%M)	(%T)	(%M)	(%T)	(%M)	(%T)	(%M)	(%T)	(%M)	(%T)	(%M)	(%T)
Xylose															
	T-xyl	47.3	6.2	26.5	4.1	43	5.2	100	7.7	37.6	3.8	41.7	6.5	46.1	7.1
	1-2 xyl	39	5.1	21.3	3.3	48	5.8	0	0	62.4	6.3	21.8	3.4	20.1	3.1
	1-3 xyl	13.7	1.8	0	0	9	1.1	0	0	0	0	14.7	2.3	12.3	1.9
	1-4 xyl	0	0	52.2	8.1	0	0	0	0	0	0	21.8	3.4	21.4	3.3
	Total	100	13.1	100	15.5	100	12.1	100	7.7	100	10.1	100	15.6	100.0	15.4
Fucose															
	T-fuc	11.6	2.8	41.1	11.8	13.5	1	11.3	2.2	23.4	5.1	5.2	1.1	8.7	1.8
	1-2 fuc	27.7	6.7	0	0	0	0	28.7	5.6	12.4	2.7	38.9	8.2	36.9	7.6
	1-3 fuc	16.1	3.9	35.9	10.3	18.9	1.4	12.8	2.5	36.7	8	17.1	3.6	11.7	2.4
	1-4 fuc	0	0	0	0	0	0	0	0	15.6	3.4	0	0	0.0	0
	1-3,4 fuc	30.9	7.5	0	0	14.9	1.1	19	3.7	0	0	17.5	3.7	20.4	4.2
	1-2,3 fuc	8.7	2.1	0	0	31.1	2.3	0	0	0	0	0	0	0.0	0
	1-2,4 fuc	5	1.2	23	6.6	21.6	1.6	28.2	5.5	11.9	2.6	21.3	4.5	22.3	4.6
	Total	100	24.2	100	28.7	100	7.4	100	19.5	100	21.8	100	21.1	100.0	20.6
Arabinose															
	T-ara	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0	0
	1-2 ara (f)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0	0
	Total	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0	0
Ramnose															
	T-rha	29.9	4.6	0	0	33.6	3.7	100	2.6	0	0	0	0	0.0	0
	1-2 rha	70.1	10.8	100	1.4	27.3	3	0	0	100	13	0	0	0.0	0
	1-3 rha	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0	0
	1-4 rha	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0	0
	1-2,3 rha	0	0	0	0	39.1	4.3	0	0	0	0	0	0	0.0	0
	1-2,4 rha	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0	0

	1-3,4 rha	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0	0	
	Total	100	15.4	100	1.4	100	11	0	2.6	100	13	0	0	0.0	0	
Manose	T-man	28.8	3.6	27.2	6.7	13.9	3.6	40.7	10	9.4	2.6	10.8	3.3	9.8	2.9	
	1-2 man	0	0	36.4	9	25.1	6.5	0	0	4.3	1.2	62	18.9	56.6	16.8	
	1-3 man	53.6	6.7	36.4	9	46.7	12.1	59.3	14.6	86.3	23.8	11.1	3.4	15.2	4.5	
	1-4 man	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0	0	
	1-6 man	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0	0	
	1-2,3 man	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0	0	
	1-3,4 man	8.8	1.1	0	0	14.3	3.7	0	0	0	0	0	0	0.0	0	
	1-2,6 man	8.8	1.1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0	0	
	1-3,6 man	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0	0	
	1-2,3,4 man	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	16.1	4.9	18.5	5.5	
	1-2,4,6 man	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0	0	
	total	100	12.5	100	24.7	100	25.9	100	24.6	100	27.6	100	30.5	100.0	29.7	
	Glucose	T-glu	25.3	2.2	79.2	16.4	0	0	12.3	4	33	3	60.1	16.1	54.0	14.8
		1-2 glu	46	4	15.5	3.2	0	0	0	0	23.1	2.1	0	0	0.0	0
		1-3 glu	28.7	2.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0	0
1-4 glu		0	0	0	0	88.3	28	76.9	25	0	0	31.3	8.4	32.1	8.8	
1-6 glu		0	0	0	0	0	0	0	0	12.1	1.1	0	0	0.0	0	
1-2,3 glu		0	0	5.3	1.1	0	0	0	0	31.8	2.9	0	0	0.0	0	
1-2,4 glu		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0	0	
1-3,4 glu		0	0	0	0	11.7	3.7	10.8	3.5	0	0	4.9	1.3	7.7	2.1	
1-3,6 glu		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0	0	

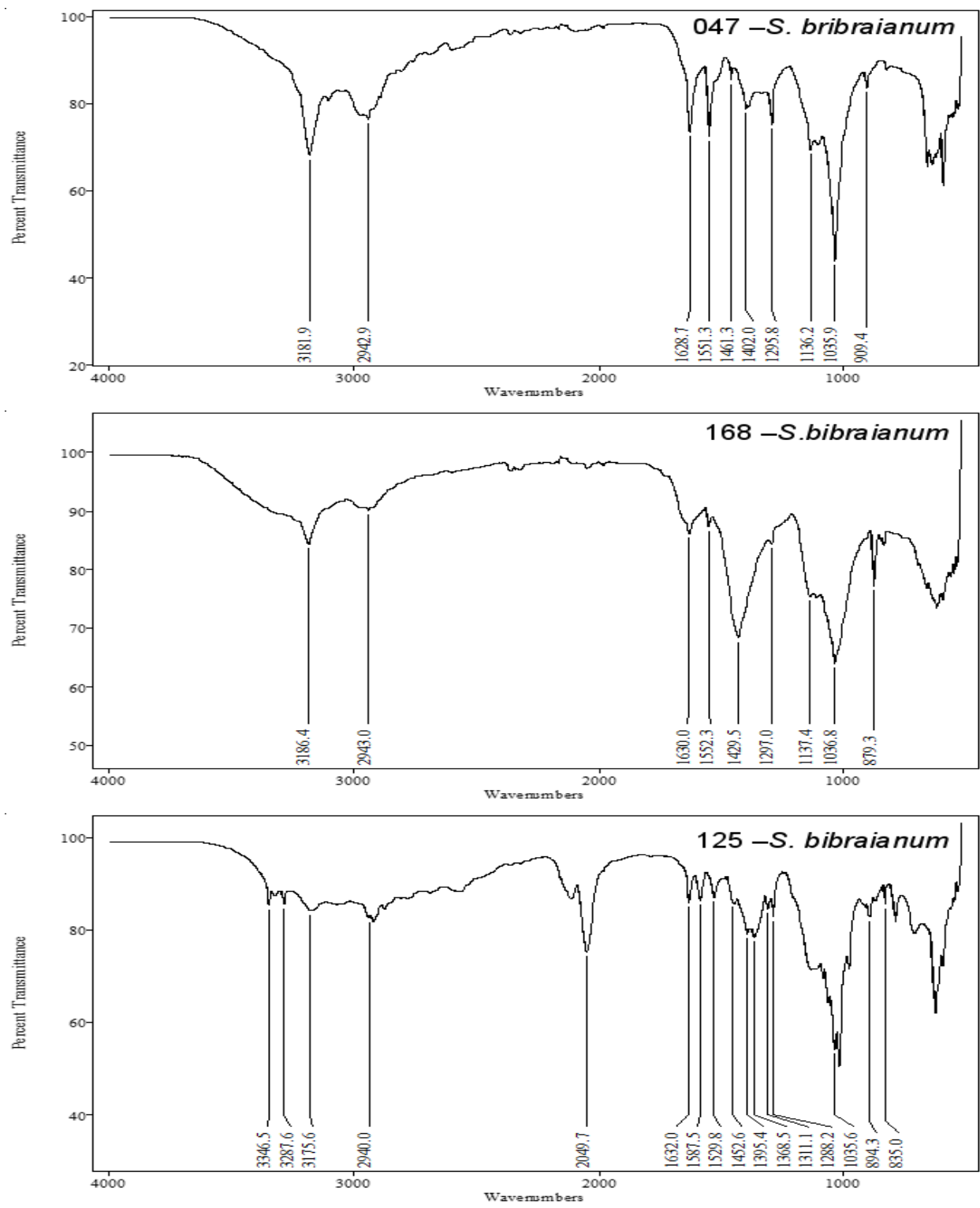
	1-4,6 glu	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3.7	1	6.2	1.7
	1-2,3,4 glu	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0	0
	1-2,3,6 glu	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0	0
	1-3,4,6 glu	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0	0
	total	100	8.7	100	20.7	100	31.7	100	32.5	100	9.1	100	26.8	100.0	27.4
Galactose	T-gal	83.2	21.7	27.3	2.4	8.3	1	15.6	1.9	22.9	3.7	58.6	3.4	57.4	3.9
	T-gal f	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0	0
	1-2 gal	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0	0
	1-4 gal	8.4	2.2	12.5	1.1	9.1	1.1	22.1	2.7	11.1	1.8	19	1.1	19.1	1.3
	1-3 gal	0	0	12.5	1.1	20.7	2.5	0	6.1	58	9.4	22.4	1.3	23.5	1.6
	1-6 gal	0	0	25	2.2	10.7	1.3	0	0	0	0	0	0	0.0	0
	1-6 gal f	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0	0
	1-2,3 gal	8.4	2.2	22.7	2	34.7	4.2	0	0	8	1.3	0	0	0.0	0
	1-2,6 gal	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0	0
	1-3,6 gal	0	0	0	0	16.5	2	12.3	1.5	0	0	0	0	0.0	0
	1-4,6 gal	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0	0
	1-2,3,4 gal	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0	0
	total	100	26.1	100	8.8	100	12.1	100	12.2	100	16.2	100	5.8	100.0	6.8
Glc Acid	T-glc acid	0	0	0	0	0	0	100	1.1	0	0	0	0	0	0
	1-4 glc acid	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Total	0	0	0	0	0	0	100	1.1	0	0	0	0	0	0
Gal Acid	T-gal acid	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1-4 gal acid	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Total	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

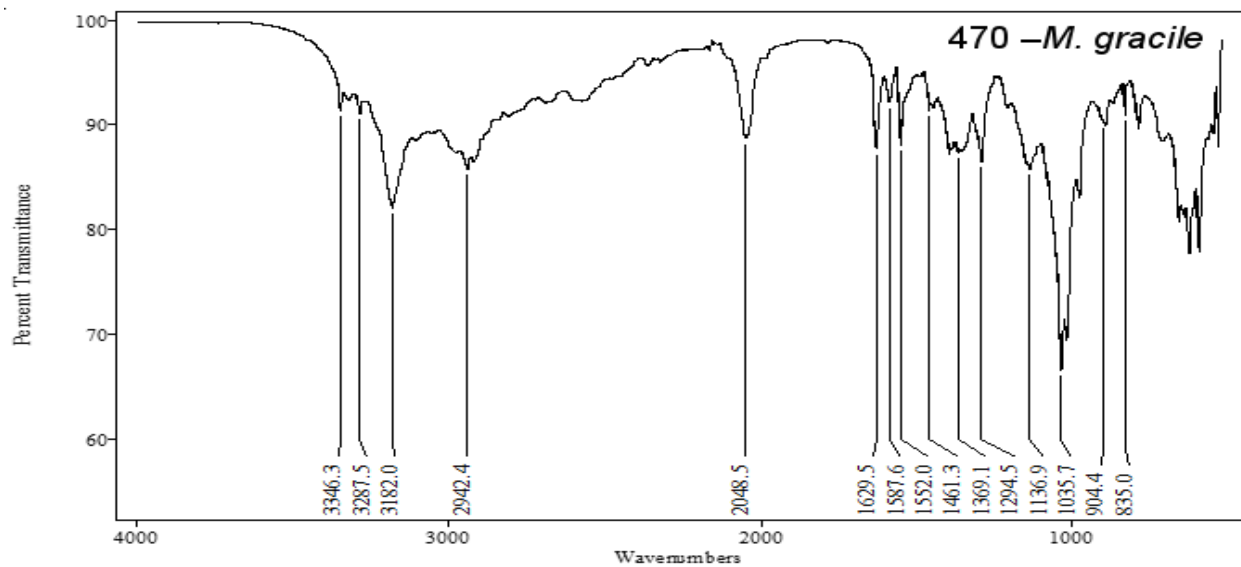
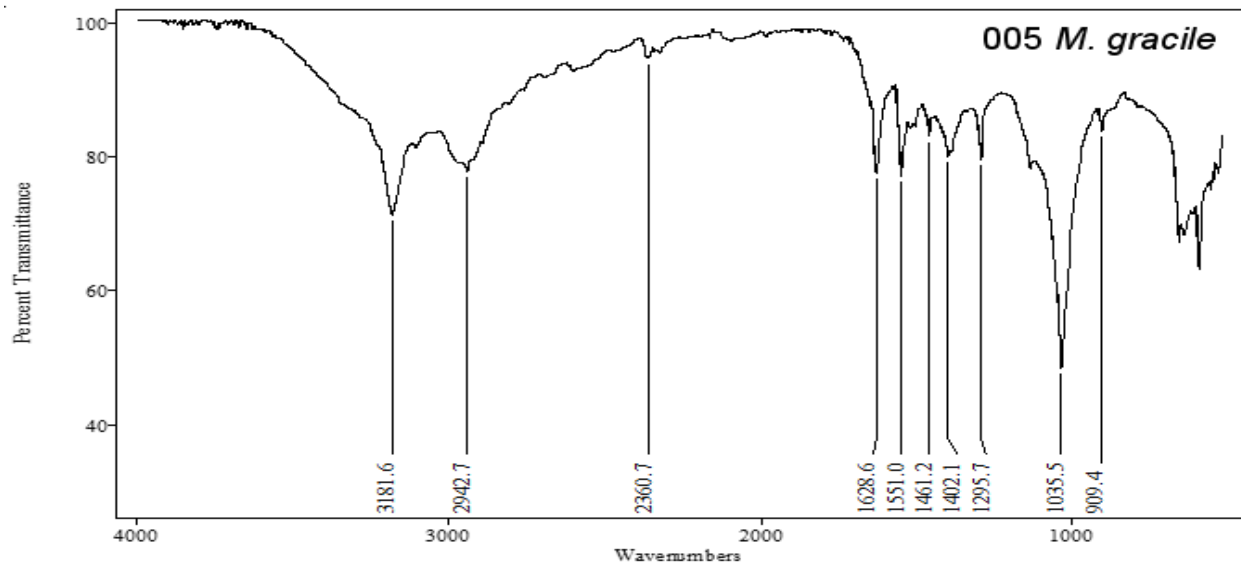
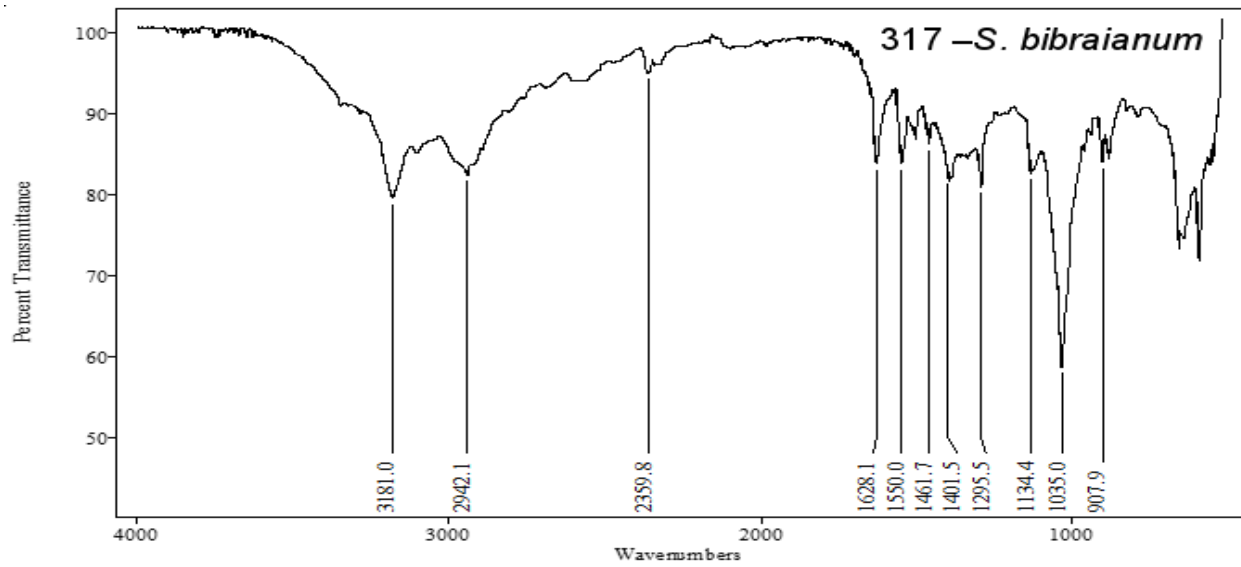
Glc Nac															
	T-glc nac	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1-4 glc nac	0	0	100	trace	0	0	100	trace	100	1.1	100	trace	trace	tace
	Total	0	0	100	trace	0	0	100	trace	100	1.1	100	trace		
Gal Nac															
	T-gal nac	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1-4 gal nac	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1-4,6 gal nac	100	trace	0	0	0	0	0	0	100	1.1	0	0	0	0
	Total	100	trace	0	0	0	0	0	0	100	1.1	0	0	0	0

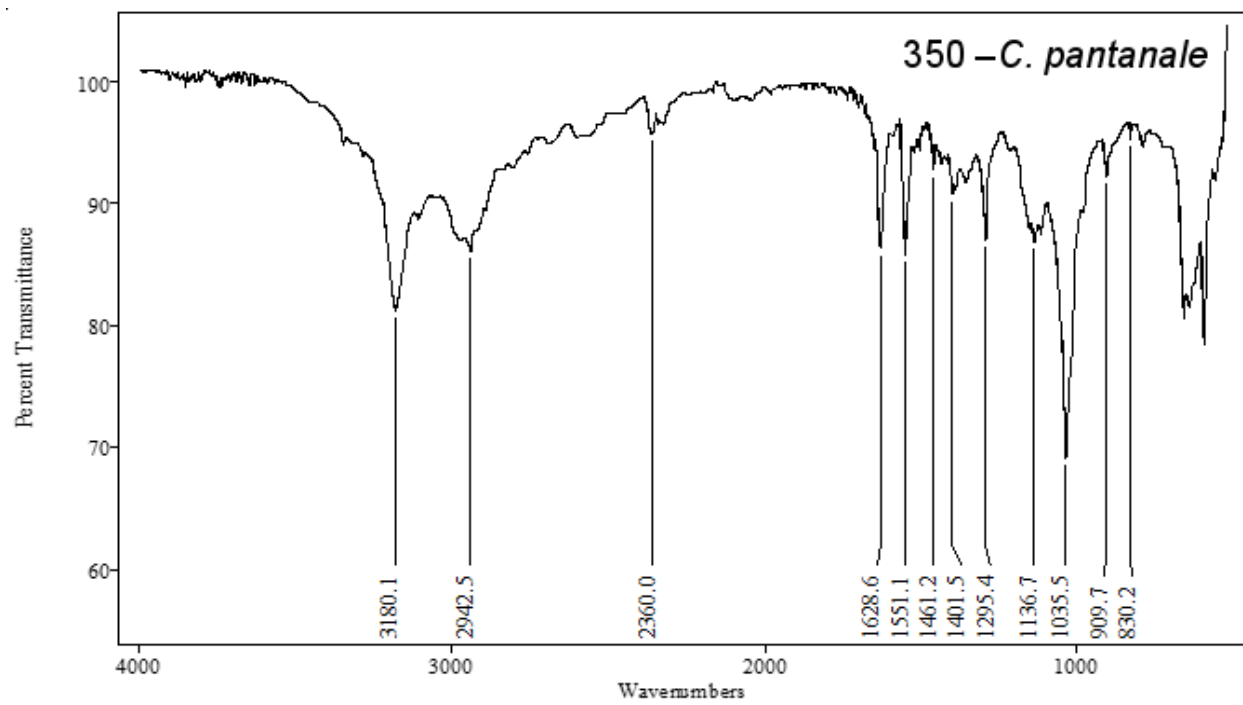
Análise estrutural por FT-IR. A análise estrutural do polissacarídeo das algas estudadas pode ser observada na Figura 2.1. Os resultados mostram características comuns ao esperado para polissacarídeos, principalmente se compararmos com os dados obtidos para *Ankistrodesmus* (capítulo 1). O EPS de todas as espécies apresentou um padrão de bandas próximo à região de 3200 cm⁻¹ pertencente à vibração de alongamento da hidroxila no polissacarídeo. A banda de absorção no intervalo de 3200-2800 cm⁻¹ foi devida à vibração de alongamento da ligação de C-H. Todos os polissacarídeos apresentaram uma absorbância na região de 1200-950 cm⁻¹, sendo que a banda de absorção na porção de 1035cm⁻¹ é sugestiva de que o monossacarídeo apresente um anel de piranose (Sheng *et al*, 2007). A região entre 950-750, denominada *fingerprint* (Mathlouthi & Koenig, 1986) apresentou uma absorção na porção 909 em quatro espécies: *S. bibrainum* – 047 e 317; *M. gracile* – 005; e *C. pantanale* – 350; duas espécies apresentaram absorção na porção 894: *S. bibrainum* – 125; e *M. gracile* – 470; e uma espécie apresentou banda de absorção em 879: *S. bibrainum* -168. Isso se deve a posição diferente do C-H ligado a diferentes carbonos.

Selenastrum bibrainum (125), *Curvastrum pantanale* (350) e *Messastrum gracile* (470) apresentaram picos de absorbância na região próximo a 1390, 1150 e 830 correlacionado a presença de S = O (Tipson, 1968; Barker *et al.* 1956) e grupo sulfato (C-O-S) no carbono terciário na posição equatorial do anel (Harris & Turkey, 1970).

Figura 2.1. Espectros de infravermelho (FT-IR) dos polissacarídeos extracelulares para as diferentes cepas/espécies de *Selenastrum/Messastrum/Curvastrum*







Similaridade entre os polissacarídeos de Selenastrum, Messastrum e Curvastrum.

Analisando a Figura 2.2, utilizando os monômeros constituintes, podemos observar que duas espécies de *M. gracile* (005 e 470) apresentaram um alto grau de similaridade. É interessante notar que a espécie de *S. bibraianum* não apresentaram um alto grau de similaridade, sendo que a similaridade entre *S. bibraianum* (047) e *S. bibraianum* (317) foi baixa. *Selenastum bibraianum* (125) apresentou uma boa similaridade com as espécies de *Messastrum* e *Selenastum bibraianum* (168), também apresentou uma boa similaridade com as espécies de *Messastrum*. *C. pantanale* foi a alga estudada que apresentou a menor similaridade comparativa com as demais espécies estudadas, seguida por *Selenastrum bibraianum* (047) que apresentou baixa similaridade com as demais espécies.

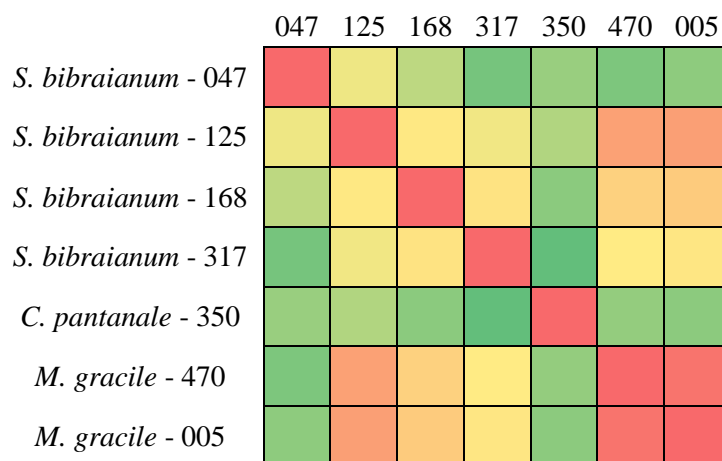


Figura 2.2. *Heatmap* de similaridade entre as espécies de *Selenastrum*, *Messastrum* e *Curvastrum* utilizando os monômeros constituintes (vermelho = maior similaridade; verde = menor similaridade)

Analisando-se a Figura 2.3, utilizando as ligações glicosídicas, observa-se que as duas cepas de *Messastrum gracile* (005 e 470) apresentaram um alto grau de similaridade. De uma maneira geral as cepas de *Messastrum* estudadas apresentaram uma boa similaridade em relação com as outras espécies estudadas, com exceção de *C. pantanale*, a qual apresentou uma baixa similaridade não só com as espécies de *Messastrum*, mas também com as demais espécies

estudadas. É interessante notar que as cepas de *S. bibraianum* (047) e *S. bibraianum* (125) apresentaram uma similaridade baixa para as ligações glicosídicas, diferentemente do que foi mostrado para monômeros que apresentaram uma similaridade média.

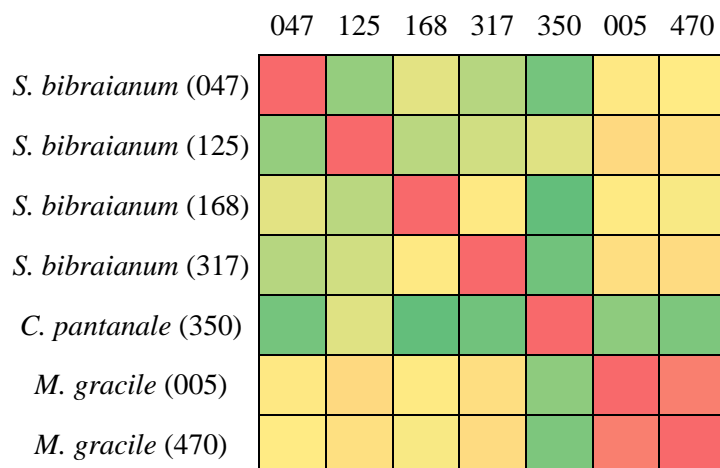


Figura 6. Heatmap de similaridade entre as cepas de *Selenastrum bibraianum*, cepas de *Messastrum gracile* e a espécie *Curvastrum pantanale* utilizando as ligações glicosídicas. (vermelho = maior similaridade; verde = menor similaridade)

2.4 Discussão

Os EPSs produzidos pelas diferentes algas do gênero *Selenastrum*, *Messastrum* e *Curvastrum* diferem na composição monomérica e ligações glicosídicas. De fato, a dificuldade em encontrar representantes de alguma das espécies estudadas para a comparação já mostra a importância na caracterização do EPS para essas espécies.

Os monossacarídeos mais frequentemente encontrados para as Chlorophyceae, em geral, são galactose, xilose, arabinose, fucose, ramnose e manose (Allard & Casadevall 1990, Metzger *et al* 1990). Esse padrão de monossacarídeos aparece em *S. bibraianum* (047) e *M. gracile* (005),

com os monômeros predominantes sendo: fucose, galactose e ramnose; e manose, fucose e galactose, respectivamente.

As outras espécies deste grupo apresentaram glicose juntamente com outros monômeros e Paulsen & Vieira (1994) já haviam observado a presença de glicose como monômero frequente para outro grupo de algas verdes, a desmídia *Spondilosium panduriforme*, enquanto Mishra & Jha (2009) encontraram a presença de glicose para *Dunaliella salina* e Lewin (1956) já havia mostrado a presença de glicose e xylose como monômeros predominantes para *Chlamydomonas ulvaënsis*. É importante destacar que em *S. bibrainum* (168) e *S. bibraianum* (317) apresentaram o monômero glicose como o mais comum na cadeia polissacarídica.

Assim como observado no capítulo 1 para o gênero *Ankistrodesmus*, a análise bioquímica mostra que o EPS é único para as diferentes espécies (Figura 2.2), podemos observar que as duas espécies de *Messastrum gracile* apresentaram uma alta similaridade, juntamente com uma espécie de *Selenastrum bibraianum* (125), enquanto as cepas de *S. bibraianum* apresentaram uma similaridade mais baixa dentro da espécie, o que nos leva a supor que existe uma diversidade bioquímica notável entre as espécies do mesmo gênero, entre os diferentes gêneros e mesmo entre cepas da mesma espécie analisados. Essas características de diferenciação bioquímica foram notadas por Kiemle *et al* (2007) para algumas espécies de desmídias.

As ligações glicosídicas também apresentaram um padrão único e um elevado grau de diversidade entre as diferentes cepas de *Selenastrum*, *Messastrum* e *Curvastrum pantanale* (Figura 2.3). Novamente, como observado para os monômeros, as duas espécies de *Messastrum* apresentaram um alto grau de similaridade, e da mesma maneira a cepa se *S. bibraianum* (125) apresentou uma similaridade média com essas espécies. As cepas de *S. bibraianum* novamente não

apresentaram um alto grau de similaridade e, diferente do encontrado para os monômeros, as cepas *S. bibraianum* (125) e *S. bibraianum* (047) apresentaram baixo grau de similaridade.

Observando a Tabela 2.3 é possível notar que a predominância das ligações glicosídicas, geralmente, se encontra em apenas um tipo de ligação: *S. bibraianum* (047) apresentou T-galactose (21.7%), *S. bibraianum* (125) apresentou T-glicose (16.4%); *S. bibraianum* (168 e 317) apresentaram 1-4 glicose (28% e 25%); *C. pantanale* (350) apresentou 1-3 manose (23.8%). *M. gracile* (005 e 470) apresentaram duas ligações glicosídicas predominantes: 1-2 manose (18.9% e 16.8%) e T-glicose (16.1% e 14.8%) respectivamente.

Os monômeros terminais predominantes para *Selenastrum*, *Curvastrum* e *Messastrum* foram basicamente T-galactose e T-glicose. Esses monômeros apresentam alta afinidade na ligação de hidrogênio da água formando um modelo específico de interação (Tait *et al*, 1972), impedindo uma maior aglutinação das colônias através da presença de uma porção hidrofílica nessa região.

A presença de 1-4 glicose como ligação predominante no polissacarídeo de *S. bibraianum* (168 e 317) gera uma geometria levemente ondulada e com dupla simetria que interage com as cadeias paralelas (Atkins, 1985), formando um polissacarídeo alongado e direto, com poucas ramificações, assim como a presença de 1-3 manose em *C. pantanale*, e 1-2 manose em *M. gracile* também forma o mesmo tipo de geometria, porém com diferenciação no ângulo de formação.

Como observado no capítulo 1 para o gênero *Ankistrodesmus* a presença de elevada porcentagem do monômero fucose, em diferentes ligações glicosídicas, pode nos dar indícios das propriedades hidrofóbicas dos polissacarídeos das algas estudadas (Wustman *et al* 1998; Hu *et al* 2003). Na observação das ligações glicosídicas (Tabela 2.3) e comparando com as análises de

infravermelho (Figura 2.1), podemos notar que a proporção de pontos de ramificação é maior do que a presença de pontos terminais, o que pode ser indicativo de presença de éster sulfato na composição do carboidrato (Chiovitty *et al.* 2003). Essa observação pode ser considerada verdadeira para as algas *Selenastrum bibraianum* (125 e 168), *Messastrum gracile* (470) e *Curvastrum pantanale* (350).

É interessante notar que em três cepas estudadas, *Selenastrum bibraianum* – 047 e 317; *Messastrum gracile* – 005, apresentaram picos característicos de grupos carboxílicos (1550, 1461 e 1402) (Figura 2.1), indicando um polissacarídeo ácido (Shang *et al.* 2013). Esses resultados diferem do achado para CG-MS, o qual mostrou a presença de ácidos urônicos apenas na composição de *S. bibraianum* (317).

Os ésteres sulfatos encontrados para os polissacarídeos das algas analisadas neste capítulo diferem ligeiramente dos encontrados para *Ankistrodesmus* (capítulo 1). Enquanto *Ankistrodesmus* apresentou sulfato no carbono secundário do anel, as algas deste capítulo apresentaram sulfatação no carbono terciário do anel. A porção de C-H característica de polissacarídeo, no *finger print* (Mathlouthi & Koenig, 1986), apresentou diferenciação entre as espécies estudadas, *S. bibraianum* (125) e *M. gracile* (470) apresentaram C-H anomérico, enquanto *S. bibraianum* (168) apresentou C-H equatorial (Barker *et al.*, 1954).

Os dados apresentados nesse capítulo mostram que o EPS de *Selenastrum*, *Messastrum* e *Curvastrum* se apresentam como um heteropolissacarídeo, menos ramificado do que o apresentado para *Ankistrodesmus* (capítulo 1) e com a presença de sulfato na composição. Percival (1978, 1979) mostrou que o EPS de algumas Chlorophyta apresenta o padrão encontrado para as algas estudadas neste capítulo.

Kloreg & Quatrano (1988) mostraram que a presença de grupos sulfatados é comum para algas marinhas, sendo raro para algas de água doce, porém, como a descrição de polissacarídeos extracelulares de algas de água doce ainda é muito raro, podemos achar novas espécies com a presença de grupos sulfatados.

2.5 Conclusão

Este capítulo mostra a importância da caracterização dos polissacarídeos extracelulares de microalgas de água doce. Não foi encontrado na literatura qualquer descrição proposta para esses grupos estudados. Esta pesquisa mostrou a complexidade do polissacarídeo de *Selenastrum*, *Messastrum* e *Curvastrum* oferecendo um ponto de partida para a determinação estrutural, localização estratégica e isolamento de certas especificidades do polímero.

A diversidade de EPS também foi suficiente para mostrar que ocorre discriminações entre as espécies e cepas dos gêneros estudados neste capítulo, porém as cepas de *S. bibrainum* apresentaram diferenças significativas. Já as cepas de *M. gracile* apresentaram um alto grau de adesão. Apesar de não ser possível inferir sobre a filogenia desse “complexo” *Selenastrum/Messastrum/Curvastrum* é possível observar que espécies diferentes podem apresentar variações estruturais que possam nos dar subsídios para uma abordagem quimiotaxonômica dentro desses grupos.

CAPÍTULO 3. COMPOSIÇÃO DO POLISSACARÍDEO EXTRACELULAR PRODUZIDO POR DIFERENTES
ESPÉCIES DE *MONORAPHIDIUM* (SELENASTRACEAE, CHLOROPHYTA)

3.1 Objetivo

O objetivo deste estudo foi caracterizar o polissacarídeo extracelular de espécies de *Monoraphidium* através da composição monomérica, ligações glicosídicas, possíveis radicais e as estruturas constituintes de cinco espécies de *Monoraphidium*, discutindo a relação que os polissacarídeos apresentam entre si, verificar a possibilidade de discriminação das diferentes espécies de *Monoraphidium* e auxiliar na filogenia da família Selenastraceae.

3.2 Materiais e Métodos

Organismos. Foram analisados os EPS de 5 espécies do gênero *Monoraphidium*. Os organismos utilizados no trabalho (Tabela 3.1) foram isolados de diferentes locais do Brasil e estão sendo mantidos em cultivo axênico na coleção de Culturas de Microalgas de Água Doce do Departamento de Botânica da Universidade Federal de São Carlos (WDCM 835) com os códigos indicados para cada alga.

Tabela 3.1. Espécies de *Monoraphidium* utilizadas no trabalho

Espécie	Descrição	Cepa	Local de Isolamento	Ano	GPS
<i>Monoraphidium arcuatum</i>	(Korshikov) Hinák 1970	024	Itirapina - SP	1979	22°12'20.6"S 47°52'37.6"W
<i>Monoraphidium griffithii</i>	(Berkeley) Komárková- Legnerová 1969	176	Jataí – SP	1993	21°36'28.5"S 47°46'13.1"W
<i>Monoraphidium contortum</i>	Komárková- Legnerová 1969	306	São Paulo - SP	2010	23°44'04.3"S 46°45'44.4"W
<i>Monoraphidium pseudobraunii</i>	(Belcher & Swale) Heyning 1979	325	Porto Velho - RO	2011	8°35'17.9"S 63°37'12.3"W
<i>Monoraphidium komarkovae</i>	Nygaard 1979	353	Aquidauana - MS	2011	19°20'29.0"S 55°43'40.0"W

Os procedimentos condições de cultivo, obtenção do EPS, caracterização do EPS, composição monomérica, ligações glicosídicas, análise dos polissacarídeos por espectrometria de infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR), foram pormenorizadas no capítulo 1.

3.3 Resultados

Composição monomérica.

Os EPS das espécies estudadas apresentam composição monomérica semelhante (Tabela 3.2). As espécies, no entanto, apresentaram diferentes monômeros principais em sua cadeia, sendo que em nenhuma das cinco espécies houve repetição nos monômeros principais (Tabela 3.2).

M. griffithii apresentou um polissacarídeo com quase a metade de sua constituição composta apenas por glicose (48.3%), seguido por uma alta concentração de n-acetil-glicosamina (9.9%) e xylose (9.7%).

M. contortum apresentou um polissacarídeo bem mais homogêneo, mesmo com alta contribuição de glicose (33%), ácido glicurônico (25.3%) e xylose (15.1%). É interessante notar a ausência do monômero galactose na cadeia desse polissacarídeo.

M. komarkovae foi a única que apresentou a cadeia composta principalmente do monômero ramnose (metilpentose ou deoxihexose), que contribuiu com 33.8% dos monômeros observados, seguido por fucose (15.6%) e galactose (14.1%). *M. arcuatum* foi a espécie com o polissacarídeo mais homogêneo entre as algas estudadas, apresentou 24.1% de glicose, 19% de manose e 11.9% de ácido glicurônico.

M. pseudobraunii apresentou um polissacarídeo bem diferenciado com alta presença de glicose (32.1%), ácido glicurônico (26.6%) e manose (24.7%). Esses três monômeros contribuíram com quase 84% da cadeia para esse polissacarídeo.

Tabela 3.2. Composição monomérica expressa em porcentagem (%) do carboidrato total dos polissacarídeos extracelulares para as diferentes espécies de *Monoraphidium*. GLUCAACID = Ácido glicurônico; GALACID = Ácido Galacturônico; GLCNAC = n-acetil-glicosamina; GLANAC = n-acetil-galactosamina

	XYLOSE	FUCOSE	ARABINOSE	RAMNOSE	MANOSE	GLUCOSE	GALACTOSE	GLUCACID	GALACID	GLCNAC	GLANAC
<i>M. griffithii</i> (176)	9.7	4.1	0	8.5	8.8	48.3	6.3	4.2	0	9.9	trace
<i>M. contortum</i> (306)	15.1	7.9	0	6.2	7.7	33	0	25.3	0	3.7	1.1
<i>M. komarkovae</i> (353)	7.6	15.6	0	33.8	2.8	12.6	14.1	7.6	0	5.9	0
<i>M. arcuatum</i> (024)	10.1	8.3	0	12.9	19	24.1	10.6	11.9	0	2.6	trace
<i>M. pseudobraunii</i> (325)	7.7	3.3	0	0	24.7	32.1	0	26.6	0	2.3	3.3

Análise das ligações glicosídicas.

A metilação do polissacarídeo das algas pertencentes ao gênero *Monoraphidium*, assim como mostrado para os monômeros, apresentaram uma grande variedade de ligações glicosídicas principais (Tabela 3.3). É interessante notar que novamente os representantes desse gênero não evidenciaram homogeneidade em relação as ligações glicosídicas principais e cada uma das algas exibiu ligações principais diferentes entre si (Tabela 3.3).

M. griffithii apresentou um polissacarídeo composto basicamente de ligações de glicose (fato observado por CG-FID), sendo que a ligação 1-3 glicose foi a mais abundante (41.8%) de representatividade na cadeia. Apesar de algumas outras algas também se apresentarem pouco homogêneas em relação às ligações, nenhuma delas exibiu uma cadeia com uma ligação tão frequente.

M. contortum também mostrou uma elevada porcentagem de 1-3 glicose (27.3%), sendo a ligação glicosídica mais frequente para essa espécie. É interessante observar a alta quantidade de 1-4 ácido glicurônico (24.2%), como a segunda ligação mais frequente.

M. komarkovae evidenciou um polissacarídeo composto basicamente por ligações glicosídicas de ramnose. 1-2 ramnose apresentou 19% de porcentagem na cadeia, sendo a ligação mais abundante, seguida por T-galactose (11.7%) e T-ramnose (9.9%).

M. arcuatum, novamente, foi a alga mais homogênea, não mostrando concentrações maiores do que 10% em nenhuma ligação. A ligação glicosídica mais abundante foi 1-4 ácido glicurônico (9.4%), seguido por 1-4 glicose (9%) e 1-3 manose (7.8%)

M. pseudobraunii mostrou apenas 12 tipos diferentes de ligação glicosídica e concentrando sua composição em três ligações principais: 1-4 ácido glicurônico (26.6%), 1-4 glicose (23.6%) e 1-3 manose (23.6%).

Ressalte-se que apesar das grandes diferenças de concentração entre as ligações glicosídicas, *M. arcuatum* e *M. pseudobraunii* apresentaram as mesmas ligações principais na sua cadeia, porém as três ligações principais contribuem com 26.2% na cadeia para *M. arcuatum*, enquanto para *M. pseudobraunii* a contribuição é de 73.8%.

Tabela 3.3. Ligações Glicosídicas encontradas para o gênero *Monoraphidium* (% M = mesmo monossacarídeo e % T = total presente) (T= posição terminal no EPS).

Monosaccharide	linkage	<i>M. griffithii</i> (176)		<i>M. contortum</i> (306)		<i>M. komarkovae</i> (353)		<i>M. arcuatum</i> (024)		<i>M. pseudobraunii</i> (325)	
		(%M)	(%T)	(%M)	(%T)	(%M)	(%T)	(%M)	(%T)	(%M)	(%T)
Xylose	T-xyl	40.2	3.9	32.5	4.9	0	0	73.2	7.4	81.8	6.3
	1-2 xyl	0	0	0	0	0	0	14.9	1.5	0	0
	1-3 xyl	22.7	2.2	0	0	36.8	2.8	0	0	0	0
	1-4 xyl	37.1	3.6	67.5	10.2	63.2	4.8	11.9	1.2	18.2	1.4
	Total	100	9.7	100	15.1	100	7.6	100	10.1		7.7
Fucose	T-fuc	0	0	0	0	16	2.5	13.3	1.1	0	0
	1-2 fuc	0	0	16.5	1.3	0	0	14.4	1.2	0	0
	1-3 fuc	31.7	1.3	20.2	1.6	32.7	5.1	28.9	2.4	63.6	2.1
	1-4 fuc	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1-3,4 fuc	31.7	1.3	0	0	12.2	1.9	0	0	0	0
	1-2,3 fuc	36.6	1.5	63.3	5	39.1	6.1	43.4	3.6	36.4	1.2
	1-2,4 fuc	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Total	100	4.1	100	7.9	100	15.6	100	8.3	100	3.3	
Arabinose	T-ara	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1-2 ara (f)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Total	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ramnose	T-rha	14.1	1.2	25.8	1.6	29.3	9.9	0	0	0	0
	1-2 rha	20	1.7	0	0	56.2	19	50.4	6.5	0	0
	1-3 rha	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1-4 rha	38.8	3.3	0	0	0	0	19.4	2.5	0	0
	1-2,3 rha	0	0	0	0	9.2	3.1	0	0	0	0
	1-2,4 rha	27.1	2.3	74.2	4.6	5.3	1.8	16.3	2.1	0	0
	1-3,4 rha	0	0	0	0	0	0	13.9	1.8	0	0
Total	100	8.5	100	6.2	100	33.8	100	12.9	0	0	
Manose	T-man	14.8	1.3	19.5	1.5	47.8	1.1	11.1	2.1	4.5	1.1
	1-2 man	0	0	32.5	2.5	52.2	1.2	0	0	0	0
	1-3 man	85.2	7.5	0	0	0	0	41.1	7.8	95.5	23.6
	1-4 man	0	0	16.9	1.3	0	0	14.2	2.7	0	0
	1-6 man	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

	1-2,3 man	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1-3,4 man	0	0	0	0	0	0	26.8	5.1	0	0
	1-2,6 man	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1-3,6 man	0	0	31.1	2.4	0	0	6.8	1.3	0	0
	1-2,3,4 man	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1-2,4,6 man	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Glucose	total	100	8.8	100	7.7	100	2.3	100	19	100	24.7
	T-glu	4.6	2.2	7.3	2.4	8.7	1.1	8.7	2.1	3.4	1.1
	1-2 glu	0	0	0	0	0	0	7.5	1.8	0	0
	1-3 glu	86.5	41.8	82.7	27.3	0	0	25.3	6.1	0	0
	1-4 glu	0	0	0	0	48.4	6.1	37.3	9	73.5	23.6
	1-6 glu	0	0	0	0	8.7	1.1	7	1.7	0	0
	1-2,3 glu	4.3	2.1	0	0	0	0	4.6	1.1	0	0
	1-2,4 glu	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1-3,4 glu	4.6	2.2	10	3.3	23	2.9	4.6	1.1	23.1	7.4
	1-3,6 glu	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1-4,6 glu	0	0	0	0	11.1	1.4	5	1.2	0	0
	1-2,3,4 glu	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1-2,3,6 glu	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1-3,4,6 glu	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Galactose	total	100	48.3	100	33	100	12.6	100	24.1	100	32.1
	T-gal	22.2	1.4	0	0	83	11.7	38.7	4.1	0	0
	T-gal f	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1-2 gal	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1-4 gal	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1-3 gal	36.5	2.3	0	0	17	2.4	39.6	4.2	0	0
	1-6 gal	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1-6 gal f	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1-2,3 gal	41.3	2.6	0	0	0	0	21.7	2.3	0	0
	1-2,6 gal	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1-3,6 gal	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1-4,6 gal	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1-2,3,4 gal	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Glc Acid	total	100	6.3	0	0	100	14.1	100	10.6	0	0
	T-glc acid	0	trace	4.3	1.1	26.3	2	21	2.5	0	0
	1-4 glc acid	100	4.2	95.7	24.2	73.7	5.6	79	9.4	0	26.6
	Total	100	4.2	100	25.3	100	7.6	100	11.9	100	26.6

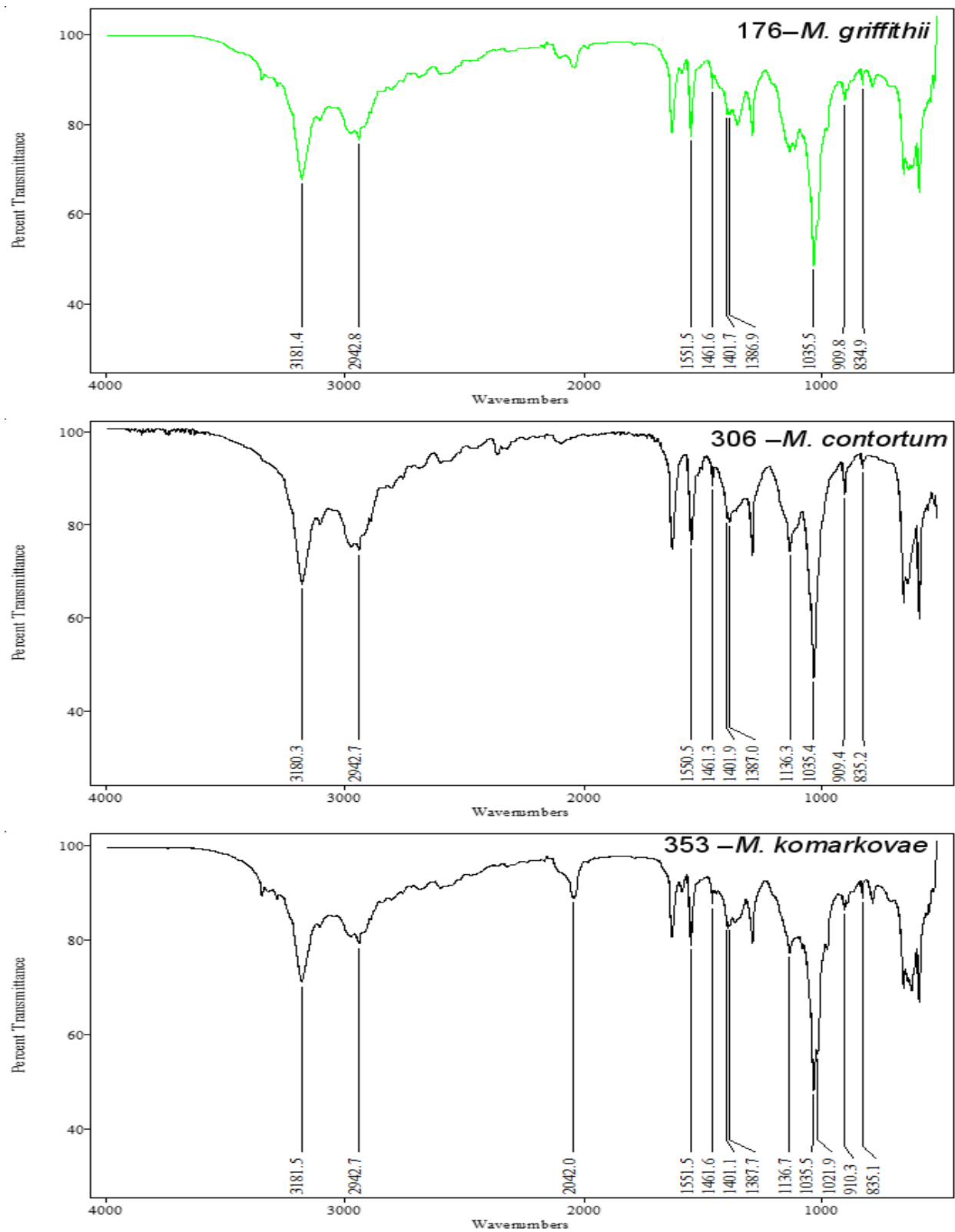
<hr/>											
Gal Acid	T-gal acid	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1-4 gal acid	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Total	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Glc Nac	T-glc nac	0	0	0	0	0	0	0	trace	0	0
	1-4 glc nac	100	9.9	100	3.7	100	5.9	100	2.6	100	2.1
	Total	100	9.9	100	3.7	100	5.9	100	2.6	100	2.1
Gal Nac	T-gal nac	0	0	100	1.1	0	0	0	0	100	3.3
	1-4 gal nac	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1-4,6 gal nac	100	trace	0	0	0	0	100	trace	0	0
	Total	100	trace	100	1.1	0	0	100	trace	100	3.3
<hr/>											

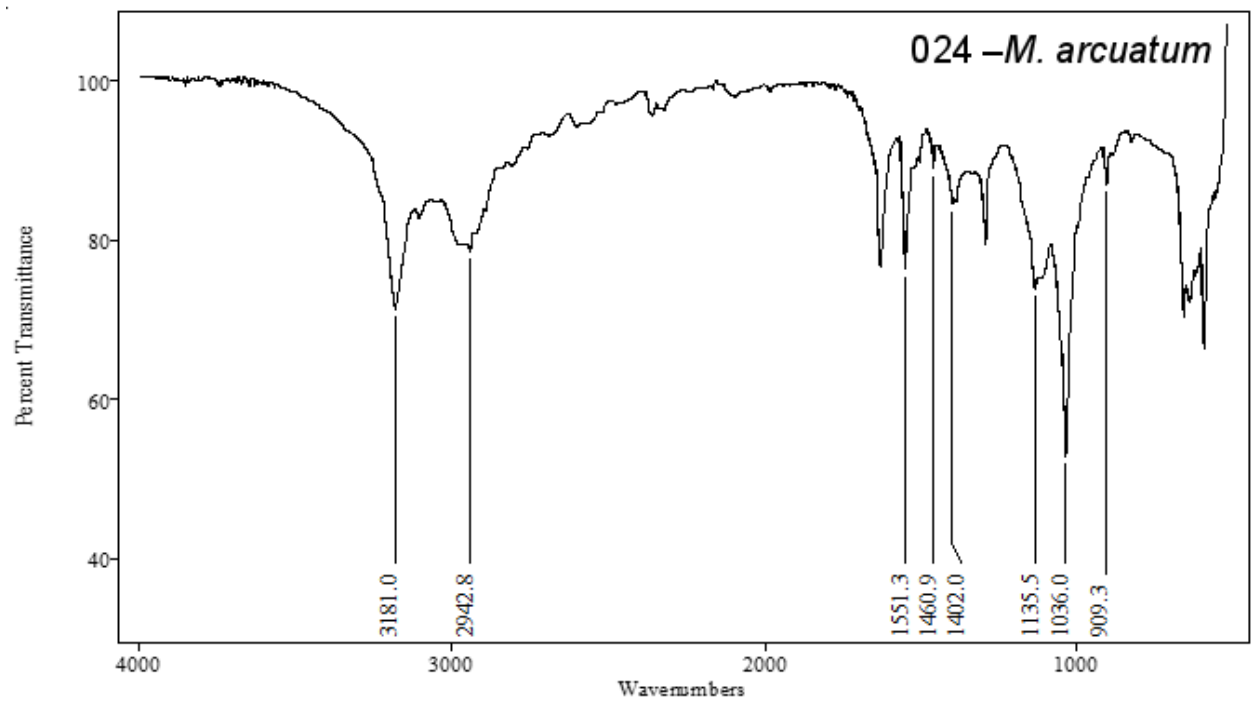
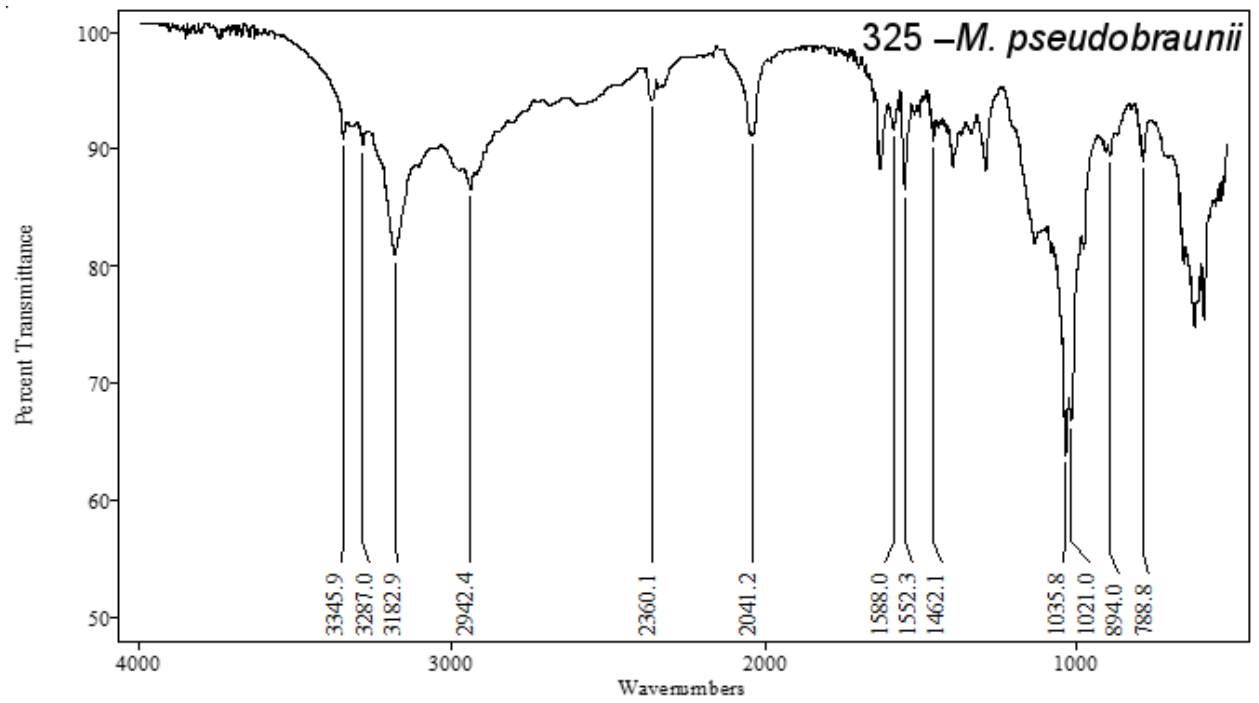
Análise estrutural por FT-IR. Os resultados apresentados na Figura 3.1, mostram características comuns ao esperado para polissacarídeos e apresentam semelhanças ao encontrado para *Ankistrodesmus* (capítulo 1) e para *Selenastrum/Messastrum/Curvastrum* (capítulo 2). O EPS de todas as espécies apresentou um padrão de bandas próximo à região de 3200cm^{-1} pertencente à vibração de alongamento da hidroxila no polissacarídeo. A banda de absorção no intervalo de $3200\text{-}2800\text{ cm}^{-1}$ foi devido à vibração de alongamento do C-H. Todos os polissacarídeos apresentaram uma absorbância na região de $1200\text{-}950\text{ cm}^{-1}$, sendo que a banda de absorção na porção de 1035cm^{-1} é sugestiva de que o monossacarídeo apresenta um anel de piranose (Sheng *et al.*, 2007). A região entre $950\text{-}750$, denominada *fingerprint* (Mathlouthi & Koenig, 1986) apresentou uma absorção na porção 909 em quatro das cinco espécies (*M. griffithii*, *M. contortum*, *M. komarkovae*, *M. arcuatum*), apenas *M. pseudobraunii* apresentou absorção na porção 894.

Como já esperado, todas as algas apresentaram pico característico de grupos carboxílicos (1550 , 1461 e 1402), mostrando um polissacarídeo ácido (Shang *et al.* 2013). Esse resultado vai de encontro ao observado por CG-FID e CG-MS, os quais demonstraram alta presença de ácidos urônicos na composição dessas algas.

A análise estrutural das ligações mostrou que três espécies (*M. griffithii*, *M. contortum* e *M. komarkovae*) apresentaram absorbância na região próximo a 1390 e 830 correlacionado a presença de S=O (Tipson, 1968; Barker *et al.* 1956) e grupo sulfato (C-O-S) no carbono terciário na posição equatorial do anel (Harris & Turkey, 1970).

Figura 3.1. Espectros de infravermelho (FT-IR) dos polissacarídeos extracelulares para as diferentes espécies de *Monoraphisidium*





Similaridade entre os polissacarídeos de Monoraphidium. Os padrões de similaridade entre os polissacarídeos podem ser visualizados no *heatmap* da Figura 3.2 e da Figura 3.3.

Analisando a Figura 3.2 e utilizando os monômeros constituintes, podemos observar que apenas a espécie *M. arcuatum* apresenta similaridade com outras espécies, principalmente com *M. contortum*. Isso já era esperado, uma vez que *M. arcuatum* apresentou o polissacarídeo mais homogêneo entre as algas desse grupo.

É notável observar que *M. komarkovae* foi a alga que apresentou menor similaridade quando comparada com as outras espécies do grupo, isso se deve principalmente porque essa alga apresentou maior concentração de pentose (metilpentose), que comparada com as outras espécies haviam mostrado uma maior concentração de hexoses.

Outro fator importante que pode ser destacado é o baixo grau de similaridade entre *M. komarkovae* e *M. pseudobraunii*, muito definido pela falta de monômeros ramnose e galactose em *M. pseudobraunii*, os quais são os principais para *M. komarkovae*.

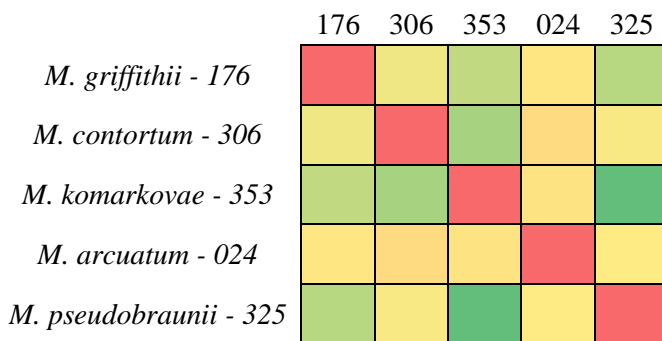


Figura 3.2. *Heatmap* de similaridade entre as espécies de *Monoraphidium* utilizando os monômeros constituintes (vermelho = maior similaridade; verde = menor similaridade)

Analisando a Figura 3.3, utilizando-se as ligações glicosídicas, conseguimos perceber um incremento no grau de similaridade entre as espécies.

Diferentemente do encontrado para os monômeros, *M. griffithii* foi a espécie que apresentou a maior similaridade em relação às outras espécies, enquanto *M. arcuatum*, que havia apresentando o maior grau de similaridade para os monômeros, apresentou similaridade, e somente média, apenas com *M. griffithii*. De fato, *M. arcuatum* apresentou baixo grau de similaridade com *M. komarkovae* e com *M. pseudobraunii*, sendo que para os monômeros havia sido notada uma similaridade média.

A única semelhança encontrada comparando as duas similaridades diz respeito a baixa similaridade de *M. pseudobraunii* e *M. komarkovae*, e mesmo assim para as ligações glicosídicas essas diferenças foram menores do que encontrado para *M. arcuatum* – *M. komarkovae* e *M. arcuatum* – *M. pseudobraunii*.

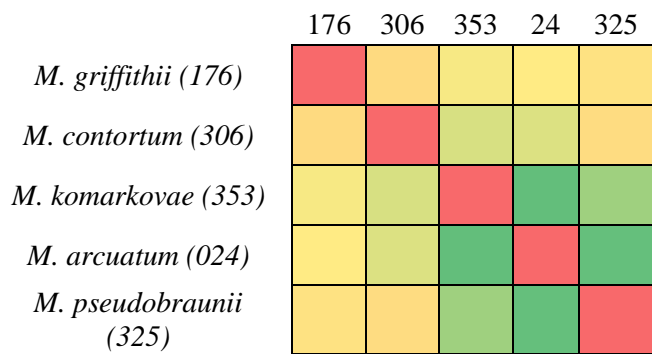


Figura 3.3. Heatmap de similaridade entre as espécies de *Monoraphidium* utilizando as ligações glicosídicas (vermelho = maior similaridade; verde = menor similaridade)

3.4 Discussão

O EPS produzido pelas diferentes algas do gênero *Monoraphidium* apresentaram diferenças significativas em sua composição monomérica. Apesar das diferenças significativas entre os monômeros, a abundância relativa dos mesmos não difere dos encontrados por Paulsen *et al* (1998) para *Ankistrodesmus densus* e por Lombardi & Vieira (1999) para *Kirchneriella aperta*.

A presença de monômeros ácidos, em quantidade significativa, já havia sido observado por Lombardi & Vieira (1999) para *Kirchneriella aperta*, e por Blumriesinger *et al* (1983) foi encontrada uma variação de 1-24% de ácidos urônicos para *Monoraphidium*.

Os monossacarídeos mais frequentes encontrados para as Cholorophyceae são galactose, xylose, arabinose, fucose, ramnose e manose (Allard & Casadevall 1990, Metzger *et al* 1990). Assim como apresentado nos capítulos anteriores esse padrão se repetiu somente para *M. komarkovae*, as demais espécies apresentaram alta concentração de glicose como monômero predominante. Paulsen & Vieira (1994) encontraram glicose para *Spondilosium panduriforme*; Mishra & Jha (2009) para *Dunaliella salina*; e Lewin (1956), para *Chlamydomonas ulvaënsis*. Entretanto, em nenhum desses estudos foi observado uma porcentagem tão grande de glicose.

Analisando a Tabela 3.2 em comparativo com a matriz de similaridade da Figura 1.2, podemos observar que os monômeros se apresentaram divergentes entre as espécies. Somente a espécie de *M. arcuatum* apresentou similaridade com todas as outras espécies. Entretanto, para esse grupo não foi verificado uma alta similaridade. O baixo grau de similaridade pode nos dar indicio da diferenciação que esse gênero apresenta entre si, mostrando que provavelmente o polissacarídeo possa sim apresentar características específicas para cada espécie. Percival (1979), propôs a diferenciação de algas pertencentes às Ulvophyceae seguindo critérios de diferenciação entre os monômeros.

As ligações glicosídicas (Tabela 3.3) mostraram uma maior acentuação nos padrões de diversidade, exemplo disso é a presença de apenas 12 ligações glicosídicas para o polissacarídeo de *M. pseudobraunii*, comparado com 31 ligações glicosídicas para *M. arcuatum*. Mesmo com uma maior quantidade de ligações glicosídicas presentes, *M. arcuatum* não apresentou alta similaridade com todas as espécies, apresentando baixa similaridade com *M. komarkovae* e *M.*

pseudobraunii. Por outro lado, *M. griffithii* foi a espécie com maior grau de similaridade com as outras espécies selecionadas.

Observando a Tabela 3.3 podemos notar a predominância de ligações terminais na maioria das espécies: *M. griffithii* com 10% de ligações terminais; *M. contortum* com 12.6%; *M. arcuatum* com 19.3%; *M. komarkovae* com 28.3%; e *M. pseudobraunii* com 38.4%.

Como já fora descrito para *Selenastrum* (capítulo 2), ocorrem muitas ligações glicosídicas na forma de 1-3: 1-3 manose (23.6%) em *M. pseudobraunii*; 1-3 glicose em *M. griffithii* e *M. contortum* (41.3% e 27.3%), é característica de um polissacarídeo alongado e direto (Atkins, 1985). Já a grande quantidade de ligações 1-4 encontradas, principalmente para *M. pseudobraunii* (1-4 glicose), pode ser característico de um polissacarídeo que apresente o máximo da força necessária para o alongamento da cadeia, mostrando um polissacarídeo mais rígido (Marszalek, *et al.* 1998).

A presença de éster sulfato nos polissacarídeos de *Monoraphidium* pode indicar um dos motivos da presença de uma relação baixa entre ligações terminais e ligações de ramificação (Chiovitti *et al.* 2003). Novamente, os ésteres sulfatos encontrados para *Monoraphidium* diferem dos encontrados para *Ankistrodesmus*, porém apresentam a mesma característica dos ésteres sulfatos para *Selenastrum*.

A diferenciação entre os polissacarídeos de *Monoraphidium* é muito maior do que observados para *Ankistrodesmus* e para o “complexo” *Selenastrum/Messastrum/Curvastrum*. Isso pode nos dar informações extremamente relevantes de como as espécies interagem com o ambiente ou com outros organismos e com as características físicas e químicas dos ambientes (Girollo *et al*

2002; 2007). E fornece indícios de que esse gênero possa ser polifilético, como já informado por Garcia (Garcia *et al* 2016).

Como mostrado nos capítulos anteriores, a dificuldade em encontrar na literatura representantes das espécies estudadas para a comparação dos polissacarídeos, já mostra a importância na caracterização do EPS para esse gênero. E com a família Selenastraceae apresentando potencial para a produção de biocombustível (Yee, 2016), outros produtos derivados dessas algas, como os polissacarídeos, necessitam receber uma maior atenção.

3.5 Conclusão

A caracterização dos polissacarídeos extracelulares de *Monoraphidium* é de extrema importância por serem polissacarídeos simples e com alto grau de diferença entre si. Como a descrição dos polissacarídeos para esse grupo é escasso, esse trabalho mostra um ponto de partida para um maior entendimento sobre a diversidade dos EPS em Selenastraceae. Neste caso, até mais do que nos outros grupos apresentados anteriormente, os EPS são uma característica diacrítica marcante, importante na diferenciação das espécies de *Monoraphidium* e de valioso auxílio na distinção das espécies deste gênero, ainda não resolvida, mas com estudos em desenvolvimento em nosso grupo de pesquisa.

CAPÍTULO 4. QUIMIOTAXONOMIA: INTRODUÇÃO AO ESTUDO QUIMIOTAXONÔMICO UTILIZANDO A DIVERSIDADE DOS POLISSACARÍDEOS EXTRACELULARES PRODUZIDOS POR DIFERENTES ESPÉCIES DE *KIRCHNERIELLA* (SELENASTRACEAE, CHLOROPHYTA)

4.1 Objetivo

O objetivo desse trabalho foi descrever a composição química, ligações, radicais e as estruturas constituintes do polissacarídeo extracelular de sete espécies de *Kirchneriella*, microalgas microscópicas e coloniais apresentando 2-4-8 (até 64 células) dispersas em uma mucilagem envoltória, cuja morfologia apresenta semelhanças com outras algas verdes da família Selenastraceae (Krienitz, 2011). O gênero *Kirchneriella* foi escolhido por ser apresentar espécies muito pequenas e simples, o que dificulta a sua caracterização morfológica, além de se apresentar com um morfotipo polifilético, o que significa que espécies diferentes podem apresentar-se com o mesmo morfotipo, mesmo não sendo espécies aparentadas.

4.2 Material e Método

Organismos. Foram analisados os EPS de 5 espécies (7 cepas) do gênero *Kirchneriella*. Os organismos utilizados no trabalho (Tabela 4.1) foram isolados de diferentes locais do Brasil e estão sendo mantidos em cultivo axênico na coleção de Culturas de Microalgas de Água Doce do Departamento de Botânica da Universidade Federal de São Carlos (WDCM 835) com os códigos indicados para cada alga.

Tabela 4.1. Espécies e cepas de *Kirchneriella* utilizadas no trabalho

Espécie	Descrição	Cepa	Local de Isolamento	Ano	GPS
		174	Piracicaba – SP	2010	22°42'45.8"S 47°37'53.5"W
<i>Kirchneriella irregularis</i>	Korshikov 1953	230	Piracicaba – SP	2010	22°42'45.8"S 47°37'53.5"W
		234	São Carlos -SP	2009	21°53'06.9"S 47°46'53.6"W
<i>Kirchneriella lunaris</i>	(Kirchner) K.Möbius 1894	087	Jataí - SP	1987	21°36'28.5"S 47°46'13.1"W
<i>Kirchneriella aperta</i>	Teiling 1912	123	Jataí – SP	1992	21°36'28.5"S 47°46'13.1"W
<i>Kirchneriella obesa</i>	West & G.S.West 1894	345	Aquidauana - MS	2011	19°17'59.0"S 55°47'45.0"W
<i>Kirchneriella pseudoaperta</i>	Komárek 1983	346	Aquidauana - MS	2011	19°17'59.0"S 55°47'45.0"W

Os procedimentos condições de cultivo, obtenção do EPS, caracterização do EPS, composição monomérica, ligações glicosídicas, análise dos polissacarídeos por espectrometria de infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR), foram pormenorizadas no capítulo 1.

4.3 Resultados

Composição monomérica.

O EPS das espécies/cepas estudadas apresenta uma composição monomérica (complexo de monossacarídeos) de composição semelhante. As cepas de *K. irregularis* estudadas apresentaram diferentes monômeros principais em sua cadeia (Tabela 4.2): *K. irregularis* (230) e *K. irregularis* (234) mostraram xylose, ramnose e glicose como os principais; Para *K. irregularis* (230) o polissacarídeo é um xyloglucorhaman: 46.8% de xylose, 16.3% de glicose e 15.3% de ramnose; *K. irregularis* (234) é um rhamanoglucoxylan: 41.1% de ramnose, 28.5% de glicose e

12.6% de xylose. Já a outra cepa de *K. irregularis* (174) apresenta uma cadeia polissacarídica rica em xylose (46.1%), ramnose (17.1%) e manose (16.5%), tendo o seu polissacarídeo como um xylorhamanomanan. As outras espécies apresentam diferentes monômeros como principais em sua cadeia: *K. pseudoaperta* (346) apresenta um mananglucoxylan: 30.6% de manose, 22.4% de glicose e 16.6% de xylose; *K. obesa* (345), um glucogalamanan: 41.1% de glicose, 15.1% de galactose e 14% de manose; *K. lunaris* (087), um fucogalaglican: 31.9% de fucose, 17.2% de galactose e 14.5% de glicose; e, *K. aperta* (123) apresenta mananglucofucan: 34% de manose, 30% de glicose e 13.1% de fucose.

É importante perceber a presença de grande quantidade de n-acetil-glicosamina na composição monomérica de *K. obesa* e *K. lunaris*, e uma pequena quantidade em *K. pseudoaperta*.

Lombardi & Vieira (1999) encontraram ácido galacturônico (13%) e ácido glicurônico (6%) para o polissacarídeo de *Kirchneriella aperta*. No presente estudo, nenhuma das espécies apresentaram ácidos urônicos em sua composição. Tais diferenças são devidas, provavelmente, à classificação errônea de *Kirchneriella aperta*, no primeiro estudo, baseado apenas na morfologia, como era usual na taxonomia clássica.

Tabela 2. Composição monomérica expressa em porcentagem (%) do carboidrato total dos polissacarídeos extracelulares para as diferentes espécies estudadas. GLUCAACID = Ácido glicurônico; GALACID = Ácido Galacturônico; GLCNAC = n-acetil-glicosamina; GLANAC = n-acetil-galactosamina

	XYLOSE	FUCOSE	ARABINOSE	RAMNOSE	MANOSE	GLUCOSE	GALACTOSE	GLUCACID	GALACID	GLCNAC	GLANAC
<i>K. pseudoaperta</i> (346)	16.6	9.8	0	10	30.6	22.4	9.6	0	0	1	0
<i>K. obesa</i> (345)	5.6	1.7	0	13.8	14	41.1	15.1	0	0	8.4	0
<i>K. irregularis</i> (174)	46.1	1.6	0	17.1	16.5	14.8	3.7	0	0	0	0
<i>K. irregularis</i> (230)	46.8	1.9	0	15.3	15	16.3	4.7	0	0	0	0
<i>K. irregularis</i> (234)	12.6	9.2	0	41.1	6.2	28.5	2.4	0	0	0	0
<i>K. lunaris</i> (087)	13.7	31.9	0	11.8	2.3	14.5	17.2	0	0	8.3	0
<i>K. aperta</i> (123)	6.2	13.1	0	12.3	34	30	4.4	0	0	0	0

Análise das ligações glicosídicas.

A metilação do polissacarídeo das algas pertencentes ao gênero *Kirchneriella*, assim como apresentado para os monômeros, apresenta uma grande variedade de ligações glicosídicas principais (Tabela 4.3). *K. irregularis* (174) e *K. irregularis* (230) apresentam as mesmas ligações glicosídicas principais: 1-2 xylose (23.5% e 26.1%), T-xylose (22.6% e 20.7%) e 1-2 ramnose (14.4% e 10.9%), além de apresentarem um polissacarídeo altamente ramificado devido à presença da ligação 1-3,4 manose (13.6% e 10.1%). A outra alga relacionada a essa cepa, *K. irregularis* (234), também apresentou T-xylose (12.6%) como uma das ligações glicosídicas principais; entretanto, T-ramnose foi a ligação mais abundante com (30.8%).

K. lunaris e *K. obesa* não apresentaram T-xylose na composição, sendo que *K. lunaris* apresentou um polissacarídeo altamente ramificado devido a abundância da ligação glicosídica 1-2,3 fucose (26%), apresentando um total 30.8% de ligações de ramificação, e das ligações 1-4 galactose (15.6%) e 1-4 xylose (13.7%). Já *K. obesa* apresentou como ligações glicosídicas principais 1-3 glicose (21.7%), 1-3 manose (9.1%) e 1-3 galactose (8.4%). É notável a presença de ligações de ramificação neste último polissacarídeo, principalmente pela presença de 1-2,3 glicose, 1-2,3,6 glicose, 1-3,4,6 glicose e 1-3,6 galactose, contribuindo para um total de mais de 10% das ligações glicosídicas no polímero. Outra característica interessante é a alta presença de n-acetil glicosamina nesses dois polissacarídeos: 8.3% de T-n-acetil-glicosamina para *K. lunaris*; e 1.7% de T-n-acetil-glicosamina e 6.7% de 1-4 n-acetil-glicosamina (total de 8.4%).

K. pseudoaperta apresentou as seguintes ligações glicosídicas principais: 1-3 manose (16.1%), 1-2 manose (11.4%) e 1-2,3 glicose (10.2%), novamente podemos notar

um polissacarídeo altamente ramificado, sendo que a proporção de ramificações no polissacarídeo é de 25.5%.

K. aperta apresentou um polissacarídeo com alta presença de ligações terminais, principalmente T-glicose (17.3%) e T-manose (17.2%), a terceira ligação glicosídica mais frequente para esse polissacarídeo foi 1-4 manose (13.6%).

Tabela 4.3. Ligações Glicosídicas encontradas para o gênero *Kirchneriella* (% M = mesmo monossacarídeo e % T = total presente) (T - posição terminal no EPS.)

Monosaccharide	linkage	<i>K. pseudoaperta</i> (346)		<i>K. obesa</i> (345)		<i>K. irregularis</i> (174)		<i>K. irregularis</i> (230)		<i>K. irregularis</i> (234)		<i>K. lunaris</i> (087)		<i>K. aperta</i> (123)	
		(%M)	(%T)	(%M)	(%T)	(%M)	(%T)	(%M)	(%T)	(%M)	(%T)	(%M)	(%T)	(%M)	(%T)
Xylose															
	T-xyl	43.4	7.2	0	0	49	22.6	44.2	20.7	100	12.6	0	0	100	6.2
	1-2 xyl	56.6	9.4	0	0	51	23.5	55.8	26.1	0	0	0	0	0	0
	1-3 xyl	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1-4 xyl	0	0	100	5.6	0	0	0	0	0	0	100	13.7	0	0
	Total	100	16.6	100	5.6	100	46.1	100	46.8	100	12.6	100	13.7	100	6.2
Fucose															
	T-fuc	0	0	0	0	0	0	0	0	34.8	3.2	0	0	0	0
	1-2 fuc	0	0	100	1.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1-3 fuc	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	18.5	5.9	0	0
	1-4 fuc	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	63.4	8.3
	1-3,4 fuc	85.7	8.4	0	0	0	0	0	0	65.2	6	0	0	28.2	3.7
	1-2,3 fuc	14.3	1.4	0	0	0	0	0	0	0	0	81.5	26	8.4	1.1
	1-2,4 fuc	0	0	0	0	100	1.6	100	1.9	0	0	0	0	0	0
	Total	100	9.8	100	1.7	100	1.6	100	1.9	100	9.2	100	31.9	100	13.1
Arabinose															
	T-ara	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1-2 ara (f)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Total							0	0						
Ramnose															
	T-rha	16	1.6	0	0	0	0	0	0	74.9	30.8	0	0	0	0
	1-2 rha	16	1.6	51.4	7.1	84.2	14.4	71.2	10.9	15.3	6.3	75.4	8.9	17.9	2.2
	1-3 rha	36	3.6	48.6	6.7	15.8	2.7	28.8	4.4	9.7	4	24.6	2.9	59.3	7.3
	1-4 rha	32	3.2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1-2,3 rha	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1-2,4 rha	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1-3,4 rha	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	22.8	2.8

Manose	Total	100	10	100	13.8	100	17.1	100	15.3	100	41.1	100	11.8	100	12.3	
	T-man	3.9	1.2	16.4	2.3	6.1	1	8.7	1.3	48.4	3	100	2.3	50.6	17.2	
	1-2 man	37.3	11.4	18.6	2.6	0	0	0	0	0	0	0	0	9.4	3.2	
	1-3 man	52.6	16.1	65	9.1	11.5	1.9	24	3.6	51.6	3.2	0	0	40	13.6	
	1-4 man	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	1-6 man	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	1-2,3 man	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	1-3,4 man	6.2	1.9	0	0	82.4	13.6	67.3	10.1	0	0	0	0	0	0	
	1-2,6 man	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	1-3,6 man	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	1-2,3,4 man	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	1-2,4,6 man	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	total	100	30.6	100	14	100	16.5	100	15	100	6.2	100	2.3	100	34	
	Glucose	T-glu	8	1.8	13.6	5.6	63.5	9.4	54.6	8.9	10.5	3	15.9	2.3	57.7	17.3
		1-2 glu	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1-3 glu		7.1	1.6	52.8	21.7	10.8	1.6	20.2	3.3	29.5	8.4	0	0	22	6.6	
1-4 glu		23.2	5.2	10.2	4.2	25.7	3.8	25.2	4.1	24.9	7.1	51	7.4	16.3	4.9	
1-6 glu		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
1-2,3 glu		9.8	2.2	13.2	5.4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
1-2,4 glu		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
1-3,4 glu		45.6	10.2	0	0	0	0	0	0	11.9	3.4	0	0	4	1.2	
1-3,6 glu		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
1-4,6 glu		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	33.1	4.8	0	0	

	1-2,3,4														
	glu	0	0	0	0	0	0	0	0	23.2	6.6	0	0	0	0
	1-2,3,6														
	glu	0	0	5.1	2.1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1-3,4,6														
	glu	6.3	1.4	5.1	2.1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Galactose	total	100	22.4	100	41.1	100	14.8	100	16.3	100	28.5	100	14.5	100	30
	T-gal	10.4	1	7.9	1.2	0	0	0	0	0	0	9.3	1.6	59.1	2.6
	T-gal f	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1-2 gal	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1-4 gal	0	0	28.6	4.3	0	0	0	0	0	0	90.7	15.6	0	0
	1-3 gal	89.6	8.6	55.6	8.4	100	3.7	100	4.7	100	2.4	0	0	40.9	1.8
	1-6 gal	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1-6 gal														
	f	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1-2,3														
	gal	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1-2,6														
	gal	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1-3,6														
	gal	0	0	7.9	1.2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1-4,6														
	gal	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1-2,3,4														
	gal	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Glc Acid	total	100	9.6	100	15.1	100	3.7	100	4.7	100	2.4	100	17.2	100	4.4
	T-glc														
	acid	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1-4 glc														
	acid	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Gal Acid	Total	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	T-gal														
	acid	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1-4 gal														
	acid	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Glc Nac	Total	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Gal Nac	T-glc nac	0	0	20.2	1.7	0	0	0	0	0	0	100	8.3	0	0
	1-4 glc nac	100	1	79.8	6.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Total	100	1	100	8.4	0	0	0	0	0	0	100	8.3	0	0
	T-gal nac	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1-4 gal nac	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1-4,6 gal nac	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Total	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Análise estrutural por FT-IR.

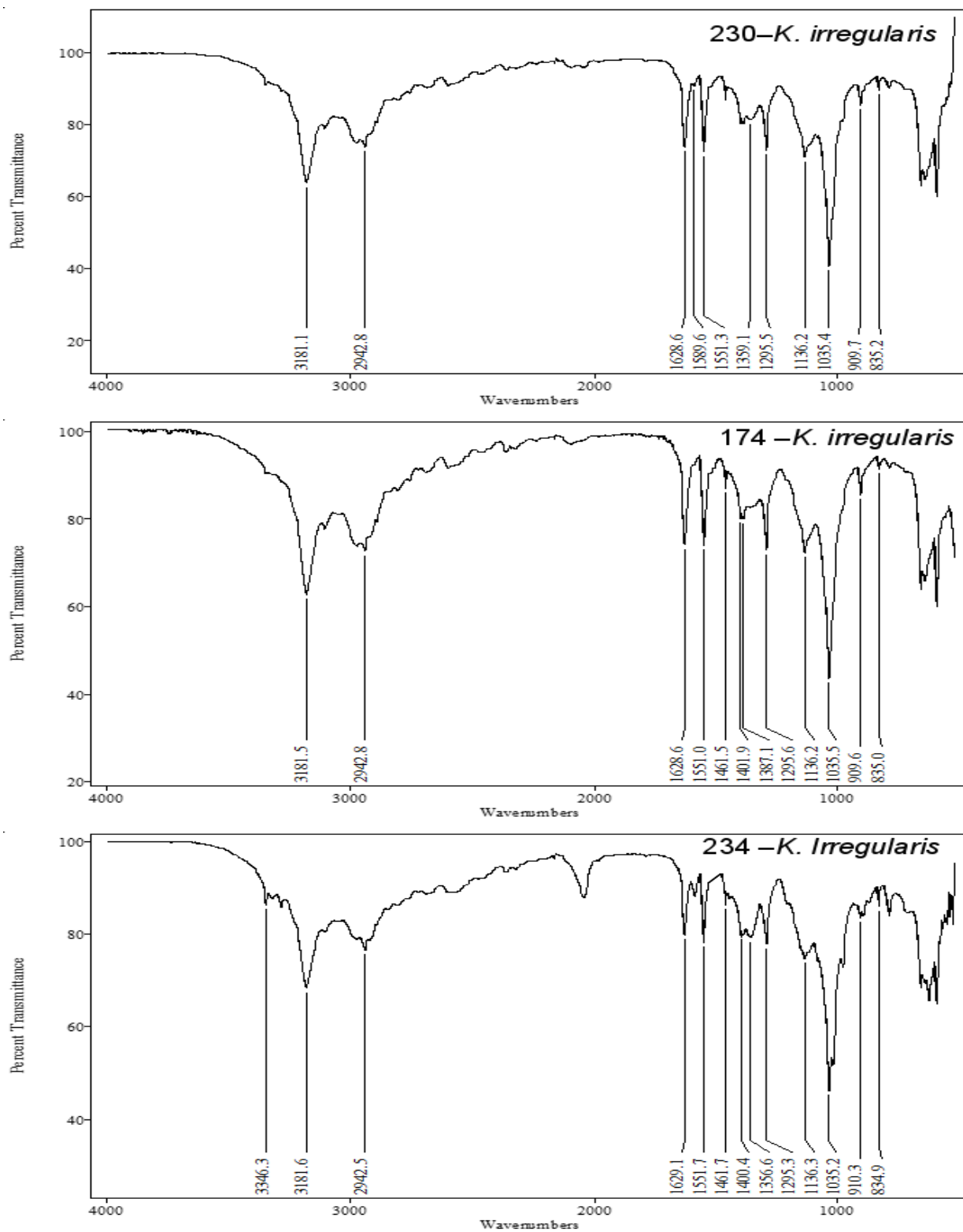
Os resultados mostram características comuns ao esperado para polissacarídeos (Figura 4.1). O EPS de todas as cepas/espécies apresentou um padrão de bandas próximo à região de 3200cm^{-1} pertencente a vibração de alongamento da hidroxila no polissacarídeo. A banda de absorção no intervalo de $3200\text{-}2800\text{ cm}^{-1}$ foi devido à vibração de alongamento do C-H. Todos os polissacarídeos apresentaram uma absorbância na região de $1200\text{-}950\text{ cm}^{-1}$, sendo que a banda de absorção na porção de 1035cm^{-1} é sugestiva de que o monossacarídeo apresente um anel de piranose (Sheng *et al*, 2007). A região entre $950\text{-}750$, denominada *fingerprint* (Mathlouthi & Koenig, 1986) apresentou uma absorção na porção 909 em seis das sete espécies/cepas: *K. irregularis* (174, 230 e 234), *K. aperta*, *K. pseudoaperta* e *K. lunaris*. *K. obesa* apresentou banda de absorção em 904. Isso se deve a posição diferente do C-H ligado a diferentes carbonos.

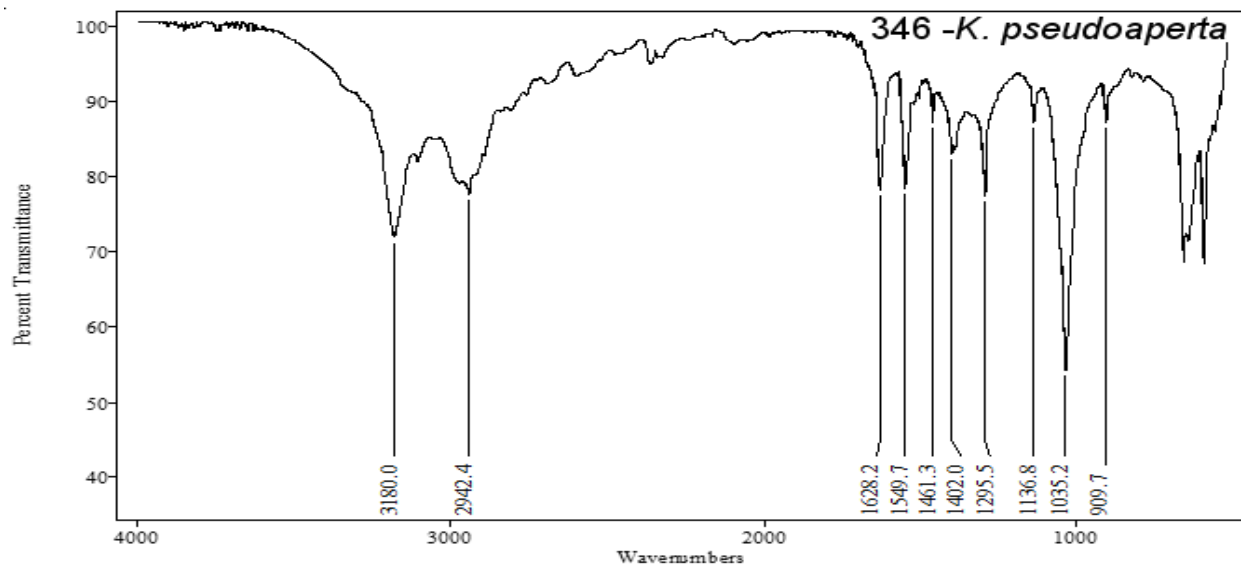
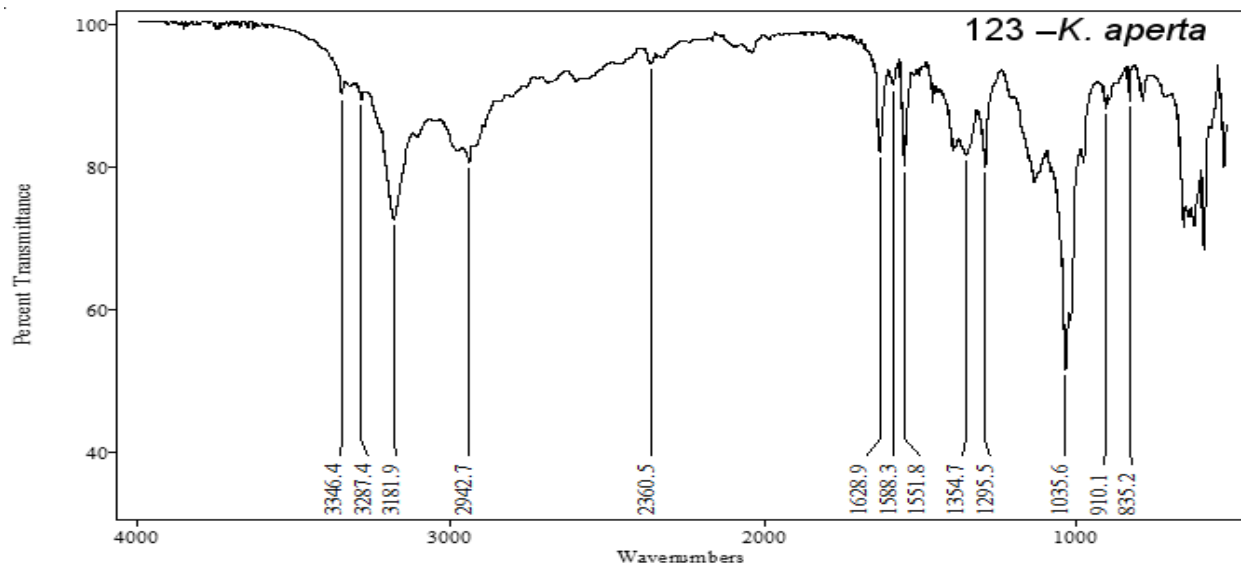
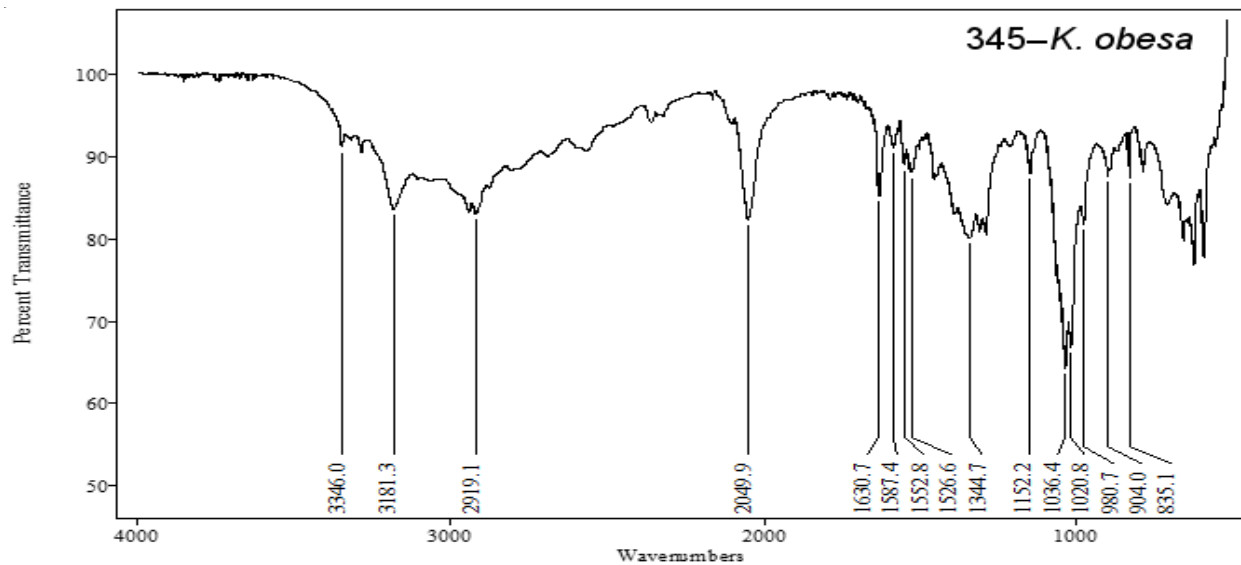
Foi encontrada a presença de picos característicos de grupos carboxílicos (1550, 1461 e 1402) para *K. pseudoaperta*, mostrando um polissacarídeo ácido (Shang *et al*. 2013). Esse resultado difere do resultado encontrado para CG-MS, que não mostraram a presença de ácidos urônicos na composição dessas algas, isso pode acontecer devido à alta quantidade de ramificação presente para o polissacarídeo de *K. pseudoaperta* que apresentou mais de 25% de ligações de ramificação nesse polímero, não possibilitando a total metilação do polissacarídeo. Como certas ligações glicosídicas são resistentes à metilação, o processo deve vir acompanhado pela degradação do polissacarídeo (Björdal *et al*. 1970).

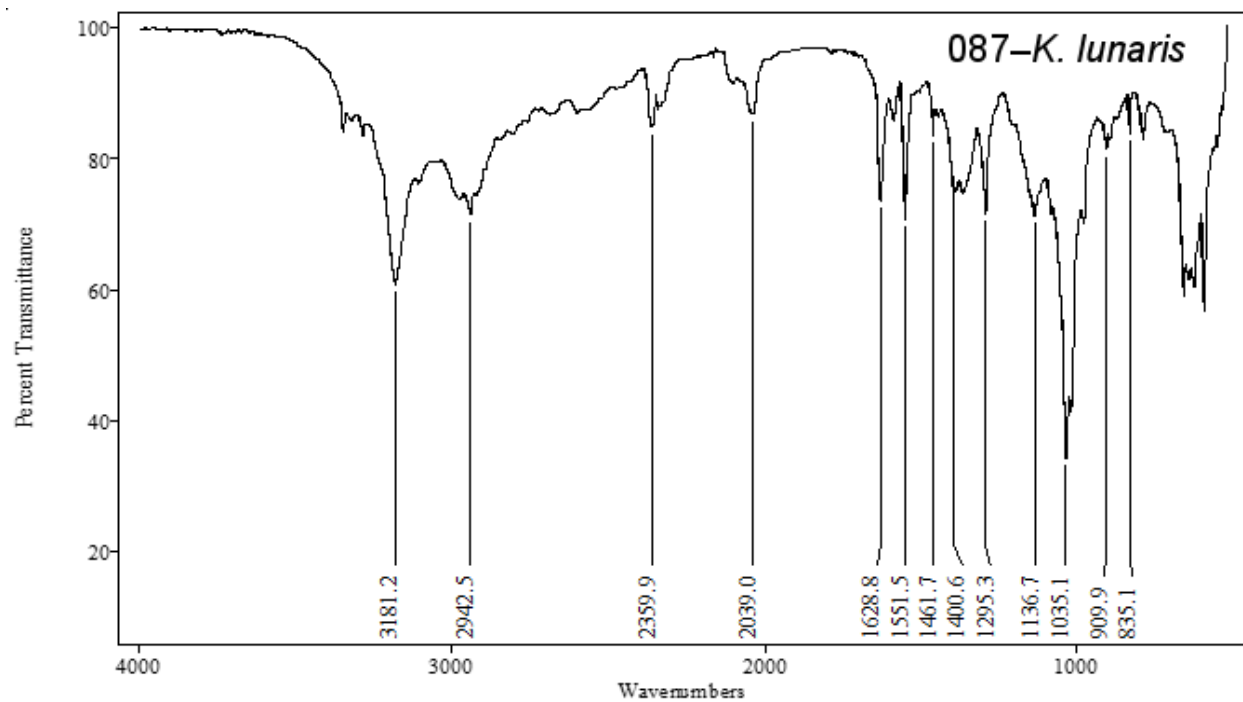
A análise estrutural das ligações mostrou que seis algas apresentaram absorbância na região próxima a 1390 e 830 correlacionada à presença de S=O (Tipson, 1968; Barker *et al*. 1956) e grupo sulfato (C-O-S) no carbono terciário na posição equatorial do anel (Harris & Turkey, 1970). Essas algas são: *K. irregularis* (174, 230 e 234), *K. aperta*, *K. lunaris* e *K. obesa*.

Outra informação importante que podemos notar da análise estrutural é a confirmação da presença de grupo acetoamida na porção 1630 (Barker *et al* 1956), muito provavelmente relacionado à presença de n-acetyl- α -D-glicosamina. A presença de n-acetil-glicosamina já havia sido observada pela análise de CG-FID e CG-MS.

Figura 4.1 – Espectros de infravermelho (FT-IR) dos polissacarídeos extracelulares para as diferentes cepas/espécies de *Kirchneriella*







Similaridade entre os polissacarídeos de Kirchneriella. Os padrões de similaridade entre os polissacarídeos podem ser visualizados no *heatmap* da Figura 4.2 e da Figura 4.3.

Analisando a Figura 4.2, utilizando os monômeros constituintes, podemos observar um alto grau de similaridade entre duas cepas de *K. irregularis* (174 e 230), porém a terceira cepa dessa espécie (*K. irregularis* – 234) apresentou baixo grau de similaridade. De fato, *K. pseudoaperta*, apresentou uma similaridade muito maior com as duas cepas de *K. irregularis* (174 e 230) do que a terceira cepa relacionada (*K. irregularis* – 234).

É notável observar o alto grau de similaridade apresentado entre *K. pseudoaperta* e *K. aperta*, muito provável a grande quantidade de hexoses com a mesma frequência nos seus polissacarídeos.

K. lunaris foi a espécie que apresentou menor similaridade comparado com as outras espécies estudadas. Destaque-se que ela apresentou baixo grau de similaridade em pelo menos quatro das seis espécies que poderiam ser comparadas com ela.

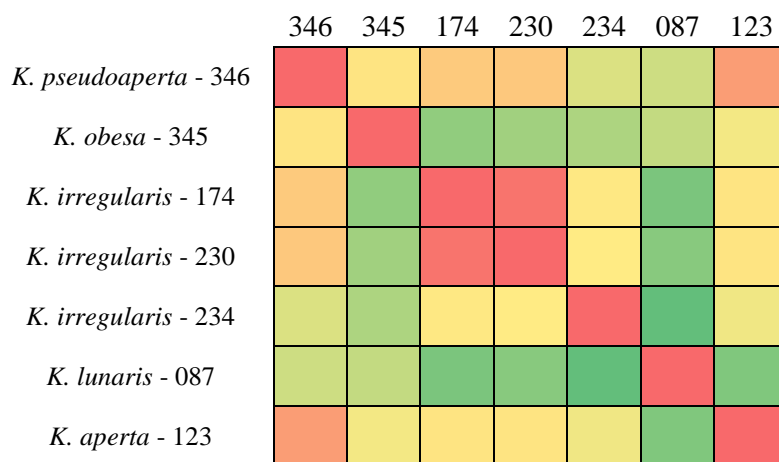


Figura 4.2. *Heatmap* de similaridade entre as espécies e cepas de *Kirchneriella* utilizando as ligações glicosídicas constituintes (vermelho = maior similaridade; verde = menor similaridade)

Analisando a Figura 4.3, utilizando-se as ligações glicosídicas, novamente, duas cepas de *Kirchneriella irregularis* (174 e 230) apresentaram um alto grau de similaridade, porém dessa vez a terceira cepa relacionada a essa espécie (234), apresentou um grau de agregação muito maior do que o observado para os monômeros.

Para as ligações glicosídicas, é importante notar uma alteração nas similaridades em algumas algas. Por exemplo, as espécies *K. pseudoaperta* e *K. obesa* haviam apresentado um grau de similaridade médio quando comparadas pelos seus monômeros, porém ao utilizar as ligações glicosídicas, a similaridade entre as espécies se torna baixa. Outra constatação desse fato é a similaridade de *K. lunaris* em comparação com as outras espécies; para as ligações três espécies apresentaram baixa similaridade com *K. lunaris*, sendo que somente *K. aperta* apresentou baixa similaridade tanto para monômeros quanto para ligação glicosídica.

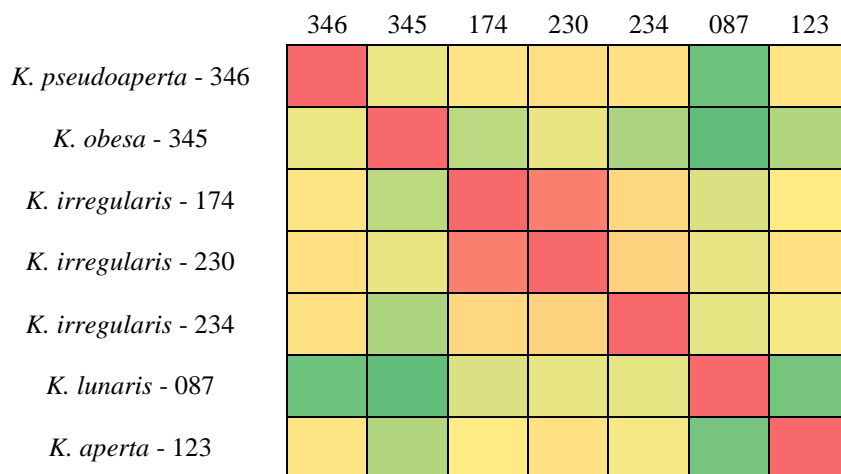


Figura 4.3. *Heatmap* de similaridade entre as espécies de *Kirchneriella* utilizando as ligações glicosídicas (vermelho = maior similaridade; verde = menor similaridade)

4.4 Discussão

O EPS produzido pelas diferentes algas do gênero *Kirchneriella* não apresentam maiores diferenciações na composição monomérica, exceto a presença de monômeros aminados em três das sete espécies estudadas (Tabela 3.2). Apesar da presença de um monômero diferenciado, elas ainda apresentam um padrão de monômeros encontrados por Paulsen *et al.* (1998) para a alga *Ankistrodesmus densus* e por Lombardi & Vieira (1999) para a alga *Kirchneriella aperta*.

Lombardi & Vieira (1999) encontraram a presença de monômeros ácidos na composição do polissacarídeo, fato não encontrado nesse estudo, provavelmente pela dificuldade na metanolização de certos monômeros (Björddal *et al.* 1970) ou classificação errada de espécie. Esse fato, aliado ao alto grau de ligações glicosídicas de ramificação, pode ter impossibilitado a emergência dos monômeros ácidos.

Os monossacarídeos mais frequentes encontrados para as Cholorophyceae são galactose, xylose, arabinose, fucose, ramnose e manose (Allard & Casadevall 1990, Metzger *et al* 1990). Esse padrão de monossacarídeos não se repete para as *Kirchneriella* estudadas. Elas além de

apresentarem esses monômeros comuns, apresentam uma alta composição de glicose, sendo que *K. lunaris* apresenta a menor concentração com 14.5%, sendo o terceiro monômero mais predominante para essa espécie e maior concentração para *K. obesa* (41.1%), sendo o principal monômero constituinte para essa alga. Paulsen & Vieira (1994) já haviam observado a presença de glicose como monômero frequente para outro grupo de algas verdes, a desmídia *Spondilosium panduriforme*, enquanto Mishra & Jha (2009) encontraram a presença de glicose para *Dunaliella salina* e Lewin (1956) já havia mostrado a presença de glicose e xylose como monômeros predominante para *Chlamydomonas ulvaënsis*. Lombardi & Vieira (1999) também encontraram glicose como monômero na cadeia polissacarídica, entretanto a concentração de glicose se apresentou mais baixa do que as outras hexoses constituintes. Archanjo *et al.* (em submissão), em estudos com associação de lectinas com monômeros terminais, mostraram a presença de altas concentrações de glicose para *Kirchneriella irregularis*.

Analisando a Tabela 4.2 em comparativo com a matriz de similaridade da Figura 4.2, podemos observar que os monômeros se apresentaram relativamente divergentes entre as espécies. As cepas de *K. irregularis* (174 e 230) apresentaram um alto grau de similaridade, o qual poderia ser adicionado a espécie *K. pseudoaperta*, deixando a outra cepa de *K. irregularis* com uma similaridade mais baixa, quando comparadas as três cepas.

O relativo baixo grau de similaridade entre as espécies de *Kirchneriella* pode nos mostrar que, talvez, essas espécies não apresentem uma similaridade específica ao nível genético para serem consideradas uma mesma espécie. Garcia (2016) notou a diversificação do gênero *Kirchneriella* em dados utilizando a ferramenta da análise genética, através de biologia molecular.

As ligações glicosídicas (Tabela 4.3) mostraram o mesmo padrão de diversidade observada para os monômeros; todavia, ao observar a Figura 4.3 notamos uma sutil alteração nas

similaridades das espécies. Para as ligações glicosídicas, as cepas de *K. irregularis* apresentaram um alto grau de similaridade, mesmo ainda apresentando maiores similaridades entre as cepas 174 e 230, e menor similaridade destas com a cepa 234. É observável que a similaridade entre as espécies aumentou utilizando as ligações glicosídicas, isto se deve ao fato de maiores fatores serem agregados a matriz de similaridade, fornecendo um melhor indicativo das semelhanças e aumentando os fatores de diferenças.

Observando-se a Tabela 4.3 podemos notar a predominância de ligações glicosídicas terminais em algumas espécies: *K. irregularis* (234) apresentou T-ramnose (30.8%); *K. aperta* apresentou T- glicose (17.3%) e T- manose (17.2%) como seus constituintes principais. Já *K. irregularis* (174) e *K. irregularis* (230) apresentaram 1-2 xylose como ligação principal; *K. pseudoaperta* apresentou 1-3 manose (16.1%); *K. obesa* apresentou 1-3 glicose (21.7%); e *K. lunaris* apresentou 1-2,3 fucose (26%).

A presença de alta concentração de ramnose terminal mostra que o polissacarídeo de *K. irregularis* (234) é muito mais hidrofóbico na natureza em comparação com outros polissacarídeos terminais (Hu *et al*, 2003), o que pode explicar a ocorrência de uma firme cápsula envolvendo as células em uma colônia.

Como observado para as espécies de *Selenastrum*, algumas espécies de *Kirchneriella* apresentaram dominância nas ligações 1-3, características de um polissacarídeo alongado e direto (Atkins, 1985), porém dessa vez com grande quantidade de ramificações.

Segundo Chiovitti *et al.* (2003) a presença de éster sulfato na composição dos polissacarídeos pode indicar uma proporção de presença de pontos de ramificação maior do que a

presença de pontos terminais. Essa afirmação pode ser verdadeira devido a constatação de éster sulfato (Figura 4.1) em seis cepas de *Kirchneriella*.

Os ésteres sulfatos encontrados para os polissacarídeos de *Kirchneriella* diferem dos encontrados para *Ankistrodesmus* (capítulo 1) devido à forma de ligação da parte S= O (Barker *et al.* 1956), porém são semelhantes ao encontrado para as cepas de *Selenastrum* (capítulo 2).

Klorege & Quatrano (1988) mostraram que a presença de grupos sulfatados é comum para algas marinhas, sendo raro para algas de água doce, porém, como a descrição de polissacarídeos extracelulares de algas de água doce ainda é muito raro, podemos encontrar novas espécies com a presença de grupos sulfatados.

Na taxonomia de algas a presença e/ou ocorrência de componentes específicos do polissacarídeo já foi considerada para distinguir diferentes grupos (Percival, 1979; Kremer, 1980; Barrow *et al.*, 1995). No decorrer dos anos temos visto diversas investigações utilizando NMR para a classificação de algas vermelhas e se provaram um excelente método qualitativo de análise (Karsten *et al.* 2005; Simon-Colin *et al.* 2004). A utilização da composição do polissacarídeo através de análises das ligações glicosídicas pode ser uma ferramenta interessante para análise quimiotaxonomica, uma vez que as algas da família Selenastraceae apresentam uma alta produção de polissacarídeo extracelular.

Pela análise da Figura 4.3, há indícios da potencialidade da utilização do EPS para quimiotaxonomia. Pois nota-se que a diferenciação entre as cepas ocorreu devido a presença de ligações glicosídicas em diferentes proporções e, em uma análise mais aprofundada, observa-se ainda que a presença de ligações químicas específicas também foram, muitas vezes, variáveis.

Garcia *et al* (2016) mostrou que o gênero *Kirchneriella* é polifilético e provavelmente as cepas de *K. irregularis* que apresentaram diferenças entre seus polissacarídeos, podem ser indicativos da necessidade de reposicionamento taxonômico ou filogenético.

Os dados apresentados nesse capítulo mostram que o EPS de *Kirchneriella* se apresenta como um heteropolissacarídeo, altamente ramificado e com a presença de sulfato na composição. Percival (1978, 1979) mostrou que o EPS de Chlorophyta apresenta o padrão encontrado para as algas desse capítulo.

Como mostrado nos primeiros capítulos, a dificuldade em encontrar representantes da espécie estudada para a comparação dos polissacarídeos, já mostra a importância na caracterização do EPS para esse gênero. E com a família Selenastraceae apresentando potencial para sua utilização econômica, outros produtos derivados dessas algas, como os polissacarídeos, necessitam receber uma maior atenção.

4.5 Conclusão

A caracterização do polissacarídeo de *Kirchneriella* mostrou que diferentemente do apresentando até o momento, o polissacarídeo desse gênero é altamente ramificado, com dificuldade na total metilação de suas ligações e apresentando sulfato em sua composição.

É importante notar que a diferenciação entre as cepas ocorreu, uma vez que as ligações glicosídicas para as cepas foram diferentes, tanto em presença, quanto em quantidade.

Os resultados obtidos, mostrando uma alta diversidade em seus EPS para o gênero *Kirchneriella*, revelaram que: a) é relativamente fácil a discriminação de espécies, e até mesmo cepas desse gênero, devido a presença de características específicas para diferentes espécies/cepas;

b) o gênero ainda não está resolvido filogeneticamente o que concorda com os dados obtidos por biologia molecular

CAPÍTULO 5. ABORDAGEM QUIMIOTAXONOMICA UTILIZANDO POLISSACARÍDEOS
EXTRACELULARES NA DIFERENCIAÇÃO DE MICROALGAS DA FAMÍLIA SELENASTRACEAE
(CHLOROPHYCEAE, CHLOROPHYTA).

5.1 Resumo

O polissacarídeo extracelular (EPS) de microalgas tem sido utilizado em outras áreas correlacionadas à ecologia aquática e fisiologia e a constatação de que a diversidade de EPS entre algas é significativa, levou-nos a ponderar sobre sua utilização na quimiotaxonomia. A taxonomicamente problemática família Selenastraceae (Sphaeropleales, Chlorophyceae, Chlorophyta) tem diversidade em nível específico muito maior do que a conhecida. Dessa forma a caracterização dos EPS de várias espécies pode ser utilizada como característica diacrítica na identificação de cepas, espécies e gêneros. As observações de pequenas variações no polissacarídeo, principalmente, nas suas ligações glicosídicas, mostraram que cepas da mesma espécie apresentam agregação superior a 90% e isso associado à ocorrência de ligações específicas para cada gênero (ex. 1-3 Ramnose específica do gênero *Kirchneriella*) pode nos dar indicativos da utilização dos EPS para caracterização de espécies e para a informação de biomarcadores para os diferentes gêneros

5.2 Objetivos

O objetivo principal do trabalho foi utilizar os polissacarídeos extracelulares (EPS), já caracterizados nos capítulos anteriores, de várias espécies com sua taxonomia putativamente resolvida por métodos moleculares, para que pudessem ser utilizados como característica diacrítica na identificação de espécies e auxiliarem na filogenia da família Selenastraceae.

5.3 Materiais e Métodos

Organismos. Foram analisados os EPS de 31 espécies/strains de Selenastraceae. Os organismos selecionados nesse estudo (Tabela 5.1) foram isolados de diferentes locais do Brasil e estão sendo mantidos em cultivo axênico na coleção de Culturas de Microalgas de Água Doce do Departamento de Botânica da Universidade Federal de São Carlos (CCMA-UFSCar).

Tabela 5.1. Lista de Espécies utilizadas, seu respectivo código na coleção de culturas e local de origem

Espécie	Descrição	Cepa	Local de Isolamento	Ano	GPS
		003	Itirapina - SP	1979	22°12'20.6"S 47°52'37.6"W
<i>Ankistrodesmus densus</i>	Korshikov 1953	128	Foz Do Iguaçu - PR	2009	25°23'56.1"S 54°35'26.2"W
		239	Matão - SP	2010	21°38'31.0"S 48°19'56.8"W
<i>Ankistrodesmus flexuosos</i>	(Komárek) Ergashev	083	Foz do Iguaçu - PR	2009	25°23'56.1"S 54°35'26.2"W
<i>Ankistrodesmus stipitatus</i>	(Chodat) Komárková-Legnerová 1969	278	São João Batista do Glória - MG	2011	20°32'01.0"S 46°31'32.9"W
<i>Ankistrodesmus fusiformis</i>	Corda ex Korshikov 1953	333	Porto Velho - RO	2011	8°35'17.9"S 63°37'12.3"W
<i>Ankistrodesmus bernardii</i>	Komárek 1983	423	Dourado-SP	2012	22°09'57.8"S 48°17'25.0"W
		047	São Carlos – SP	2008	21°59'08.5" S 47°52'50.6" W
<i>Selenastrum bibraianum</i>	Reinsch 1866	125	Jataí – SP	1992	21°36'28.5"S 47°46'13,1"W
		168	Jataí – SP	1992	21°36'28.5"S 47°46'13.1"W
		317	São Paulo – SP	2010	23°44'04.3"S 46°45'44.4"W
<i>Messastrum gracile</i>	Reinsch 1866	005	Itirapina - SP	1978	22°12'20.6"S 47°52'37.6"W
		470	Santa Cruz das Palmeiras – SP	2012	21°48'38.0"S 47°16'26.0"W
<i>Curvastrum pantanale</i>	Reinsch 1866	350	Aquidauana - MS	2011	19°17'59.0"S 55°47'45.0"W
		174	Piracicaba – SP	2010	22°42'45.8"S 47°37'53.5"W
<i>Kirchneriella irregularis</i>	Korshikov 1953	230	Piracicaba – SP	2010	22°42'45.8"S 47°37'53.5"W

		234	São Carlos -SP	2009	21°53'06.9"S 47°46'53.6"W
<i>Kirchneriella lunaris</i>	(Kirchner) K.Möbius 1894	087	Jataí - SP	1987	21°36'28.5"S 47°46'13.1"W
<i>Kirchneriella aperta</i>	Teiling 1912	123	Jataí – SP	1992	21°36'28.5"S 47°46'13.1"W
<i>Kirchneriella obesa</i>	West & G.S.West 1894	345	Aquidauana - MS	2011	19°17'59.0"S 55°47'45.0"W
<i>Kirchneriella pseudoaperta</i>	Komárek 1983	346	Aquidauana - MS	2011	19°17'59.0"S 55°47'45.0"W
<i>Monoraphidium arcuatum</i>	(Korshikov) Hinák 1970	024	Itirapina - SP	1979	22°12'20.6"S 47°52'37.6"W
<i>Monoraphidium griffithii</i>	(Berkeley) Komárková-Legnerová 1969	176	Jataí – SP	1993	21°36'28.5"S 47°46'13.1"W
<i>Monoraphidium contortum</i>	Komárková-Legnerová 1969	306	São Paulo - SP	2010	23°44'04.3"S 46°45'44.4"W
<i>Monoraphidium pseudobraunii</i>	(Belcher & Swale) Heyning 1979	325	Porto Velho - RO	2011	8°35'17.9"S 63°37'12.3"W
<i>Monoraphidium komarkovae</i>	Nygaard 1979	353	Aquidauana - MS	2011	19°20'29.0"S 55°43'40.0"W
<i>Pseudokirchneriella contorta</i>	(Schmidle) F.Hindák 1990	364	Aquidauana - MS	2011	19°01'27.0"S 55°55'28.0"W
<i>Pseudokirchneriella elongata</i>	(G. M. Smith) F. Hindak 1990	498	Taquaritinga – DF	2012	21°25'11.0"S 48°30'33.9"W
<i>Raphidocelis subcapitata</i>	(Korshikov) Nygaard, Komárek, J.Krisitiansen & O.M.Skulberg 1987	048	Oslo – Noruega	-	59°59'07.3"N 10°59'16.0"E
<i>Chlorolobion brauni</i>	(Nägeli) Komárek 1979	137	Jataí – SP	1992	21°36'28.5"S 47°46'13.1"W
	(Nägeli) Komárek 1979	455	Analândia – SP	2012	22°05'05.3"S 47°44'47.0"W

Os demais procedimentos foram pormenorizados no Capítulo 1. A caracterização dos EPS foi já descrita nos capítulos anteriores.

Aquisição dos dendrogramas para as espécies selecionadas. Para a obtenção dos dendrogramas, foram utilizados programas estatísticos no ambiente R. Primeiro, obteve-se a melhor medida de dissimilaridade para os caracteres quantitativos obtidos, levando-se em conta que as variáveis quantitativas apresentam a mesma influência no cálculo da distância (Manly, 2008). Segundo, aplicou-se a medida de dissimilaridade a técnicas de formação de grupos (método de agrupamento hierárquico). E, após a obtenção do dendrograma, foi utilizado um ranqueamento

das variáveis para observar qual delas ofereceu a maior fidelidade e/ou abundância dentro dos grupos.

A melhor medida de dissimilaridade obtida foi o índice de Canberra.

5.4 Resultados

A composição monomérica presente no EPS das espécies estudadas pode ser observada na Tabela 5.2. Maiores considerações a respeito da composição monomérica estão descritas nos capítulos de 1 a 4.

Tabela 5.2. Composição monomérica expressa em porcentagem (%) do carboidrato total dos polissacarídeos extracelulares para as diferentes espécies estudadas. GLUCAACID = Ácido glicurônico; GALACID = Ácido Galacturônico; GLCNAC = n-acetil-glicosamina; GLANAC = n-acetil-galactosamina

	XYLOSE	FUCOSE	ARABINOSE	RAMNOSE	MANOSE	GLUCOSE	GALACTOSE	GLUCACID	GALACID	GLCNAC	GLANAC
<i>A.densus (003)</i>	9.5	38.6	0	9.9	14	8.2	14.2	3.2	0	0.1	2.3
<i>A.densus (128)</i>	8.4	37.2	0	9.5	14.4	8.9	14.4	4.4	0	0.1	2.7
<i>A.densus (239)</i>	5.5	20.6	1	7.3	28.4	13.8	11.5	8.3	0	0	3.6
<i>A.stipitatus (278)</i>	17.2	37.3	0	17.1	8.2	8.4	10.4	0	0	1.2	0.2
<i>A.fusififormis (333)</i>	19.7	19	0	7.1	15	22.1	15.8	0	0	1.3	0
<i>A.flexuosus (083)</i>	15.4	28.5	0	1.4	12.4	25.8	12	0	0	2.2	2.3
<i>A.bernardii (423)</i>	28.1	19.5	0	4.1	8.7	16.1	16.3	1.1	1.1	2.1	2.9
<i>S.bibrainum (047)</i>	12.8	23.9	0	12.4	19.6	21.4	9.6	0	0	0.2	0.1
<i>S.bibrainum (125)</i>	11.6	21.4	0	11.2	28.2	17.7	9.8	0	0	0.1	0
<i>S.bibrainum (168)</i>	12.1	18	0	11	25.9	20.2	12.7	0	0	0.1	0
<i>S.bibrainum (317)</i>	9.2	19.4	0	9.1	25	23.8	13.4	0	0	0.1	0
<i>C.pantanale (350)</i>	10.2	21.8	0	12.9	27.6	9.2	16.1	0	0	1.1	1.1
<i>M.gracile (005)</i>	15.6	21.1	0	0	30.5	26.8	5.9	0	0	0.1	0
<i>M.gracile (470)</i>	15.4	20.6	0	0	29.7	27.4	6.8	0	0	0.1	0
<i>M.griffithi (176)</i>	10.1	4.6	0	7.5	8.9	48.3	6.3	4.3	0	9.9	0.1
<i>M.contortum (306)</i>	15.1	7.8	0	6.2	7.7	33	0	25.3	0	3.7	1.2
<i>M.komarkovae (353)</i>	7.6	15.6	0	34.1	2.4	12.6	14.1	7.7	0	5.9	0
<i>M.arcuratum (024)</i>	10.2	8.4	0	12.9	19.1	24	10.6	11.9	0	2.8	0.1
<i>M.pseudobraunii (325)</i>	7.7	3.3	0	0	24.7	32.3	0	26.6	0	2.1	3.3
<i>K.pseudoaperta (346)</i>	16.7	9.9	0	10	30.6	22.3	9.5	0	0	1	0
<i>K.obesa (345)</i>	5.6	1.7	0	13.8	14.1	41.2	15.2	0	0	8.4	0
<i>K.irregularis (174)</i>	46.1	1.6	0	17.1	16.5	14.8	3.9	0	0	0	0
<i>K.irregularis (230)</i>	46.8	1.9	0	15.3	15	16.3	4.7	0	0	0	0
<i>K.irregularis (234)</i>	42.5	1.9	0	17.1	14	18.4	6.1	0	0	0	0
<i>K.aperta (123)</i>	6.2	13.1	0	12.3	34.1	29.9	4.4	0	0	0	0
<i>K.lunaris (087)</i>	13.7	32	0	11.8	2.3	14.5	17.3	0	0	8.4	0
<i>P.contorta (364)</i>	16.2	15.5	1	10	26.5	6.2	17.7	0.2	0	3.8	2.9
<i>P.elongata (498)</i>	12.7	11.7	0	37.2	6.2	28.3	2.4	0	0	0	1.5
<i>R.subcapitata (048)</i>	11.1	4.9	0.1	1.5	41.6	6.9	20	13.9	0	0	0
<i>C.braunii (137)</i>	12.2	5.5	0	21.4	29.2	20	8.5	0	0	3.2	0
<i>C.braunii (455)</i>	12.5	4.7	0	18.6	33.2	19.4	8.4	0	0	3.2	0

Dendrograma obtido somente com os monômeros dos EPS. A primeira análise para a obtenção do dendrograma para Selenastraceae foi feita utilizando somente a composição monomérica completa dos polissacarídeos. Para tanto, as espécies foram classificadas em grupos correspondentes aos seus gêneros: 1) *Ankistrodesmus*; 2) *Selenastrum*; 3) *Monoraphidium*; 4) *Kirchneriella*; 5) *Pseudokirchneriella*; 6) *Raphidocelis*; 7) *Chlorolobium*; 8) *Curvastrum*; 9) *Messastrum*. Esse dendrograma é apresentado na Figura 5.1.

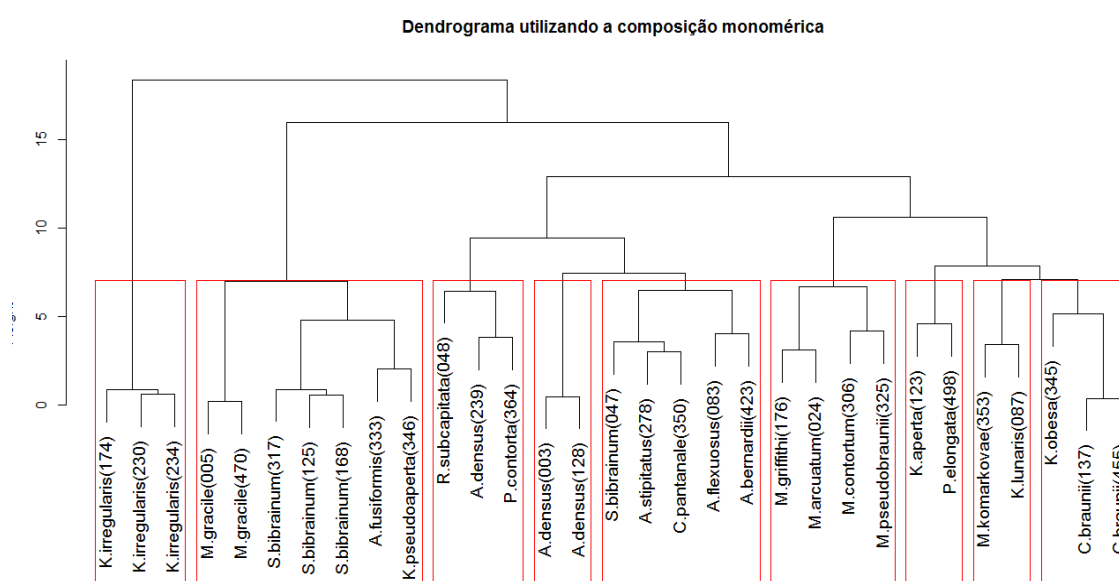


Figura 5.1. Dendrograma obtido utilizando-se somente a composição monomérica.

Pela Figura 5.1, podemos perceber que os diferentes grupos propostos através da morfologia não se adequam ao obtido com o dendrograma de monômeros.

Na Tabela 5.2, podemos observar o quanto cada monômero contribui para a formação do cluster, utilizando-se novamente os grupos propostos para a formação do dendrograma da Figura 5.1. Somente três monômeros apresentaram potencial de biomarcadores para os gêneros selecionados, os demais monômeros estão associados a todos os gêneros em diferentes níveis de associação. Os valores mostrados na Tabela 5.3 são os índices de associação entre os gêneros e os monômeros indicadores (Dufrene &

Legendre, 1997). A especificidade de um determinado monômero mostra se ele pode pertencer a um grupo alvo (gênero). Fidelidade é a probabilidade de se encontrar gêneros em determinados monômeros.

Tabela 5.3. Monômeros indicadores para cada umas das 9 espécies onde ocorrem. Os valores de especificidade mostram se o monômero pode pertencer ao gênero e a fidelidade é a probabilidade dos monômeros serem encontrados nos gêneros (Esp = Especificidade/ Fid = Fidelidade)

	Ácido Glicurônico		N-acetil Galacturônico		Ramnose	
	Esp	Fid	Esp	Fid	Esp	Fid
<i>Ankistrodesmus</i>			0.996	0.867	1	0.965
<i>Selenastrum</i>					1	0.965
<i>Curvastrum</i>			0.996	0.867	1	0.965
<i>Messastrum</i>						
<i>Monoraphidium</i>	0.92	1	0.996	0.867	1	0.965
<i>Kirchneriella</i>					1	0.965
<i>Pseudokirchneriella</i>			0.996	0.867	1	0.965
<i>Raphidocelis</i>	0.92	1			1	0.965
<i>Chlorolobium</i>					1	0.965

A análise da Tabela 5.3 mostra-nos que o ácido glicurônico apresenta forte associação com *Monoraphidium* e *Raphidocelis*. A forte associação do gênero *Monoraphidium* a três monômeros pode ser uma possível explicação desse gênero se apresentar em um clado composto exclusivamente de suas espécies. Ramnose se apresentou como o monômero comum a praticamente todos os gêneros e provavelmente a sua presença contribuiu para a agregação de forma indistinta dentro do dendrograma proposto para os monômeros.

Uma segunda análise de relevância dos monômeros mostrou que o ácido galacturônico apresentou um leve potencial para servir de marcador para o gênero *Ankistrodesmus*, uma vez que só foi encontrado nesse gênero; entretanto, esse monômero só está presente em 0.38% das espécies listadas para esse grupo.

Dendrograma utilizando as ligações glicosídicas entre os monossacarídeos. O dendrograma observado na Figura 5.2 foi obtido utilizando-se as ligações glicosídicas

encontradas por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa. Como no caso anterior, as espécies foram tratadas em grupos específicos correspondentes aos seus gêneros (*Ankistrodesmus*; *Selenastrum*; *Monoraphidium*; *Kirchneriella*; *Pseudokirchneriella*; *Raphidocelis*; *Chlorolobium*). O tratamento estatístico foi o mesmo utilizado para o dendrograma da Figura 5.1. As ligações glicosídicas utilizadas para a formação do dendrograma podem ser vistos no capítulo de 1 até 4.

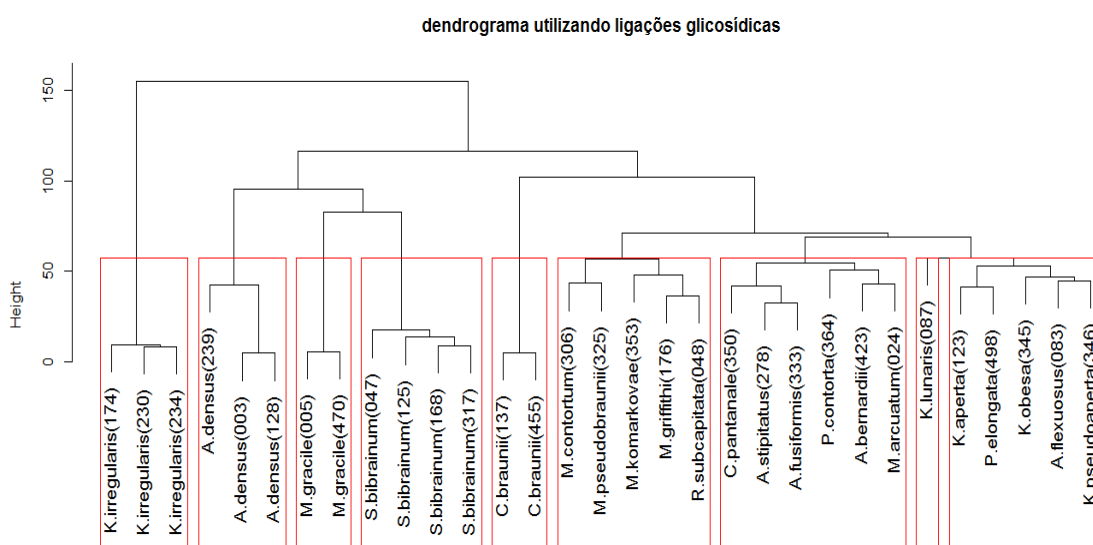


Figura 5.2. Dendrograma obtido utilizando-se as ligações glicosídicas entre os monossacarídeos componentes de cada EPS.

Na Tabela 5.4, podemos observar o quanto cada ligação glicosídica contribui para a formação do cluster, com as espécies agrupadas por gêneros como o proposto para a obtenção do dendrograma da Figura 5.2. Os valores para Especificidade e Fidelidade seguem o mesmo modelo proposto para a Tabela 5.3.

Na Figura 5.2, podemos notar que os cinco primeiros clados apresentam somente cepas correlacionadas à mesma espécie. O sexto clado é basicamente composto por 2 gêneros, *Monoraphidium* e *Raphidocelis*, enquanto o oitavo clado apresenta apenas uma

espécie representante (*K. lunares*). Já o sétimo e o nono clado apresentaram uma variação de espécies de diferentes gêneros.

Tabela 5.4. Ligações Glicosídicas indicadores para cada um dos 9 gêneros. Os valores de especificidade mostram se o monômero pode pertencer ao gênero e a fidelidade é a probabilidade dos monômeros serem encontrados nos gêneros. (Esp = Especificidade/ Fid = Fidelidade)

	1-4 xylose		T-fucose		1-2 fucose		1-3 fucose		1-3,4 fucose		1-2,4 fucose		T-ramnose	
	Esp	Fid	Esp	Fid	Esp	Fid	Esp	Fid	Esp	Fid	Esp	Fid	Esp	Fid
<i>Ankistrodesmus</i>			0.969	1			0.96	0.947	0.844	0.937	0.967	0.777		
<i>Selenastrum</i>			0.969	1	0.836	1	0.96	0.947	0.844	0.937	0.967	0.777	0.881	1
<i>Curvastrum</i>			0.969	1	0.836	1	0.96	0.947			0.967	0.777		
<i>Messastrum</i>	0.814	1	0.969	1	0.836	1	0.96	0.947	0.844	0.937	0.967	0.777		
<i>Monoraphidium</i>	0.814	1					0.96	0.947						
<i>Kirchneriella</i>														
<i>Pseudokirchneriella</i>			0.969	1					0.844	0.937	0.967	0.777	0.881	1
<i>Raphidocelis</i>	0.814	1	0.969	1					0.844	0.937				
<i>Cholorolobium</i>	0.814	1	0.969	1							0.967	0.777	0.881	1

	1-2 ramnose		1-3 ramnose		1-2,3 ramnose		1-2 manose		1-6 manose		1-2,3 manose		1-2,3,4 manose	
	Esp	Fid	Esp	Fid	Esp	Fid	Esp	Fid	Esp	Fid	Esp	Fid	Esp	Fid
<i>Ankistrodesmus</i>	1	0.888					0.91	0.93						
<i>Selenastrum</i>	1	0.888			0.852	1	0.91	0.93						
<i>Curvastrum</i>	1	0.888			0.798	1	0.91	0.93						
<i>Messastrum</i>	1	0.888					0.91	0.93					1	1

<i>Monoraphidium</i>	1	0.888												
<i>Kirchneriella</i>	1	0.888	1	1										
<i>Pseudokirchneriella</i>	1	0.888												
<i>Raphidocelis</i>	1	0.888												
<i>Chlorolobium</i>							0.91	0.93	1	1	1	1		
	1-2 glucose		1-6 glucose		1-3,4 glucose		1-3,6 glucose		1-3,4,6 glucose		T-galactose		1-4 galactose	
	Esp	Fid	Esp	Fid	Esp	Fid	Esp	Fid	Esp	Fid	Esp	Fid	Esp	Fid
<i>Ankistrodesmus</i>	0.965	0.75									0.954	0.909	0.911	0.947
<i>Selenastrum</i>	0.965	0.75			0.844	0.937					0.954	0.909	0.911	0.947
<i>Curvastrum</i>	0.965	0.75	0.793	1							0.954	0.909	0.911	0.947
<i>Messastrum</i>					0.844	0.937	0.744	1			0.954	0.909	0.911	0.947
<i>Monoraphidium</i>					0.844	0.937					0.954	0.909		
<i>Kirchneriella</i>														
<i>Pseudokirchneriella</i>	0.965	0.75			0.844	0.937							0.911	0.947
<i>Raphidocelis</i>			0.793	1	0.844	0.937	0.744	1			0.954	0.909	0.911	0.947
<i>Chlorolobium</i>	0.965	0.75							0.736	1	0.954	0.909	0.911	0.947
	1-6 galactose		1-2,3 galactose		1-3,6 galactose		1-4 gluc acid		1-4,6 gal nac					
	Esp	Fid	Esp	Fid	Esp	Fid	Esp	Fid	Esp	Fid				
<i>Ankistrodesmus</i>	1	0.812	0.903	0.8										
<i>Selenastrum</i>	1	0.812	0.903	0.8	0.798	1								

<i>Curvastrum</i>	0.903	0.8			0.972	1
<i>Messastrum</i>						
<i>Monoraphidium</i>			0.932	1		
<i>Kirchneriella</i>						
<i>Pseudokirchneriella</i>	0.903	0.8			0.972	1
<i>Raphidocelis</i>	0.903	0.8	0.932	1		
<i>Chlorolobium</i>						

Observando os resultados da Tabela 5.4, podemos perceber que 1-3 ramnose apresentou especificidade para o gênero de *Kirchneriella*, aparecendo essa ligação glicosídica somente nesse gênero. Da mesma maneira 1-6 manose e 1-2,3 manose foram duas ligações glicosídicas específicas para *Chlorolobium* e 1-2,3,4 manose foi específica para o gênero *Messastrum*. Ainda analisando o gênero *Chlorolobium* podemos notar que 1-3,6 glucose apresentou especificidade potencial (0,736), porém a fidelidade dessa ligação foi marcante (em outras palavras, 1-3,4,6 glucose apareceu somente em *Chlorolobium*, mas não em todas as espécies estudadas). *Selenastrum* foi outro gênero que apresentou 1-3,6 galactose com potencial de marcador para a espécie (1-3,6 galactose com uma especificidade de 0,798 e fidelidade de 1).

A provável não distinção encontrada no clado contendo *C. pantanale*, *A. stipitatus*, *A. fusiformis*, *P. contorta*, *A. bernardii* e *M. arcuatum* e no clado contendo *K. aperta*, *P. elongata*, *K. obesa*, *A. flexuosus* e *K. pseudoaperta* deve-se ao fato de muitas ligações glicosídicas apresentarem alta fidelidade com os diferentes gêneros.

Para uma melhor interpretação dos dados para ligações glicosídicas, análise de escala multidimensional e uma análise de contribuição das espécies através de porcentagem de similaridade foi feita. Essa análise mostrou que o clado composto unicamente de *K. irregularis* apresentou uma semelhança entre si de 94,41%; o clado de *A. densus* de 96,16%; *M. gracile* de 96,22%; *S. bibraianum* de 90,99%; *C. brauni* de 96,41%; o clado composto por espécies de *Monoraphidium* e *Raphidocelis subcapitata* apresentou semelhança de 48,56%; *C. pantanale*, *A. stipitatus*, *A. fusiformis*, *P. contorta*, *A. bernardii* e *M. arcuatum* apresentou semelhança de 44,62%; e o último clado, *K. aperta*, *P. elongata*, *K. obesa*, *A. flexuosus*, *K. pseudoaperta*, apresentou uma semelhança de 60,70%

5.5 Discussão

Este trabalho foi voltado para a família Selenastraceae, mais especificamente para nove gêneros: *Ankistrodesmus*, *Kirchneriella*, *Selenastrum*, *Curvastrum*, *Messastrum*, *Chlorolobium*, *Monoraphidium*, *Pseudokirchneriella* e *Raphidocelis*. A intenção foi averiguar o poder dos EPS como fator diacrítico para microalgas cocoides dessa família com variações morfológicas sutis.

Podemos observar que os polissacarídeos excretados pelas trinta e uma cepas/espécies fitoplanctônicas estudadas apresentaram composição monomérica semelhante à obtida para outras espécies de Chlorophyceae (Paulsen *et al*, 1994; Metzger *et al*, 1990; Shekharam *et al*, 1989; Crayton 1980; Vogel *et al*, 1978). A análise do dendrograma compondo a Figura 5.1 mostra que a composição dos monômeros agrupam as espécies diferentemente das características diacríticas morfológicas para essas algas. O dendrograma apresenta um grupo composto somente por *Kirchneriella irregularis*, posicionando-se distante das demais espécies do gênero *Kirchneriella* analisadas. Por outro lado, espécies de *Monoraphidium* agruparam-se proximamente, sendo que para os monômeros (Figura 5.1) apresentou um clado contendo somente espécies desse gênero.

O ácido glicurônico apresenta forte associação com *Monoraphidium* e *Raphidocelis* (Tabela 5.3). A forte associação do gênero *Monoraphidium* a três monômeros pode ser uma possível explicação para o aparecimento de um clado composto exclusivamente de suas espécies. A ramnose foi o monômero comum a praticamente todos os gêneros selecionados e provavelmente, sua presença contribuiu para a agregação não distinta das espécies dentro do dendrograma proposto para os monômeros.

Para os monômeros isolados não existe um composto que se destaque a ponto de aparecer como um marcador específico para os gêneros, mas podemos perceber que o

ácido galacturônico, mesmo apresentando uma fraca adesão, ainda assim só aparece para o gênero *Ankistrodesmus*.

Stoloff & Silva (1957) observaram que, para Rhodophyta, quando os gêneros são listados filogeneticamente, as discrepâncias entre as famílias começam a aparecer, apesar do perfil polissacarídico ser sempre o mesmo dentro das espécies do mesmo gênero. De fato, pelas observações do dendrograma na Figura 5.1, comparado com o dendrograma da Figura 5.2, as discrepâncias começaram a aparecer, mesmo que o trabalho seja focado em apenas uma família.

O segundo dendrograma (Figura 5.2) aprofunda ainda mais o estudo dos polissacarídeos desses nove gêneros. A Figura mostra o dendrograma obtido através das ligações glicosídicas dos polissacarídeos. Com o aumento da informação sobre o polissacarídeo, obtivemos nove clados diferentes daqueles obtidos na Figura 5.1.

Quando analisamos a Tabela 5.4, podemos notar que algumas ligações são características exclusivas de determinados gêneros. Somente o gênero *Kirchneriella* apresentou em sua composição a ligação glicosídica 1-3 ramnose e *Chlorolobium* apresentou 1-6 manose e 1-2,3 manose como característica exclusiva. Portanto, mesmo que as posições encontradas no dendrograma da Figura 5.2 mostrem a não agregação entre determinadas espécies, podemos perceber que pequenas características podem sugerir marcadores específicos para diferentes gêneros.

A utilização das ligações glicosídicas mostraram um maior refinamento tanto no agrupamento das espécies, como no encontro de marcadores específicos para os gêneros. Cepas relacionadas à mesma espécie se agruparam dentro de clados específicos, e espécies morfológicamente semelhantes tenderam a se agrupar em um mesmo clado. Podemos notar que para *Monoraphidium* o provável clado relacionado a esse gênero é

basicamente ocupado por suas espécies (4 das 5). Porém, é possível notar a presença da única espécie do gênero *Raphidocelis* agrupada nesse clado, o que coloca em dúvida se essa espécie é realmente pertencente ao gênero *Rhaphidocelis*. Entretanto Garcia *et al* (2016), descarta tal possibilidade, garantindo que *Raphidocelis* se apresenta em um clado distinto. Portanto, o clado de *Monoraphidium* e *Raphidocelis*, provavelmente apresentou agregação devido à presença 1-4 ácido glicurônico, que além de apresentar alta especificidade para os dois gêneros (0.932) também apresentou uma alta fidelidade (1).

O gênero *Kirchneriella* foi o grupo mais diversificado, aparecendo em 3 cladogramas diferentes. Essa variação dentro do gênero também foi observada em trabalhos envolvendo a genética desse grupo (Garcia *et al* 2016).

Percival & Macdowell (1967) já haviam observado que em *Cladophorales* a proporção dos principais açúcares, constituintes da parede, variava de espécie para espécie, mesmo utilizando as mesmas condições de cultivo e de extração. Notaram ainda que o polissacarídeo, também constituintes da parede, de *Urospora* era extremamente diferente daquele encontrado para as espécies de *Cladophorales*. Os resultados encontrados para a Tabela 5.2 mostram que, apesar da presença dos mesmos monômeros, suas proporções podem sugerir a associação a alguns grupos e, dessa forma, mostrarem afinidade a gêneros específicos, como pode ser notado para o clado de *Monoraphidium*.

Segundo Percival (1979), os organismos pertencentes a *Ulvophyceae* podem ser classificados em dois grupos: 1) polissacarídeos sulfatados ricos em ácidos urônicos e contendo ramnose, xylose e, em alguns casos, galactose; 2) polissacarídeos sulfatados pobres de ácidos urônicos constituídos de arabinose, galactose e, em alguns casos, xylose. Desse modo, podemos sugerir que grupos específicos de polissacarídeos devem estar associados a determinadas espécies. De acordo com a Tabela 2, a presença de ligações glicosídicas fortemente específicas para diferentes gêneros pode ser um indicio de que,

aprofundando-se ainda mais na composição dos polissacarídeos, maiores diferenças serão encontradas.

Mesmo com o trabalho sendo focado dentro do universo de uma única família, o emprego de polissacarídeos para discriminar *taxa* mais elevados pode ser utilizado. Domozych *et al* (2012) observaram que a composição bioquímica das paredes celulares de diferentes classes de algas verdes apresentam diferenças sutis, por exemplo Trebouxiophyceae como sendo a única classe de Chlorophyta que apresentou β -galactofuranose.

Kamenarska (2006) observou que a diferença entre Phaeophyta e Rodophyta era devido a concentração de carboidratos livres. Enquanto as Phaeophyta apresentaram baixas concentrações e poucos monômeros (glucose, frutose e sucrose), as Rodophyta apresentaram um significativo número de carboidratos e, frequentemente, altas concentrações. Essa constatação já demonstra que o potencial quimiotaxonômico dos polissacarídeos deve-se focar também nas relações de variações dentro do polissacarídeo como um todo e não somente dentro das diferenças de concentração dos monômeros, os quais, por si só, já variam de espécies para espécie.

Baseando-se na ligação glicosídica dos polissacarídeos podemos ver que conseguimos agrupar cepas da mesma espécie, uma vez que a força de adesão entre elas foi acima de 90%. O mesmo não pode ser observado quando utilizamos espécies diferentes com um único representante; entretanto, podemos notar que para esses clados a força de adesão foi baixa.

Como as espécies são amplamente definidas pelos caracteres morfológicos utilizados atualmente, qualquer variação que não seja concordante a essas características diacríticas necessita de uma maior explicação. Fawley *et al* (2005) encontraram

evidências que suportam que *Ankistrodesmus fusiformis* não se apresenta como um grupo monofilético, o que pode sugerir que a variação de distância encontrada entre as espécies de *Ankistrodesmus* seja esperada.

De modo geral, as espécies estão atualmente definidas sob o conceito morfológico e, dessa forma, é esperado que os dendrogramas gerados suportem os resultados morfológicos aceitos. Porém, muitos trabalhos com Selenastraceae mostram altos níveis de variabilidade entre as espécies que são referentes a um único táxon e, frequentemente, ocorrem sugestões de que essa variabilidade representa múltiplos taxa (Nygaard *et al* 1986).

É evidente que para a taxonomia de muitos gêneros de microalgas a estrutura celular "natural" não é o suficiente. Portanto, utilizando-se sempre os mesmos padrões de extração do polissacarídeo e as mesmas condições de cultivo, é possível a utilização do EPS como característica taxonômica para um determinado grupo de espécies.

5.6 Conclusão

Encontramos características que podem ser definidas para determinados gêneros

- 1) Os monômeros não apresentaram características específicas para os gêneros, apesar de mostrar que ácido glicurônico é sugestivo de *Monoraphidium* e *Raphidocelis* e o ácido galacturônico ser exclusivo para *Ankistrodesmus*, ainda que com baixa resolução para esse gênero
- 2) As ligações apresentaram características específicas para gêneros:
 - a) 1-3 Rhamnose foi específica para o gênero *Kirchneriella*
 - b) 1-6 manose e 1-2,3 manose foi específica para *Chlorolobium*
 - c) 1-4 ácido glicurônico foi específico para o clado que continha *Monoraphidium* e *Raphidocelis*

Conclusões Finais

Podemos perceber que a importância da caracterização dos polissacarídeos para esses gêneros passa primeiramente pela pouca informação a respeito de sua composição. Dessa forma podemos notar que a variabilidade do polissacarídeo é única de gênero para gênero, entre espécie e em até entre cepas.

Analisando somente os polissacarídeos isolados dentro de um pequeno grupo, não conseguimos notar a capacidade de adesão entre as cepas, porém quando expandimos isso para uma maior quantidade de representantes, podemos notar a adesão das cepas da mesma espécie dentro de clados específicos (Ex: Figura 5.2 – *K. Irregularis*, *S. bibraianum*, *C. braunii*, *A. densus*, *M. gracile*)

Apesar de conseguirmos notar padrões de diferenciação a reprodutibilidade filogenética fica comprometida pelo baixo grau de adesão, fazendo com que monômeros e/ou ligações glicosídicas mais comuns e abundantes apresentem maior impacto na agregação.

Como a família Selenastraceae ainda não apresenta uma total compreensão filogenética, o estudo quimiotaxonômico baseado em polissacarídeos pode nos dar indicativos de pequenas características de agregação entre os gêneros dessa família.

Referências Bibliográficas

- Ahrazem, O., Prieto, A., Bernabe, M., Leal, J.A. FISS polysaccharides: chemotaxonomic characters and evolutionary indicators for Plectomycetes. *Studies in Mycology*. 2002; 47: 37-48.
- Allard, B., Casadevall, E. Carbohydrate composition and characterization of sugars from the green microalga *Botryococcus braunii*. *Phytochem*. 1990, 29:6:1875-1878
- Allredge, A.L., Gotschalk, C.C., Direct observations of the mass flocculation of diatom blooms: characteristics, settling velocities and formation of diatom aggregates. *Deep Sea Res*. 1989; 36, 2:159-171.
- Archanjo, N.C.P., Bagatini, I.L., Sarmiento, H., Vieira, A.A.H. Lectins as terminal monosaccharides markers in green freshwater microalgae.
- Atkins, E. Conformation in polysaccharides and complex carbohydrate. *Proc. Int. Symp. Biomol Struct. Interactions* 1985 8:1:2:375-387
- Barker, S.A., Bourne, E.J., Whiffen, D.H. Use of infrared in the determination of carbohydrate structure. In.: *Methods of Biochemical Analysis*. 1956. Interscience Publisher Vol III. Birmigham, England
- Barker, S.A.; Bourne, E.J., Stacey, M., Whiffen, D.H. Infra-red spectra of carbohydrate. Part I. Some derivatives of D-glucopyranose. *J. Chem. Soc.* 1954; 171-176
- Barrow, K.D., Karsten, U., King, R.K, West, J.A. Floridoside in the genus *Laurencia* (Rhodomelaceae: Ceramiales) – a chemosystematic study. *Phycologia* 1995; 34: 279-283
- Barsett, H., Paulsen, B.S., Habte, Y. Further characterization of polysaccharides in seeds from *Ulmus glabra* Huds. *Carboh. Polymer*. 1992; 18:125-130.
- Beardall, J., Raven J.A. *Algal metabolism*. John Wiley & Sons, London 2012
- Bittar, T. B., Vieira, A.A. H. Transparent exopolymer particles (TEP) formation from capsules of *Anabaena spiroides* (Cyanobacteria) in culture. *J. Phycol.* 2010; 46:243-247.
- Björndal, H., Helletqvist, C.G., Lindberg, B., Angew, S.S. Gas-liquid chromatography and mass spectrometry in methylation analysis of polysaccharides. *Chem. Internat* 9:8:610-619
- Blumreisinger, M., Meindl, D., Loos, E. Cell wall composition of chlorococcal algae. *Phytochem*. 1983 22:1603-1604.
- Carbonero, E.R., Montai A.V., Woranovicz-Barreira, S.M., Gorin, P.A.J., Iacomini, M. Polysaccharides of lichenized fungi of three *Cladina* spp.: significance as chemotypes. *Phytochem*. 2002; 61:6: 681-686.

- Chiovitti, A., Higgins, M.J., Harper, R.E., Wetherbee, R., Bacic, A. The complex polysaccharide of the raphid diatom *Pinnularia viridis* (bacillariophyceae). *J. Phycol.* 39:543-554
- Chiovitti A., Liao, M-L, Kraft, G.T., Munro S.L.A., Craik, D.J., Bacic, A. Cell wall polysaccharides from Australian red alga of the family Solieriaceae (Gigartinales, Rhodophyta): highly methylated carrageenans from the genus *Rhabdonia*. *Bot. Mar.* 1996; 39: 47-59.
- Colombo, V., Vieira A.A.H. & Moraes G. Microbial degradation of the extracellular polysaccharide produced by *Anabaena spiroides* (Cyanobacteria). *Rev. Microbiol.* 2004; 35: 110-116.
- Crayton M.A. Presence of a sulfated polysaccharide in the matrix of *Platydorina caudata* (Volvocales, Chlorophyta). *J. Phycol.* 1980; 16: 80-87.
- Domozych DS, Ciancia M, Fangel JU, Mikkelsen MD, Ulvskov P, Willats WGT. The cell walls of green algae: a journey through evolution. *Frontiers in plant Science* 2012; 3:73-79
- Domozych, D.S., Stewart, K.D., Mattox, K.R. The comparative aspects of cell wall chemistry in the green algae (Chlorophyta). *J. Mol. Evol.* 1980; 15: 1-12
- D'Souza, L., Devi, P. Shrinidar, D., Naik, C.G. Use of transform infrared (FTIR) spectroscopy to study cadmium-induced change in *Padina tetrastratica* (Hawck). *Anal. Chem. Insights* 2008, 3:135-143
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith F. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Anal. Chem.* 1956; 28:350-356.
- Dufrene M, Legendre P. Species assemblages and indicator species: the need for a flexible asymmetrical approach. *Ecological Monographs* 1997; 67:3: 345-366
- Falshaw, R., Furneaux, R.H. Chemotaxonomy of New Zealand red algae in the family Gigartiniaceae (Rhodophyta) based on galactan structure from tetrasporophyte life-stage. *Carboh. Res.* 2009; 344: 210-216.
- Fawley, M.W., Fawley, K.P., Owen, H. A. Diversity and ecology of small coccoid green algae from Lake Itasca, Minnesota, USA, including *Meyerella planktonica* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta). *Phycol.* 2005; 44: 35-48.
- Fawley, M.W, Dean, M.L., Dimmer, S.K., Fawley, K.P. Evaluating the morphospecies in the Selenastraceae (Chlorophyceae, Chlorophyta). *J. Phycol.* 2005; 42: 142–154
- Flemming H.C., Wingender, J. The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiol.* 2010; 8: 623-633.
- Freire-Nordi, C.S., Vieira, A.A.H., Nascimento, O.R. Selective permeability of the extracellular envelope of the microalga *Spondylosium panduriforme* (Chlorophyceae) as revealed by electron paramagnetic resonance. *J. Phycol.* 1998 34:4: 631-637.

Fukushi-Fujikura, Y., Harada, N., Othuru, O., Maeda, M. Cell wall polysaccharides of *Pseudodictyosiphon constrictus* with special reference to its systematics. *Phytochem.* 1991; 30:1:201-203

Garcia, T. S., Bock C., Sant'Anna C. L., Bagatini I. L., Wodniok S., Vieira A. A. H. Selenastraceae (Sphaeropleales, Chlorophyceae): rbcL, 18S rDNA and ITS-2 secondary structure enlightens traditional taxonomy, with description of two new genera, *Messastrum* gen. nov. and *Curvastrum* gen. nov. *Fottea*, in press.

Gargiulo, V., De Castro, C., Lanzetta, R., Jiang, Y, Xu, LH., Jiang, CL., Molinaro, A., Parilli, M. Structural elucidation of the capsular polysaccharide isolated from *Kaistella flava*. *Carboh. Res.* 2008; 343: 2401-2405.

Giroldo, D., Ortolano, P.I.C., Vieira, A.A.H. Bacteria-algae association in batch cultures of phytoplankton from a tropical reservoir: the significance of algal carbohydrate. *Freshwater Biology* 2007; 52:7:1281-1289.

Giroldo, D., Vieira, A.A.H., Paulsen, B.S. Microbial degradation of extracellular polysaccharides released by a tropical strain of *Staurastrum orbiculre* (Zygnematophyceae). *Phycol.* 2005; 44:6: 671-677.

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

Gomez-Ordóñez, E., Rupérez, P. FTIR-ATR spectroscopy as a tool for polysaccharide identification in edible brown and red seaweeds. *Food Hydrocol.* 2011; 6:1514-1520

Guillard, R.R.L, Lorenzen C.J. Yellow-green algae with chlorophyllide C. *J. Phycol.* 1972; 8:1: 10-14.

Griffiths, M. J., Garcin, C., van Hille, R. P., & Harrison, S. T. Interference by pigment in the estimation of microalgal biomass concentration by optical density. *J Microbiol Methods*, 2011; 85(2): 119-123.

Harris, M.J., Turkey, J.R. Sulphate of monosaccharides and derivates: Part VIII – Infrared spectra and optical rotations of some glycoside sulphate. *Carboh. Research* 1970 51:56

Haug, A., Myklestad, S. Polysaccharides of marine diatoms with special reference to *Chaetoceros* species. *Mar. Biol.* 1976; 34: 217-222.

Hu, C., Liu, Y., Paulsen, B.S., Petersenc, D., Klaveness, D. Extracellular carbohydrate polymer from fice desert soil algae with different cohesion in the stabilization of fine sand grain. *Carboh. Polym.* 2003. 54:33-42.

Hoagland, K.D., Rosolvski, J.R., Gretz, M.R., Roelner S.C. Diatom extracellular polymeric substances: function, fine structure, chemistry and physiology. *J. Phycol.* 1993; 29: 537-566.

Kamenarska Z, Ivanova A, Stancheva R, Stoyneva M, Stefanov K, Dimitrova-Konaklieva S, Popov S. Volatile compounds from some black sea red algae and their chemotaxonomic application. *Botanica Marina* 2006; 49:1: 47-56

- Karsten, U., Michalik, D., Michalik, M., West, J.A. A new unusual low molecular weight carbohydrate in the red algal genus *Hypoglossum* (Delesseriaceae, Ceramiales) and its possible function as an osmolyte. *Planta*. 2005. 222:319-326.
- Kim, J.B., Carpita, N.C. Changes in esterifications of the uronic acid groups of cell wall polysaccharides during elongations of maize coleoptiles. *Plant. Physiol.* 1992; 98: 646-653.
- Kiemle, S.N., Domozych, D.S., Gretz M.R., The extracellular polymeric substances of desmids (Conjugatophyceae, Streptophyta): Chemistry, structural analysis and implications in wetland biofilms. *Phycologia* 2007; 46:617-627
- Kloareg, B., Quatrano, R. S. Structure of cell walls of marine algae and ecophysiological functions of the matrix polysaccharides. *Oceanography and Marine Biologu Annual Review*. 1988; 26:259-315
- Komárkova-Legnerova, J. The systematics and ontogenesis of the genera *Ankistrodesmus cord* and *Monoraphidium gen. nov.* In Fott B, editors. *Studies in Phycologia*. Academia Publishing House of the Czechoslovak Academy of Science, Praha; 1969. pp. 75-122.
- Kremer, B.P. (1980). Taxonomic implication of algal photoassimilate patterns. *Br. Phycol. J.* 15:229-409.
- Krienitz, L., Bock, C., Nozaki, H., Wolf, M. SSU rRNA gene phylogeny of morphospecies affiliated to bioassay alga “*Selenastrum caprocornutum*” recovered the polyphyletic origin of crescent-shaped chlorophyta. *J. Phycol.* 2011; 47: 880-893
- Krienitz, L., Ustinova, I., Friedel, T., Huss, A.A.R. Traditional generic concepts versus 18S rRNA gene phylogeny in the green algal family Selenastraceae (Chlorophyceae, Chlorophyta). *J. Phycol.* 2001; 37: 852-865.
- Lewin, R.A. Extracellular polysaccharides of green algae. *Canadian Journal of Microbiology* 1956, 665-672
- Lombardi, A.T., Vieira, A.A.H., Sartori, A.L. Mucilaginous capsule adsorption and intracellular uptake of copper by *Kirchneriella aperta*. *J. Phycol.* 2002; 38: 332-337.
- Lombardi, A.T., Vieira, A.A.H. Lead and copper complexing extracellular ligands released by *Kirchneriella aperta* (Chlorococcales, Chlorophyta). *Phycol.* 1999; 4:283-288.
- Lombardi, A.T., Vieira, A.A.H. Lead and copper toxicity to *Nephrocytium lunatum* (Chlorophyceae) and their complexation with excreted material. *Revista Brasileira de Microbiologia* 1998; 29: 44-48.
- Lowry, O.H., Rosebrough N.H., Farr, A.L., Randal, R.J. Protein measurements with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951; 193: 265-275.
- Manly, B.F.J. Métodos estatísticos multivariados: uma introdução. 3rd ed. Porto Alegre: Bookman, 2008.

- Marvan, P., Komárek, J., Comas, A. Weighting and scaling of features in numerical evaluation of coccal green algae (genere of the Selenastraceae). *Algol. Studies*. 1984; 37: 363-399.
- Mathlouthi, M., Koenig, J.L. Vibrational spectra of carbohydrate. *Adv. Carbohydr. Chem Biochem*. 1986; 44:7-89
- Metzger, P., Allard, B., Casadell, E. Berkaloff, C. Couté, A. Structure and chemistry of a new race of *Botryococcus braunii* (*Chlorophyceae*) that produces lycopadiene, a tetraprenoid hydrocarbon. *J. Phycol.* 1990; 26: 258-266.
- Miller, I.J., Mollion, J. Evaluation of the structure of galactans from *Carpopeltis* sp., a member of the Halymeniales in the western Indian ocean. *Bot. Mar.* 2006; 49:1: 79-85.
- Miller, I.J. The structure of polysaccharide from *Grateloupia intestinalis* in New Zealand. *Bot. Mar.* 2005; 48: 157-166.
- Miller, I.J., Blunt, J.W. The structure of the galactan from *Acetabularia nitidissima* (Halymeniales, Rhodophyta). *Bot. Mar.* 2005; 48: 137-142.
- Mishra, A., Jha, B. Isolation and characterization of extracellular polymeric substances from micro-algae *Dunaliella salina* under salt stress. *Bioresource Technology* 2009, 100:3382-3386
- Moreira, I.C., Bianchini Junior, I., Vieira, A.A.H. Decomposition of dissolved organic matter released by na isolate of *Microcystis aeruginosa* and morphological profile of the associated bacteria community. *Brazilian Journal of Biology* 2011; 71: 1-7.
- Myklestad, S.M. Release of extracellular products by phytoplankton with special emphasis on polysaccharides. *Sci. Total. Environ.* 1995; 164: 155-164.
- Nush, E.A. Comparison of different methods for chlorophyll and pheopigment determination. *Arch. Hydrobiol. Bech. Stuttgart*, 1980; 14:14-36.
- Oertel, A., Aichinger, N., Hochreiter, R., Thalhamer, J. Lütz-Meindl, U. Analysis of mucilage secretion and excretion in *Micraesterias* (Chlorophyta) by means of immunoelectron microscopy and digital time lapse video microscopy. *J. Phycol.* 2004 40:711-720
- Paulsen, B.T., Aslaksen, T., Freire-Nordi, C.S., Vieira A.A.H. Extracellular polysaccharides from *Ankistrodesmus densus* (Chlorophyceae). *J. Phycol.* 1998: 34:4: 638-641.
- Paulsen, B.T., Vieira, A.A.H. Studies on the composition of extracellular polysaccharides produced by *Spondylosium panduriforme* (Desmidiaceae). *J. Phycol.* 1994; 30: 638-641.
- Paulsen, B.S., Vieira, A.A.H., Klaveness, D. Structure of extracellular polysaccharides produced by a soil *Cryptomonas* sp. (Cryptophyceae). *J. Phycol.* 1992; 28: 61-66.
- Percival F. The polysaccharides of green, red and brown seaweeds: their basic structure, biosynthesis and function. *Br. Phycol. J.* 1979; 14:103-117
- Percival, E. & McDowell, R.H. Chemistry and Enzymology of Marine Algal Polysaccharides, London, Academic Press 1967

- Reinhold, V.N. Gas-liquid chromatographic analysis of constituent carbohydrates in glycoproteins. *Methods Enzimol.* 1972; 25: 244-249.
- Rees, D.A., Scott, W.E. Polysaccharide conformation. Part VI. Computer model-building for linear and branched pyranoglycan. Correlations with biological function. Preliminary assessment of inter-residue in aqueous solution. Further interpretation of optical rotation in terms of chain conformation. *J. Chem. Soc. B.* 1971 469-479
- Samuelson, A.B., Paulsen, B.S., Wold, J.K., Otsuka, H., Yamada, H., Espevik, T. Isolation and partial characterization of biologically active polysaccharides from *Plantago major* L. *Phytother. Res.* 1995; 9: 211-218.
- Shang, N., Rihua, Xu, R., Li, P. Structure characterization of an exopolysaccharide produced by *Bifidobacterium animalis* RH. *Carboh. Polym.* 2013; 91:1:128-134
- Sheikharam, M., Venkataraman, L.V., Salimath P. Carbohydrate composition and characterization of a watersoluble mannan isolated from the green algae *Scenedesmus obliquos*. *Arch. Hydrobiol. Suppl.* 1989; 82: 469-474.
- Sheng, J., Yu, F. Xin, Z., Zhao, L., Xiaojun, Z., Hu, Q. Preparation, identification and their antitumor activities *in vitro* of polysaccharides from *Chlorella pyrenoidosa*. *Food Chem.* 2007; 105:2:553-559
- Simon-Colin, C., Kervarec, N., Pichon, R., Deslandes, E. NMR ¹³C-isotopic enrichment experiments to study carbon-partitioning into organic solutes in the red alga *Grateloupia doryphore*. *Plant Physiol. And Biochem.* 2004; 42:1:21-26
- Sims, I.M., Bacic, A. Extracellular polysaccharides from suspension-cultures of *Nicotiana plumbaginifolia*. *Phytochem.* 1995; 38: 1397-1405.
- Stoloff, L. & Silva, P. An attempt to determine possible taxonomic significance of the properties of water extractable polysaccharides in red algae. *Economic Botany* 1957;11: 327-330.
- Takeda, H. Sugar Composition of the cell wall and the taxonomy of *Chlorella*. *Physiol.* 1991; 27: 224-232.
- Tait, M.J., Suggett, A., Franks, F., Ablett, S., Quickenden, P.A. Hydration of monosaccharides: A study by dielectric and nuclear magnetic relaxation. *J Solution Chem.* 1972 1:2:131-151
- Tipson, R.S. *Infrared Spectroscopy of Carbohydrate*. United States Department of Commerce, National Bureau of Standards. 1968
- Vieira, A.H.H., Ortolano, P.I.C., Giroldo, D., Dellamano-Oliveira, M.J., Bittar, T.B., Lombardi, A.T., Sartori, A.L., Paulsen, B.S. Role of hydrophobic extracellular polysaccharide of *Aulacoseira granulata* (Bacillariophyceae) on aggregate formation in a turbulent and hypereutrophic reservoir. *Limnol and Oceanogr.* 2008; 53: 1887-1889.
- Vieira, A.A.H., Nascimento, O.R. Copper immobilization by high molecular weight compounds excreted by aging culture of *Ankistrodesmus densus* (chlorococcales). *Revista de microbiologia* 1989; 20:1: 133-139.

- Vieira, A.A.H. Introdução aos Métodos de culturas do fitoplâncton marinho. Boletim do Instituto Oceanográfico 1977; 26: 303-338.
- Villanueva, R.D., Montaña, M.N. Fine chemical structure of carrageenan from the commercially cultivated *Kappaphycus striatum* (Sacol variety) (Solieriaceae, Gigartinales, Rhodophyta). J. Phycol. 2003; 39:3: 513-518.
- Vogel, S.L., Frish, H.L., Gotham, I.J. Quantitative assay of dissolved amino acid and sugar excreted by *Chlamydomonas reinhardtii* (Chlorophyceae) and *Eunglena gracilis* (Euglenophyceae). J. Phycol. 1978; 14: 403-406.
- Volkman, J.K., Dunstan, G.A., Jeffrey, S.W., Keamey, P.S. Fatty acids from microalgae of the genus Pavlova. Phytochem. 1991; 30: 1855-1859.
- Wagner, R., Simas, F.F., Sasaki, G.L, Iacomini, M., da Silva, M.A., Gorin, P.A.J. A high-viscosity glycolucuronomannan from the gum of exudate of *Vochysia thyrsoidea*: Comparison with of the other *Vochysia spp*. Carboh. Polymer. 2008; 72:3: 382-389.
- Wood, A.M., Van Valen, L.M. Paradox lost? On the release of energy-rich compounds by phytoplankton. Mar. Microb. Food Webs 1990; 4: 103-111.
- Wijsekara, I., Pangestuti, R., Kim S. Biological activities and potential health benefits of sulfated polysaccharides derived from marine algae. Carboh. Polymer. 2011 84:1: 14-21
- Wustman, B. A, Gretz M.R. Hoagland K. D. 1997. Extracellular matrix assembly in diatoms (bacillariophyceae) I. A model of adhesive based on chemical characterization and localization of polysaccharides from marine diatom. *Achanthes longipes* and other diatoms. *Plant Physiol*, 113 1059-69
- Yee, W. Microalgae from the Selenastraceae as emerging candidates for biodiesel production: a mini review. World J. Microbiol. Biotechnol. 2016 32:4:64

