

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

PRODUÇÃO DE EXOPOLISSACARÍDEOS  
EM DIFERENTES FASES DO CRESCIMENTO  
DE *Staurastrum tohopekaligiensis* Wolle (CHLOROPHYCEAE)

Silvana Elizabeth de Méo Dulcini

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais, do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ecologia e Recursos Naturais, área de concentração em Ecologia e Recursos Naturais.



SÃO CARLOS

1996



Aos meus três amores,  
Sérgio,  
Fernando e  
Daniela.

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Armando Augusto Henriques Vieira, pela orientação durante a realização deste trabalho.

Aos membros da banca examinadora, Profa. Dra. Cristina Souza Freire Nordi, Prof. Dr. Gilberto Moraes, Prof. Dr. Irineu Bianchini Jr. e Profa. Dra. Maria do Carmo Calijuri, pelas sugestões e críticas construtivas.

À Profa. Dra. Berit Smestad Paulsen, pelas análises de cromatografia gasosa dos compostos polissacarídicos.

Ao Prof. Dr. Arno Schwantes e Profa. Dra. Maria Luiza Schwantes, pelo empréstimo da centrífuga refrigerada.

Aos companheiros do Laboratório de Bioquímica e Fisiologia de Algas, Cristina, Sandra, Danilo, Buda, Gleyci, Kátia, Maria do Carmo e Luiz, pela amizade e trocas de idéias.

Aos queridos amigos Lúcia, Cristina Correa, Romilda, Aninha, Patrícia, Alice, Heitor, Chico e Jorge, pelo carinho e incentivo, que me deram forças para seguir em frente, mesmo quando tudo parecia sem solução.

Às técnicas Tereza Piassi e Jurity Machado Milan, pela gentileza com que me facilitaram o uso de seus equipamentos.

À Amábile, pela simpatia.

À Ana Tereza Lombardi, pela paciência, carinho e auxílio na fase final da elaboração desta dissertação.

Ao Conselho Nacional de Pesquisas (CNPq) pelo apoio financeiro concedido.

À Universidade Federal de São Carlos e ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais, pela oportunidade e condições de realizar este trabalho.

Aos meus pais e meus sogros, por acreditarem em mim e por todo o apoio que me deram, sem o qual não teria sido possível a finalização deste trabalho.

Ao Sérgio Luiz pelo estímulo, amor, carinho e compreensão.

Aos meus filhos muito queridos, Fernando e Daniela, que, na inocência de sua infância, tiveram que se privar de inúmeras horas de companhia materna em prol da realização deste trabalho, e, mesmo assim, souberam compreender e respeitar minha escolha.

A todos aqueles que direta ou indiretamente auxiliaram para que este trabalho pudesse ser realizado.

## RESUMO

Neste trabalho foram realizados experimentos de laboratório com o objetivo de se verificar a produção e discutir algumas propriedades dos exopolissacarídeos capsulares e dissolvidos em diferentes fases do crescimento de *Staurastrum tohopekaligiensis* Wolle. A alga foi isolada do Lagoa do Infernã (Estação Ecológica de Jataí), e cultivada axenicamente em meio de cultura artificial, sob condições controladas de luz, fotoperíodo, temperatura e aeração. O material excretado foi obtido ao final de 25 e 48 dias de cultivo (respectivamente denominadas culturas "jovem" e "velha"), separando-se as células do excretado dissolvido (polissacarídeo extracelular dissolvido) por centrifugação. As células foram lavadas para remoção do material dissolvido e suas cápsulas foram extraídas por aquecimento e agitação. O polissacarídeo extracelular dissolvido (PED) e o polissacarídeo capsular (PC), desse modo obtidos, foram concentrados, dialisados e liofilizados. Foi observado um acúmulo de exopolissacarídeos no meio de cultura durante a fase estacionária. Análises de cromatografia de filtração em gel revelaram que, tanto o PED quanto o PC, de ambas as idades celulares, apresentaram-se formados por duas frações "A" e "B", com peso molecular maior ou igual a  $2 \times 10^6$  daltons e de cerca de  $2 \times 10^6$  daltons, respectivamente. Os dados de cromatografia de troca iônica mostraram grandes semelhanças entre o PED e o PC de ambas as idades celulares, sendo que todos apresentaram natureza ácida. Quando são consideradas as diferentes épocas do ciclo de crescimento, a única variação observada nos compostos polissacarídicos foi o aumento da participação percentual da fração "B" do PC em relação à fração "A" em culturas "velhas". Análises bioquímicas revelaram que o material extracelular foi composto de uma porção polissacarídica maior não sulfatada e de uma porção proteica menor. Através de cromatografia gasosa foram obtidas as composições monoméricas do PED e do PC. Nestes dois polissacarídeos, foram encontrados, em proporções pouco diferenciadas: 1) os açúcares neutros: fucose, galactose, glicose, manose, ramnose, arabinose, xilose e 3-O-metil galactose; 2) os açúcares ácidos: ácido galacturônico e ácido glucurônico. Os mais abundantes foram fucose, galactose glicose, tanto no PED quanto no PC.

## ABSTRACT

Laboratory experiments were carried out with the aim of studying the production of dissolved and capsular exopolysaccharides in different growth ages by *Staurastrum tohopekaligiensis* Wolle. This microalga was isolated from a marginal lagoon of the Mogi-Guaçu River, SP-Brazil. The cells were grown axenically in artificial culture medium under controlled conditions of light intensity, temperature, aeration and light/dark cycle. After 25 and 48 days of growth, the cells were harvested by centrifugation, washed with distilled water by centrifugation, resuspended in distilled water, and submitted to 40 °C under mixing with a magnetic stirrer to extract the capsules. The capsular material and the dissolved one were both filtered, concentrated, dialyzed and freeze-dried. The production of exopolysaccharides was greater in the stationary growth phase than in the exponential one. Gel filtration chromatography analysis revealed that both the capsular and the extracellular polysaccharides obtained at different growth ages can be fractioned in two fractions, "A" and "B". Fraction "A" presented a molecular weight close to or larger than  $2 \times 10^6$  daltons, while fraction "B" of  $2 \times 10^6$  daltons, approximately. Ion exchange chromatography data showed great similarities between capsular polysaccharide and extracellular polysaccharide, both having acid nature. When different growth ages are considered, a significant variation was observed in relation to the percentual participation of fractions "A" and "B" of the capsular polysaccharide. It was observed that fraction "B" from "old" cultures represents 92% of the total. Biochemical analysis revealed that the extracellular material does not have a sulphate group but has a proteic fraction. Gas chromatography analysis of extracellular and capsular polysaccharides revealed the presence of neutral sugars and acid sugars. The neutral sugars are: fucose, galactose, glucose, mannose, rhamnose, arabinose and 3-O-methyl galactose and the acid ones are: galacturonic acid and glycuronic acid.



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1a: Curva de crescimento de *S. tohopekaligiensis*. Constante relativa de crescimento:  $K=0,06$ . Tempo de geração:  $G = 5$  dias..... 16
- Figura 1b: Variação temporal dos teores de clorofila a..... 17
- Figura 1c: Variação temporal dos teores de carboidratos totais dissolvidos e da relação entre os carboidratos totais dissolvidos e número de células..... 18
- Figura 2a: Cromatograma de filtração em gel Sephacryl S-400 do PED de cultura “jovem”. As razões  $V_e/V_t$  para cada fração estão indicadas acima dos picos. “A” e “B” são as frações e BD, o dextran de 2.000.000 daltons. Coluna 1,6 x 60 cm, fluxo: 0,4 ml/min..... 19
- Figura 2b: Cromatograma de filtração em gel Sephacryl S-400 do PED de cultura “velha”. As razões  $V_e/V_t$  para cada fração estão indicadas acima dos picos. “A” e “B” são as frações e BD, o dextran de 2.000.000 daltons. Coluna 1,6 x 60 cm, fluxo: 0,4 ml/min..... 20
- Figura 3a: Cromatograma de filtração em gel Sephacryl S-400 do PC de cultura “jovem”. As razões  $V_e/V_t$  para cada fração estão indicadas acima dos picos. “A” e “B” são as frações e BD, o dextran de 2.000.000 daltons. Coluna: 1,6 x 60 cm, fluxo: 0,4 ml/min..... 21

- Figura 3b: Cromatograma de filtração em gel Sephacryl S-400 do PC de cultura “velha”. As razões  $V_e/V_t$  para cada fração estão indicadas acima dos picos. “A” e “B” são as frações e BD, o dextran de 2.000.000 daltons. Coluna: 1,6 x 60 cm, fluxo: 0,4 ml/min.....22
- Figura 4: Cromatograma de filtração em gel Sephacryl S-500 do PED de cultura “velha”. As razões  $V_e/V_t$  para cada fração estão indicadas acima dos picos. “A” e “B” são as frações e BD, o dextran de 2.000.000 daltons. Coluna: 1,6 x 60 cm, fluxo: 0,4 ml/min.....23
- Figura 5a: Cromatograma de filtração em gel Sephacryl S-500 do PC de cultura “jovem”. As razões  $V_e/V_t$  para cada fração estão indicadas acima dos picos. “A” e “B” são as frações e BD, o dextran de 2.000.000 daltons. Coluna: 1,6 x 60 cm, fluxo: 0,4 ml/min.....24
- Figura 5b: Cromatograma de filtração em gel Sephacryl S-500 do PC de cultura “velha”. As razões  $V_e/V_t$  para cada fração estão indicadas acima dos picos. “A” e “B” são as frações e BD, o dextran de 2.000.000 daltons. Coluna: 1,6 x 60 cm, fluxo: 0,4 ml/min.....25
- Figura 6a: Cromatograma em DEAE-Sepharose do PED de cultura “velha”, com um gradiente salino de 0,05 a 2,5 M de NaCl. Coluna 1,6 x 60 cm, fluxo: 1 ml/min.....27
- Figura 6b: Cromatograma em DEAE-Sepharose do PC de cultura “jovem”, com um gradiente salino de 0,05 a 2,5 M de NaCl. Coluna 1,6 x 60 cm, fluxo: 1ml/min.....28
- Figura 6c: Cromatograma em DEAE-Sepharose do PC de cultura “velha”, com um gradiente salino de 0,05 a 2,5 M de NaCl. Coluna 1,6 x 60 cm, fluxo: 1ml/min.....29



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Participações percentuais das frações "A" e "B" no PED e no PC de culturas "jovem" e "velha" .....26

Tabela 2: Percentual de açúcares presentes no PED e no PC.....30

## SUMÁRIO

1.	Introdução.....	1
1.1.	Objetivos.....	6
2.	Material e Métodos.....	7
2.1.	Descrição do organismo.....	7
2.2.	Culturas.....	8
2.3.	Dados fisiológicos.....	8
2.3.1.	Curva de crescimento de <i>S. tohopekaligiensis</i> Wolle.....	8
2.3.2.	Clorofila a.....	9
2.3.3.	Carboidratos totais dissolvidos.....	10
2.4.	Obtenção do material polissacarídico.....	10
2.5.	Caracterização do polissacarídeo extracelular dissolvido (PED) e do polissacarídeo capsular (PC) de diferentes idades de <i>S. tohopekaligiensis</i> .....	11
2.5.1.	Mecanismo de cromatografia de filtração em gel.....	11
2.5.2.	Procedimento de cromatografia de filtração em gel.....	12
2.5.3.	Mecanismo de cromatografia por troca iônica.....	13
2.5.4.	Procedimento de cromatografia por troca iônica.....	14
2.5.5.	Mecanismo de cromatografia gás-líquido.....	14
2.5.6.	Procedimento de cromatografia gás-líquido.....	15
2.6.	Determinações dos conteúdos de carboidratos, de proteínas e de sulfatos do PED.....	15
3.	Resultados.....	16
3.1.	Dados fisiológicos.....	16
3.2.	Filtração em gel do PED e do PC de diferentes idades de <i>Staurastrum tohopekaligiensis</i> .....	18
3.3.	Cromatografia por troca iônica.....	26
3.4.	Composição monomérica do PED e do PC.....	30
3.5.	Conteúdo de carboidratos, de proteína e de sulfato do PED.....	31

4.	Discussão.....	32
4.1.	Dados fisiológicos.....	32
4.2.	Caracterização do PED e do PC de <i>Staurastrum tohopekaligiensis</i> e sua importância ecológica.....	33
5.	Conclusões.....	47
6.	Referências bibliográficas.....	49

## 1. INTRODUÇÃO

O meio ambiente aquático compreende cerca de 70 por cento da superfície terrestre, e, nele, as algas são importantes como produtores primários de matéria orgânica elaborada, desempenhando, portanto, um papel primordial na ecologia desses ecossistemas.

Em muitos casos, elas representam o componente autótrofo principal nos ecossistemas lacustres, sendo portanto capazes de suportar e influenciar os níveis subsequentes da cadeia alimentar (WETZEL & LIKENS, 1991).

Além da produção de matéria orgânica particulada pelo fitoplâncton, um fato curioso é a excreção de matéria orgânica dissolvida (MOD) para o meio externo. É um dos aspectos relativos à sua fisiologia que muito tem despertado o interesse por parte dos pesquisadores devido à diversidade de ocorrência e conseqüentes implicações ecológicas.

A liberação de MOD pelas algas ocorre por diferentes processos, tais como autólise, lise por parasitas intra ou extracelulares, quebra mecânica pelo zooplâncton, ou ainda excreção ativa. Nesse sentido, em ambientes marinhos e de água doce, taxas de excreção entre 5 e 70 % do total de carbono fixado na fotossíntese têm sido relatadas (FOGG, 1975).

Mais recentemente, trabalhos como os de MAGUE *et al* (1980), VIEIRA (1980), VIEIRA & AIDAR-ARAGÃO (1982), FOGG (1983) e EBERLEIN & BROCKMAN (1986), apontam a excreção como função normal das células e como uma fração significativa da produção primária.

A magnitude da excreção de MOD por diferentes espécies de algas pode ser influenciada por vários fatores, como o estágio fisiológico das células, a intensidade luminosa, temperatura e disponibilidade de nutrientes no meio (GUILLARD & HELLEBUST, 1971; WATANABE, 1980; VIEIRA, 1982; VIEIRA & TEIXEIRA, 1982; LANCELOT, 1983; EBERLEIN & BROCKMAN, 1986; VIEIRA & MYKLESTAD, 1986; CÁCERES & VIEIRA, 1988).

Dentre os compostos excretados pelas algas, destacam-se: ácido glicólico, carboidratos, proteínas, peptídeos, aminoácidos, enzimas, substâncias voláteis, aldeídos, cetonas, aminas e outros compostos estimuladores ou inibidores de crescimento como: vitaminas, antibióticos e toxinas (FOGG, 1971). Entretanto, uma das características da excreção algal de MOD é que os carboidratos são invariavelmente predominantes na composição do excretado (HELLEBUST, 1974; MYKLESTAD, 1974; SOEDER & BOLZER, 1981; BURNEY, 1986; VIEIRA & CÁCERES, 1988). Esses carboidratos são geralmente heteropolissacarídeos complexos que, no caso de microalgas clorofíceas de água doce, são muito parecidos com as pectinas (PAINTER, 1983). Apesar do número de microalgas estudadas ser extremamente reduzido ao se comparar com outros organismos, os dados mostram que a variabilidade na composição e estrutura desses compostos é muito grande não só quando se compara "taxa" superiores como classes e divisões, mas também mesmo a nível genérico e específico. Dados de polissacarídeos extracelulares complexos das seguintes classes de microalgas são disponíveis: Bacillariophyceae (LEWIN *et al*, 1958; SMESTAD *et al*, 1975; PAULSEN *et al*, 1978), Chlorophyceae (LEWIN, 1956; KATNER *et al*, 1970; FULTON, 1978; TAUTVYDAS, 1978; CRAYTON, 1980; VIEIRA & MYKLESTAD, 1986; PAULSEN & VIEIRA, 1994; VIEIRA & PAULSEN, 1994), Euglenophyceae (VOGEL *et al*, 1978), Rhodophyceae unicelular (EVANS *et al*, 1974; PERCIVAL & FOYLE, 1979), Xanthophyceae (CLEARE & PERCIVAL, 1972), Haptophyceae (MARLOWE *et al*, 1989) e Cryptophyceae (PAULSEN *et al*, 1992). No entanto apenas algumas espécies, muitas vezes apenas uma, de cada classe foram estudadas. Ao se considerar as microalgas procarióticas, Cyanophyceae, os dados sobre a caracterização de exopolissacarídeos são já em maior número, muitos dos quais relativamente recentes (KOSENKO, 1975; JURGENS & WECKESSER, 1986; NAKAGAWA *et al*, 1987; PANOFF *et al*, 1988; PANOFF & JOSET, 1989; PHILIPS *et al*, 1989).

A mucilagem produzida por *Porphyridium cruentum* (Rhodophyceae) provavelmente tem sido a mais extensivamente estudada com respeito à análise estrutural (PERCIVAL & FOYLE, 1979). FLAIBANI *et al* (1989), através de estudos utilizando cromatografia gasosa, identificaram o material extracelular produzido por espécies de



*Nostoc* e *Chlamydomonas*. *Nostoc calcicola* produz um material que pode ser separado em várias frações contendo ácido galacturônico, ácido glucurônico, glicose, xilose, manose, galactose, fucose, arabinose e ramnose em várias proporções. Duas espécies de *Chlamydomonas* produzem principalmente glucuronicoglicans. Para *C. humicola*, ácido glucurônico:glicose:xilose (1:1:3) e para *C. peterfii* e *C. sajabo*, ácido glucurônico:galactose (1:2). Contudo, nenhum estudo estrutural foi realizado com estes polímeros.

Outros estudos caracterizaram os compostos polissacarídicos extracelulares de algas através da determinação de seus pesos moleculares, empregando cromatografia de filtração em gel (NALEWAJKO & LEAN, 1972; ITURRIAGA & ZSOLNAY, 1981; SONDERGAARD & SCHIERUP, 1982; JENSEN, 1983; HAMA & HANDA, 1987; ALLARD & CASADEVALL, 1990).

Assim, foram já descritos exopolissacarídeos de alto e de baixo pesos moleculares, ácidos, neutros, sulfatados; polissacarídeos ricos em fucose, em galactose e outros em manose. Outros exopolissacarídeos ocorrem na formação de bainhas (ou cápsulas) extracelulares. Essas cápsulas podem ser complexas, bem consistentes, com os bordos externos bem delineados, como ocorre com *Spondylosium panduriforme* (PAULSEN & VIEIRA, 1994) e *Staurastrum tohopekaligiensis* (observação pessoal), ou podem ser amorfas sem limites externos definidos e que continuamente dissolvem-se no meio externo, como acontece com outra desmidiácea, *Pleurotaenium trabecula*.

Muitas questões a respeito da excreção de polissacarídeos solúveis e da ocorrência das cápsulas estão ainda sendo propostas. Na verdade, pouco se sabe a respeito de sua função. Foram propostas hipóteses como liberação de excesso de carbono fotoassimilado através da excreção de carboidratos ou de uma função extracelular relacionada com o "pool" de nutrientes, interferindo na troca de substâncias entre o meio e as células foram propostas (MIX, 1966; YEH & GIBOR, 1970; NALEWAJKO & MARIN, 1969; MYKLESTAD et al., 1972; FOGG, 1975; BROOK, 1981). De acordo com MÜNSTER & CHRÓST (1990), esta matéria orgânica dissolvida excretada pelo fitoplâncton pode ser considerada a base da cadeia alimentar planctônica, sendo, o próximo nível, ocupado pelos microrganismos heterótrofos. Além da utilização como fonte de energia para heterótrofos, diversos trabalhos têm apontado outros papéis ecofisiológicos da MOD excretada pelas



algas. A presença no meio de certos carboidratos pode interferir na disponibilidade de íons metálicos, funcionando como quelantes de íons como  $\text{Cu}^{++}$ ,  $\text{Hg}^{++}$ ,  $\text{Cd}^{+}$ , etc., diminuindo seu efeito tóxico (BITTON & FREIHOFFER, 1978; MANZINI *et al.*, 1984; KAPLAN *et al.*, 1988; VIEIRA & NASCIMENTO, 1989). Ainda, a viscosidade do meio em torno das células pode ser aumentada por polissacarídeos formadores das cápsulas que têm importância na prevenção da sua dessecação (LEWIN, 1955 *apud* JENSEN, 1984), que servem como proteção contra a epifitização por outros organismos (ROUND, 1973) ou como proteção contra o “grazing” (PORTER, 1977; REYNOLDS, 1986). Esses exsudatos algais poderiam também atuar na diminuição do peso específico da célula, aumentando a flutuabilidade das formas fitoplanctônicas e ticoplanctônicas (HUTCHINSON, 1967; REYNOLDS, 1984), ou ainda como auxiliar na reprodução sexuada, mantendo os parceiros juntos ou próximos (HOSHAW & MCCOURT, 1988). Alguns pesquisadores supõem que a liberação de tais compostos orgânicos seja de muito maior importância do que se tem reconhecido e que, de maneira sutil mas significativa, pode modificar o crescimento, o comportamento dos organismos e a dinâmica sucessional de populações algais. Por exemplo, interações alelopáticas entre as algas têm sido relatadas, nas quais compostos orgânicos liberados por uma alga são inibidores ou estimulantes para outras (VISSER & COUTURE, 1981). A liberação de compostos orgânicos biologicamente ativos, especialmente por algas azuis, está claramente relacionada como um dos mecanismos, entre muitos outros, que pode influenciar “ajustes finos” na sucessão de espécies e na produtividade sazonal.

Porém, apesar de todas estas proposições, ainda restam muitos aspectos a serem esclarecidos. Quanto às cápsulas, as dúvidas são as mesmas quanto à sua função. Teriam essas cápsulas ou bainhas, funções extracelulares?

Uma outra questão é saber se os polissacarídeos dissolvidos encontrados no meio circundante às células é originado a partir da dissolução das cápsulas ou se mais de um polissacarídeo extracelular é liberado para o meio.

O primeiro passo para tentar responder a estas questões é o reconhecimento das composições e estruturas das cápsulas e dos polissacarídeos dissolvidos. Essa abordagem é importante quando se considera que na literatura encontram-se disponíveis dados que

mostram, por exemplo, que os polissacarídeos encontrados dissolvidos no meio de cultura de espécies que apresentam grandes cápsulas têm composição diferente daqueles componentes das cápsulas, o que pressupõe funções diferentes (PAULSEN *et al.*, 1992). Por outro lado, na bibliografia são encontradas informações que, tanto sob o aspecto quantitativo como qualitativo, a composição dos polissacarídeos extracelulares de determinadas algas macroscópicas (Phaeophyceae e Rhodophyceae) pode variar com o ciclo biológico, com a parte do talo e com a idade (BONEY, 1981). A esse respeito praticamente nada é conhecido em algas microscópicas, sendo que os poucos estudos existentes de análise qualitativa de carboidratos extracelulares durante o ciclo biológico foram realizados apenas em Cyanophyta (KOSENKO, 1975 e PANOFF *et al.*, 1989).

A lagoa do Infernã (21° 35' S, 47° 51' W), local de onde foi isolada a microalga em estudo, *Staurastrum tohopekaligiensis* Wolle, é uma das lagoas marginais do rio Mogi-Guaçu. Aí se tem realizados até agora estudos sobre ecologia de macrófitas aquáticas (NOGUEIRA, 1989; COUTINHO, 1989; NOGUEIRA & ESTEVES, 1990), distribuição do bacterioplâncton (FREITAS, 1989); dinâmica do ciclo do nitrogênio (BALLESTER, 1989; FERESIN, 1991; ESTEVES, 1991; OBARA, 1992; GIANOTTI, 1994); ictiofauna (GALETTI *et al.*, 1990); perifiton (SCHWARZBOLD, 1990); análise de metais pesados (LIMA, 1990); composição e produtividade do fitoplâncton (DIAS Jr., 1990; SILVA, 1990); produtividade do fito e bacterioplâncton (FERESIN, 1994), entre outros. Ou seja, apesar do número considerável de trabalhos publicados, poucos foram os estudos relativos ao fitoplâncton e apenas dois abordando a excreção desses organismos.

## 1.1. OBJETIVOS

Tendo em vista as considerações anteriores, o propósito principal do presente trabalho foi contribuir com os estudos para um melhor conhecimento do processo de excreção de MOD em ambientes lacustres. A abordagem escolhida foi utilizar uma única espécie de alga (*S. tohopekaligiensis* Wolle) em cultura, enfocando os polissacarídeos excretados por esta espécie. Para tanto, foram contemplados os seguintes objetivos específicos:

1. Caracterização dos compostos polissacarídicos solúveis liberados por *Staurastrum tohopekaligiensis* e aqueles componentes das cápsulas.

2. Verificação da possibilidade de ocorrência de diferentes tipos de compostos polissacarídicos em função da idade celular.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Descrição do organismo

A espécie utilizada neste estudo, *Staurastrum tohopekalogiensis* Wolle (Chlorophyceae) foi isolada de uma lagoa marginal (Infernão) do Rio Mogi-Guaçu-Luiz Antonio-SP (21° 35' S, 47° 51' W). Vem sendo mantida no banco de culturas do Laboratório de Bioquímica e Fisiologia de Algas do Departamento de Botânica (UFSCar) em culturas unialgais e axênicas (clone 086-CH) em meio WC (GUILLARD & LORENZEN, 1972), sob condições controladas de luz (4 klux), de temperatura (20-21° C) e fotoperíodo 12:12-claro/escuro.

*S. tohopekalogiensis* Wolle pertence à ordem Zygnematales, família Desmidiaceae. É uma alga unicelular, formada por duas semicélulas idênticas, separadas por um istmo. Apresenta poros na parede secundária através dos quais se dá a extrusão de mucilagem (BROOK, 1981). Em geral é bentônica, sendo que, em determinadas condições pode tornar-se planctônica. WETZEL (1983) utiliza a terminologia “meroplâncton” para descrever esta situação, na qual certas espécies apresentam “estágios de descanso” no sedimento e não são observadas na coluna d’água por longos períodos de tempo. Ou seja, elas são planctônicas somente em certos períodos de seu ciclo de vida.

Nesta espécie, as células são envolvidas por cápsulas extracelulares mucilaginosas bem definidas, consistindo de um polissacarídeo capsular. Quando cultivadas em laboratório, estas cápsulas ficam maiores a medida em que as culturas tornam-se mais velhas. Esta microalga também produz um composto polissacarídico extracelular que fica dissolvido no meio de cultura. De modo similar, o meio de cultura com o tempo torna-se viscoso devido a maior produção deste material extracelular dissolvido na fase estacionária.

## 2.2. Culturas

Para a realização dos experimentos, culturas axênicas da alga foram inoculadas em garrações de 8 litros contendo meio WC (GUILLARD & LORENZEN, 1972), preparado a partir de água bidestilada, sendo portanto um meio definido. Este meio foi escolhido por ser comprovadamente eficiente e por permitir posteriormente comparações dos resultados obtidos com aqueles já existentes na bibliografia para outras espécies (VIEIRA & NASCIMENTO, 1989; PAULSEN *et al.*, 1992; NORDI, 1993; PAULSEN & VIEIRA, 1994; VIEIRA & PAULSEN, 1994).

As culturas foram iluminadas por tubos de lâmpadas fluorescentes ( $150 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ) e mantidas em temperatura de  $22 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ , fotoperíodo 13:11 horas (claro-escuro) e aeração fornecida por ar filtrado e umedecido em solução acidulada com pH 3,0.

Aproximadamente a cada 2 dias a partir da data da inoculação, foram retiradas da cultura, em condições assépticas, alíquotas para contagem do número de células e para as determinações dos teores de clorofila e de carboidratos excretados dissolvidos.

## 2.3. Dados fisiológicos

### 2.3.1. Curva de crescimento de *S. tohopekaligiensis* Wolle

A curva de crescimento da espécie foi obtida por contagem de células em hemocitômetro Fuchs-Rosenthal, utilizando-se microscópio óptico comum. Foram enumerados pelo menos 400 indivíduos, com a objetiva de 40 x. Conforme a densidade presente na câmara, determinou-se a contagem de um certo número de quadrados. O cálculo do número de células. $\text{ml}^{-1}$  foi obtido através da seguinte fórmula (VIEIRA, 1975):

$$\text{Células} \cdot \text{ml}^{-1} = \frac{N \cdot 1000}{3,2 \cdot n}, \quad \text{onde:}$$



N = número total de células contadas.

n = número de quadrados contados.

3,2 = volume total da câmara (em mm<sup>3</sup>).

A taxa de crescimento para a espécie foi determinada através da seguinte fórmula (FOGG, 1975):

$$K = \frac{\log N - \log N_0}{t}, \quad \text{onde:}$$

K: é a constante relativa de crescimento em condições exponenciais.

N<sub>0</sub>: é a concentração inicial de células.

N: é a concentração final de células.

t: é o intervalo de tempo considerado.

O tempo de geração (G), definido como o tempo necessário para o número de células duplicar, foi determinado através da seguinte fórmula (FOGG, 1975):

$$G = \frac{0,301}{K}$$

### 2.3.2. Clorofila a

Para determinação da curva de clorofila a, foi utilizado o método colorimétrico (TALLING & DRIVER, 1963 *apud* GOLTERMAN *et al.*, 1978), tendo acetona como solvente.



Assim sendo, para o cálculo da concentração de clorofila a, foi utilizada a seguinte fórmula:

$$x = 11,9 \cdot E_1, \quad \text{onde:}$$

$x$  = concentração de clorofila a no solvente [  $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$  ].

$E_1$  = absorvância em 665 com cuveta de 1 cm.

### 2.3.3. Carboidratos totais dissolvidos

A dosagem dos carboidratos totais dissolvidos foi efetuada através do método do “fenol-ácido sulfúrico” com glicose como padrão. As leituras de absorvância foram realizadas em 485 nm (DUBOIS *et al.*, 1956), expressando-se os resultados em mg de carboidrato/ l de cultura e mg/  $10^3$  células.

### 2.4. Obtenção do material polissacarídico

O composto polissacarídico foi obtido de várias culturas do tipo “batch” conduzidas sob os mesmos procedimentos que os descritos no item 2.2., mas coletadas em diferentes épocas do ciclo de crescimento (25 e 48 dias de cultivo - culturas “jovem” e “velha”, respectivamente).

As células coletadas foram então separadas do meio de cultura, contendo o material excretado dissolvido, por centrifugação (6.000 rpm à temperatura de 0°C) e posteriormente lavadas com água destilada e submetidas a novas centrifugações (três a quatro vezes), para remoção do material dissolvido que porventura estivesse impregnado nas cápsulas.

As células lavadas foram suspensas em água destilada e as cápsulas foram extraídas por aquecimento (40° C) e agitação.

O material dissolvido, assim como o capsular, foram submetidos ao mesmo processo. Para tanto foram efetuadas:

a) Filtração: com filtros de diferentes porosidades (AP-20, 1,2 e 0,45 µm “Millipore”), para a completa remoção do material particulado. A seguir, foi adicionado tolueno ao meio filtrado para evitar o eventual crescimento microbiano.

b) Concentração: em evaporador rotatório a 40° C.

c) Diálise: para remoção do material de baixo peso molecular, o meio concentrado foi dialisado em tubos com tamanho de poros de 12.000-14.000 daltons (“Spectra Por”) contra água corrente por 48 horas e água destilada por 24 horas.

d) Liofilização: o material dialisado foi então liofilizado. Dessa forma, foram obtidos dois tipos de materiais para análise: polissacarídeo capsular (PC) e polissacarídeo extracelular dissolvido (PED), cada um com duas idades celulares diferentes.

## **2.5. Caracterização do polissacarídeo extracelular dissolvido (PED) e do polissacarídeo capsular (PC) de diferentes idades de *S. tohopekaligiensis***

### **2.5.1. Mecanismo de cromatografia de filtração em gel**

Este método é também conhecido, entre outros nomes, como cromatografia de exclusão molecular ou cromatografia de peneira molecular. É um tipo de cromatografia no qual a fase estacionária é uma peneira molecular, formada por esferas porosas microscópicas de um material polimérico altamente hidratado e inerte (gel).

Moléculas maiores do que os maiores poros do gel não podem penetrar nos poros deste e, portanto, irão passar na coluna através dos espaços entre as partículas individuais do gel. Diz-se que elas são excluídas e, assim, permanecem no volume excluído da coluna, definido como o volume da fase aquosa que está na parte externa das microesferas. Moléculas menores, entretanto, irão penetrar nas malhas das partículas do gel de forma

diferenciada, dependendo de seu tamanho e forma. Elas serão, portanto, retardadas em graus variáveis e serão eluídas em ordem decrescente de tamanho molecular.

Informações mais detalhadas sobre o assunto encontram-se em SNYDER & KIRKLAND (1979); FISCHER (1980); CHRISTIAN (1986); COLLINS *et al.* (1990).

O gel utilizado para a realização das análises de cromatografia de exclusão molecular no presente trabalho (Sephacryl, "Pharmacia"), é um produto que combina dextranos e poliacrilamida. Ele é preparado pela reação entre alil-dextrano com N,N'metileno-bisacrilamida e proporciona uma estrutura rígida com poros de tamanho controlado (PHARMACIA, 1987a). Foram utilizados 2 tipos de Sephacryl: S-400 e S-500, com intervalos de fracionamento para polissacarídeos de  $1 \times 10^4$  a  $2 \times 10^6$  daltons e  $4 \times 10^4$  a  $2 \times 10^7$  daltons, respectivamente.

### 2.5.2. Procedimento de cromatografia de filtração em gel

Para a verificação da possibilidade do material liofilizado ser separado em frações em função de seu tamanho molecular, amostras de 2 ml ( $1 \text{ mg. ml}^{-1}$ ) de PED e PC de diferentes idades celulares (25 e 48 dias) foram injetadas em uma coluna cromatográfica C16/ 70-"Pharmacia", contendo gel Sephacryl S-400. As amostras foram eluídas por uma solução de NaCl 0,05 M e  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 5 \text{ H}_2\text{O}$ , 0,05 M em pH 7,0, efetuada por bomba peristáltica, com um fluxo de  $0,4 \text{ ml. min}^{-1}$ . Foram coletadas frações de 2 ml com o auxílio de um coletor LKB-FRAC-200-"Pharmacia" e o conteúdo de carboidratos foi dosado através do método do "fenol-ácido sulfúrico" (DUBOIS *et al.*, 1956). O limite de exclusão máximo do gel foi determinado utilizando-se um polissacarídeo com massa molecular conhecida ( $2 \times 10^6$  daltons-Blue Dextran-"Pharmacia") e calculando-se o quociente  $V_e/V_t$ , sendo que  $V_e$  é o volume eluído do início da eluição até o pico e  $V_t$ , o volume total do gel contido na coluna.

Posteriormente, amostras de 2 ml ( $1 \text{ mg. ml}^{-1}$ ) de PED de cultura "velha" e de PC ( $1 \text{ mg. ml}^{-1}$ ) de culturas "jovem" e "velha" foram injetadas em coluna C-16/70-"Pharmacia" contendo Sephacryl S-500 nas mesmas condições utilizadas para Sephacryl S-400.

### 2.5.3. Mecanismo de cromatografia por troca iônica

Na cromatografia por troca iônica a fase estacionária é altamente carregada, sendo que solutos com cargas de sinais contrários a esta são seletivamente adsorvidos na fase móvel. Os solutos adsorvidos podem ser subsequentelemente eluídos, por deslocamentos com outros íons, com o mesmo tipo de carga, porém com maior força de interação com a fase estacionária.

A matriz de um trocador é constituída de um material poroso, inerte, insolúvel em água e em solventes orgânicos, apresentando ligações covalentes a grupos trocadores iônicos. Dependendo do grupo trocador ligado covalentemente à matriz, os trocadores iônicos são classificados em aniônicos e catiônicos.

Os trocadores aniônicos, como o próprio nome indica, trocam ânions e apresentam, portanto, grupos iônicos positivos ligados à matriz. Os trocadores catiônicos, inversamente, trocam cátions e apresentam grupos iônicos negativos ligados à matriz.

A resina escolhida, dietilaminoetil-sepharose (DEAE-Sepharose CL-6B-“Pharmacia”), contém grupos carregados positivamente, sendo portanto um trocador de ânions. Trata-se de um gel de agarose, livre de sulfato, com ligações cruzadas com 2,3-dibromopropanol. Este trocador apresenta uma matriz de grande rigidez, aliada a boas qualidades de vazão na fase móvel.

A eluição das substâncias pode ser conseguida através de mudanças em fases discretas de pH ou de força iônica do eluente. Tanto o pH como a força iônica podem ser variados de uma maneira contínua e constante com o uso de gradientes. Estes podem ser lineares, côncavos e convexos.

Tendo em vista a facilidade de preparação e a boa resolução proporcionada pelo gradiente linear, foi escolhido este tipo de eluição.

Descrições pormenorizadas sobre cromatografia por troca iônica são disponíveis em SNYDER & KIRKLAND (1979); PHARMACIA (1987b); COLLINS *et al.* (1990).



#### 2.5.4. Procedimento de cromatografia por troca iônica

Amostras de 2 ml (1 mg. ml<sup>-1</sup>) de PED de cultura “velha” e de PC de culturas “jovem” e “velha” foram também submetidas à cromatografia por troca iônica, para verificação da possibilidade de se obter sub-frações destes compostos. Neste caso, foi utilizada uma coluna C-16/70 com DEAE-Sepharose CL-6B-“Pharmacia”. Primeiramente foi utilizada uma solução de NaCl 0,05 M e NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> . 5 H<sub>2</sub>O, 0,05 M e posteriormente um gradiente salino linear de 0,05 a 2,5 molar de NaCl, produzido com o auxílio de uma bomba peristáltica de três canais (“Pharmacia”). Foram coletadas frações de 5 ml, detectadas através do método do “fenol-ácido sulfúrico”, anteriormente citado.

O gradiente salino linear é especificado pelos fluxos R<sub>1</sub> (da solução limite para a câmara de mistura) e R<sub>2</sub> (da câmara de mistura até a coluna), pela concentração C<sub>0</sub> da solução limite e o volume inicial V<sub>0</sub> na câmara de mistura. A concentração C do gradiente após um tempo t foi calculada através da fórmula (PHARMACIA, 1987b):

$$C = C_0 [ 1 - \{ V_0 - t (R_2 - R_1) / V_0 \}^x ]$$

$$\text{onde } x = R_1 / (R_2 - R_1)$$

#### 2.5.5. Mecanismo de cromatografia gás-líquido

Gases ou substâncias volatilizáveis podem ser separadas utilizando-se a técnica de cromatografia gasosa. A separação baseia-se na diferente distribuição das substâncias da amostra entre uma fase estacionária (líquida, no caso) e uma fase móvel (gasosa).

A amostra, através de um sistema de injeção, é introduzida em uma coluna contendo a fase estacionária. O uso de temperaturas convenientes no local de injeção da amostra e na coluna possibilita a vaporização destas substâncias que, de acordo com suas propriedades e as da fase estacionária, são retidas por tempos determinados e chegam à saída da coluna em tempos diferentes. O uso de um detector adequado na saída da coluna torna possível a detecção e quantificação destas substâncias.

No caso das amostras dos compostos polissacarídicos houve necessidade de etapas de preparação, descritas a seguir, antes que elas pudessem ser analisadas.

### **2.5.6. Procedimento de cromatografia gás-líquido**

A determinação dos monossacarídeos constituintes do PED e do PC foi realizada através de metanólise das amostras em HCl metanólico 4 M a 80° C por 24 horas (REINHOLD, 1972). Os resíduos formados foram acetilados com ácido acético e piridina para reacetilar os prováveis açúcares aminados. Os metil-glicosídeos foram então convertidos a derivados de trimetilsilil com a adição de TMS (trimetilclorosilan + hexametildisilazan + piridina, 1:2:3) e analisados por cromatografia gás-líquido, em cromatógrafo "Carlo-Erba". O padrão interno utilizado foi manitol. O programa de temperatura utilizado foi o seguinte: 80 °C por 1 minuto após a injeção da amostra, seguido de 30 °C por minuto até 160 °C, 0,5 °C por minuto até 200 °C e para finalizar, 30 °C por minuto até 300 °C, para limpeza da coluna.

Os picos obtidos para compostos individuais foram então comparados com aqueles obtidos para os monossacarídeos padrões.

### **2.6. Determinações dos conteúdos de carboidratos, de proteínas e de sulfatos do PED**

Amostras liofilizadas do PED de idade celular de 48 dias foram redissolvidas em água destilada (1 mg.ml<sup>-1</sup>) e o teor de carboidratos foi dosado através do método do "fenol-ácido sulfúrico" (DUBOIS *et al.*, 1956).

O conteúdo proteico foi determinado utilizando-se o método de LOWRY *et al.* (1951), tendo albumina como padrão e absorbância medida em 660 nm.

A verificação da presença de sulfato foi feita através do método de ANTONOPOULOS (1962), no qual é utilizado NaSO<sub>4</sub> como padrão e a absorbância determinada em 505 nm.

Os resultados obtidos foram expressos em termos de porcentagem em relação ao peso seco do PED.



### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Dados fisiológicos

Através da Figura 1a são apresentados os resultados referentes ao crescimento de *S. tohopekaligiensis* em condições de laboratório ( $22 \pm 1$  °C,  $150 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  e fotoperíodo 13:11-claro/escuro). São apresentadas ainda as variações temporais dos teores de clorofila a, de carboidratos totais dissolvidos e da relação entre carboidratos totais dissolvidos e número de células (Figuras 1b e 1c).

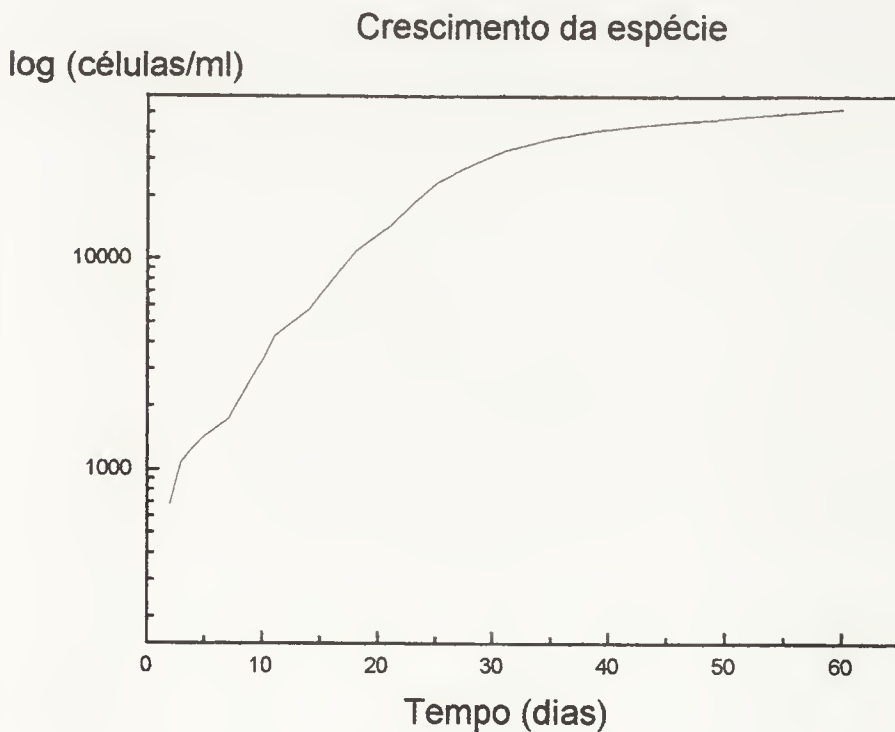


Figura 1a: Curva de crescimento de *S. tohopekaligiensis*. Constante relativa de crescimento:  $K = 0,06$ . Tempo de geração:  $G = 5$  dias.

A variação dos teores de clorofila a apresentada por meio da Figura 1b acompanha na forma a curva de crescimento (expressa em células/ ml), caso esta seja expressa em escala linear.

Os resultados relativos aos carboidratos totais dissolvidos mostraram um aumento na concentração desses compostos durante a fase estacionária. Entretanto, quando os resultados foram expressos em mg de carboidratos dissolvidos/  $10^3$  células, foi observado que houve uma diminuição na liberação de carboidratos com o decorrer da fase exponencial, atingindo seu ponto mínimo coincidente com o início da fase estacionária e depois houve um aumento no decorrer desta fase (Figura 1c).

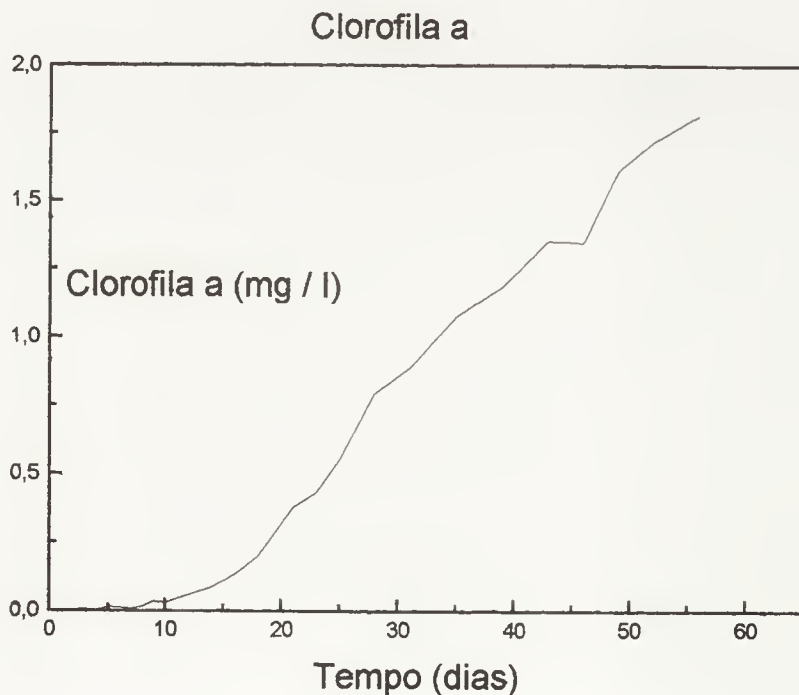


Figura 1b: Variação temporal dos teores de clorofila a

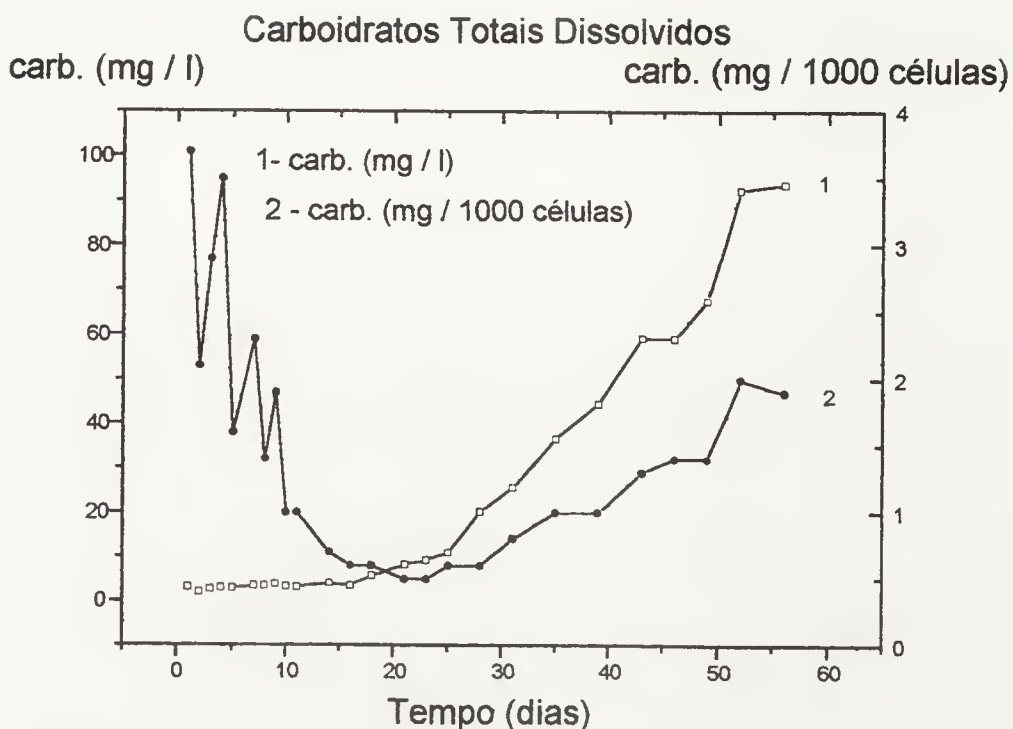


Figura 1c: Variação temporal dos teores de carboidratos totais dissolvidos e da relação entre os carboidratos totais dissolvidos e número de células

### 3.2. Filtração em gel do PED e do PC de diferentes idades de *Staurastrum tohopekaligiensis*

Através das Figuras 2a e 2b são apresentados os cromatogramas de filtração em gel Sephacryl S-400 dos PEDs de cultura “jovem” e de cultura “velha”.

Foi observado um perfil de eluição similar para os polissacarídeos extracelulares das culturas de diferentes idades celulares.

Ao serem injetadas na coluna cromatográfica, cada uma das amostras foi separada em duas frações, denominadas de “A” e “B”. A fração “A”, com peso molecular maior, foi eluída no volume morto, delimitado pelo dextran de 2.000.000 daltons. A outra fração, chamada de “B”, com menor peso molecular, foi eluída depois do dextran de 2.000.000

daltons. O volume morto é definido como o volume de eluição das moléculas que estão distribuídas na fase móvel que se encontra na parte externa das partículas individuais do gel, porque são maiores do que os maiores poros do gel.

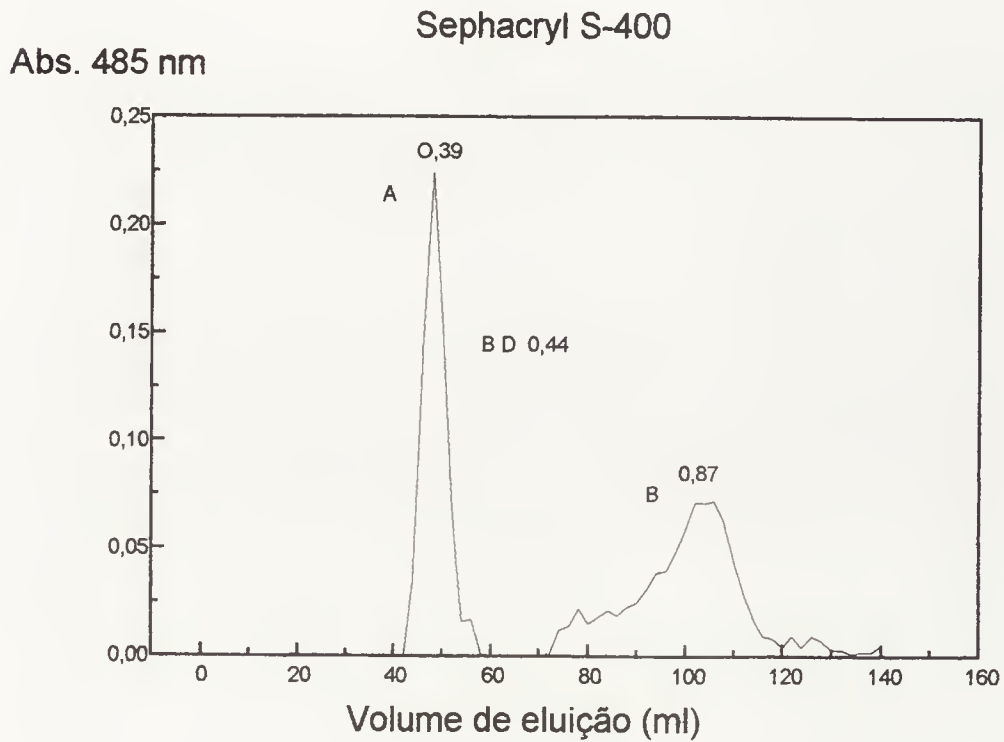


Figura 2a: Cromatograma de filtração em gel Sephacryl S-400 do PED de cultura “jovem”. As razões  $V_e/V_t$  para cada fração estão indicadas acima dos picos. “A” e “B” são as frações e BD, o dextran de 2.000.000 daltons. Coluna 1,6 x 60 cm, fluxo: 0,4 ml/min

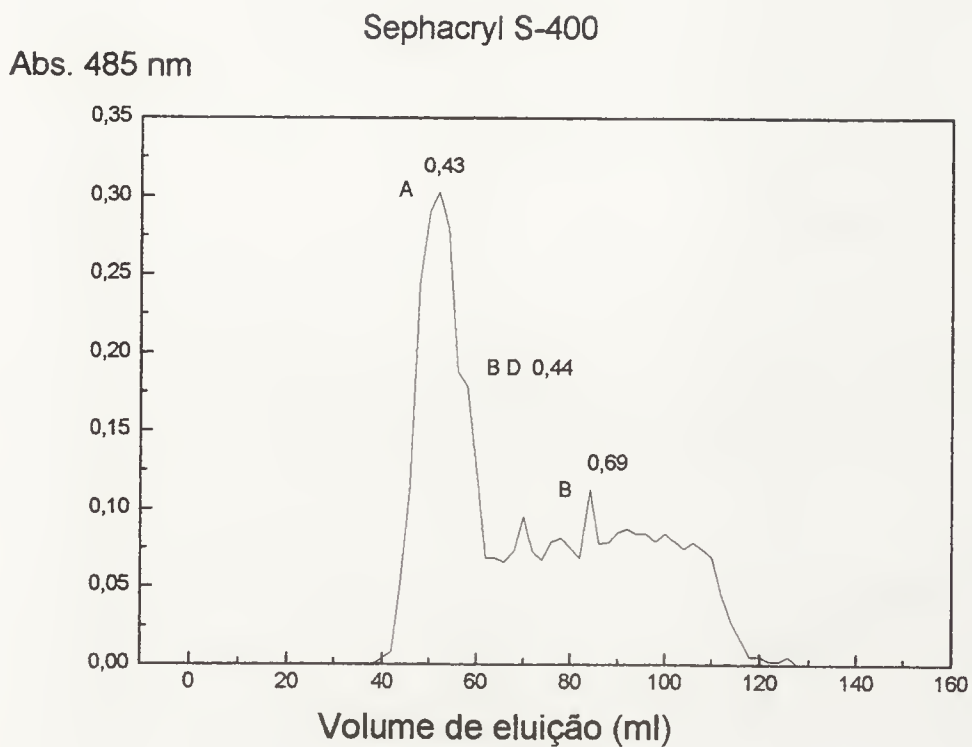


Figura 2b: Cromatograma de filtração em gel Sephacryl S-400 do PED de cultura “velha”. As razões  $V_e/V_t$  para cada fração estão indicadas acima dos picos. “A” e “B” são as frações e BD, o dextran de 2.000.000 daltons. Coluna 1,6 x 60 cm, fluxo: 0,4 ml/min.

Os cromatogramas de filtração em gel Sephacryl S-400 dos PCs de cultura “jovem” e de cultura “velha” (Figuras 3a e 3b) exibiram comportamento análogo ao do PED.

Neste caso, foi observada também a separação de ambos compostos em duas frações (“A” e “B”): a fração “A”, de peso molecular maior foi eluída no volume morto e a fração “B”, de peso molecular menor, foi eluída depois do dextran de 2.000.000 daltons.

### Sephacryl S-400

Abs. 485 nm

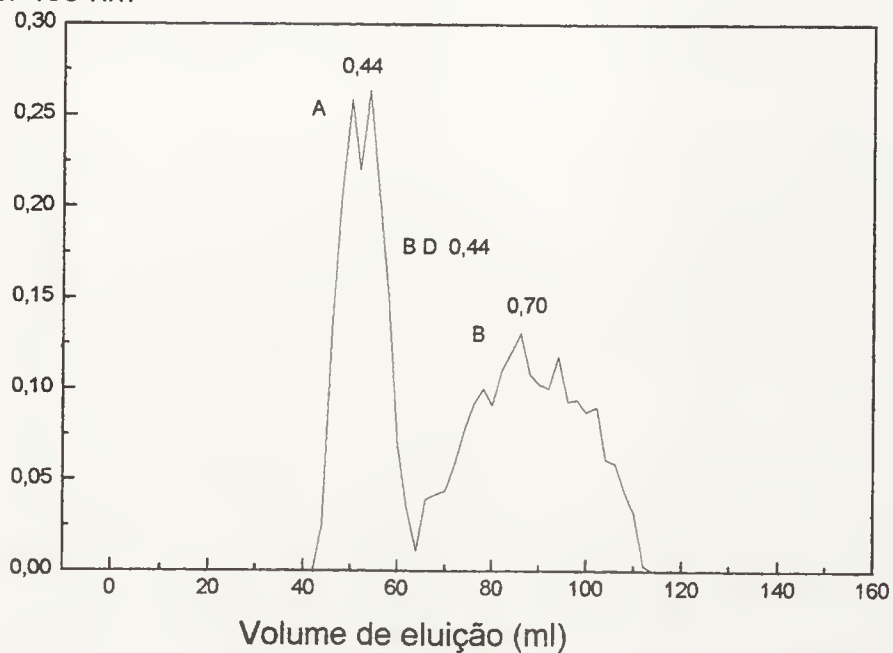


Figura 3a: Cromatograma de filtração em gel Sephacryl S-400 de PC de cultura “jovem”. As razões  $V_e/V_t$  para cada fração estão indicadas acima dos picos. “A” e “B” são as frações e BD, o dextran de 2.000.000 daltons. Coluna: 1,6 x 60 cm, fluxo: 0,4 ml/min.



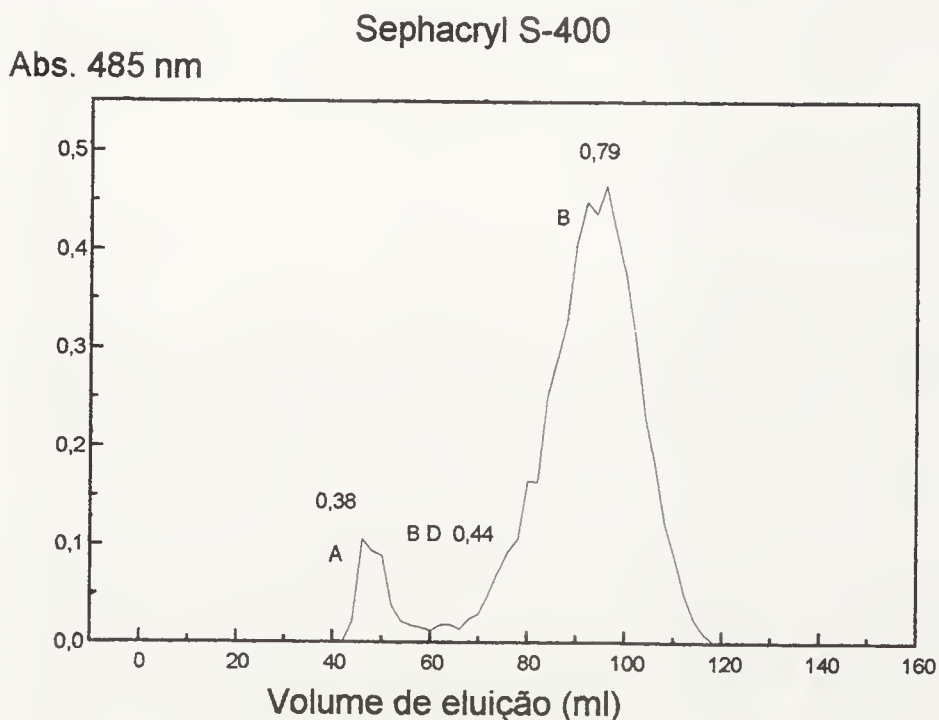


FIGURA 3b: Cromatograma de filtração em gel Sephacryl S-400 de PC de cultura “velha”. As razões  $V_e/V_t$  para cada fração estão indicadas acima dos picos. “A” e “B” são as frações e BD, o dextran de 2.000.000 daltons. Coluna: 1,6 x 60 cm, fluxo: 0,4 ml/min.

Através de novas análises, utilizando Sephacryl S-500, foi possível determinar os pesos moleculares aproximados das frações (Figura 4). Convém ressaltar que foi examinado apenas o PED de cultura “velha”, pois os demais tipos de polissacarídeos esgotaram-se com as primeiras análises.

No cromatograma da Figura 4 é possível ver que a fração “A” foi eluída antes do dextran de 2.000.000 daltons, apresentando, portanto peso molecular estimado maior ou igual a 2.000.000 daltons.

A fração “B”, que mostrou-se mais espalhada, foi eluída praticamente junto com o dextran de 2.000.000 daltons, tendo, portanto, peso molecular estimado em torno deste valor.

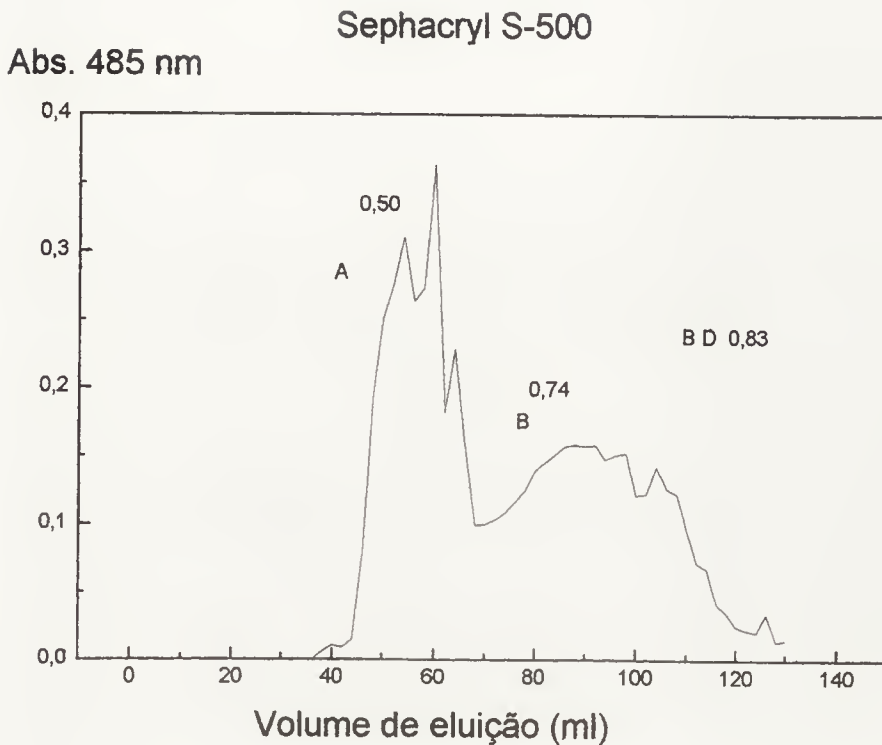


Figura 4: Cromatograma de filtração em gel Sephacryl S-500 do PED de cultura “velha”. As razões  $V_e/V_t$  para cada fração estão indicadas acima dos picos. “A” e “B” são as frações e BD, o dextran de 2.000.000 daltons. Coluna: 1,6 x 60 cm, fluxo: 0,4 ml/min.

No caso dos PCs de cultura “jovem” e de cultura “velha”, também foi possível estimar a distribuição de seus pesos moleculares aproximados, utilizando Sephacryl S-500 (Figuras 5a e 5b).

A fração “A”, tanto do PC de cultura “jovem” quanto de cultura “velha” apresentou peso molecular estimado maior ou igual a  $2 \times 10^6$  daltons, uma vez que ela foi eluída antes do dextran de 2.000.000 daltons. A fração “B” apresentou peso molecular em torno de  $2 \times 10^6$  daltons, uma vez que ela foi eluída junto com o dextran de 2.000.000 daltons.

### Sephacryl S-500

Abs. 485 nm

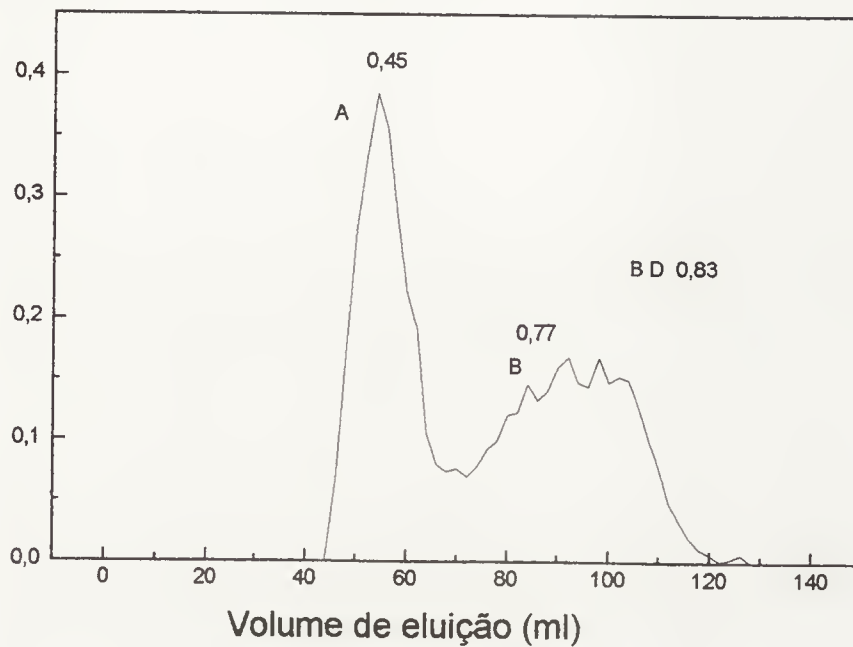


Figura 5a: Cromatograma de filtração em gel Sephacryl S-500 do PC de cultura “jovem”. As razões  $V_e/V_t$  para cada fração estão indicadas acima dos picos. “A” e “B” são as frações e BD, o dextran de 2.000.000 daltons. Coluna: 1,6 x 60 cm, fluxo: 0,4 ml/min

### Sephacryl S-500

Abs. 485 nm

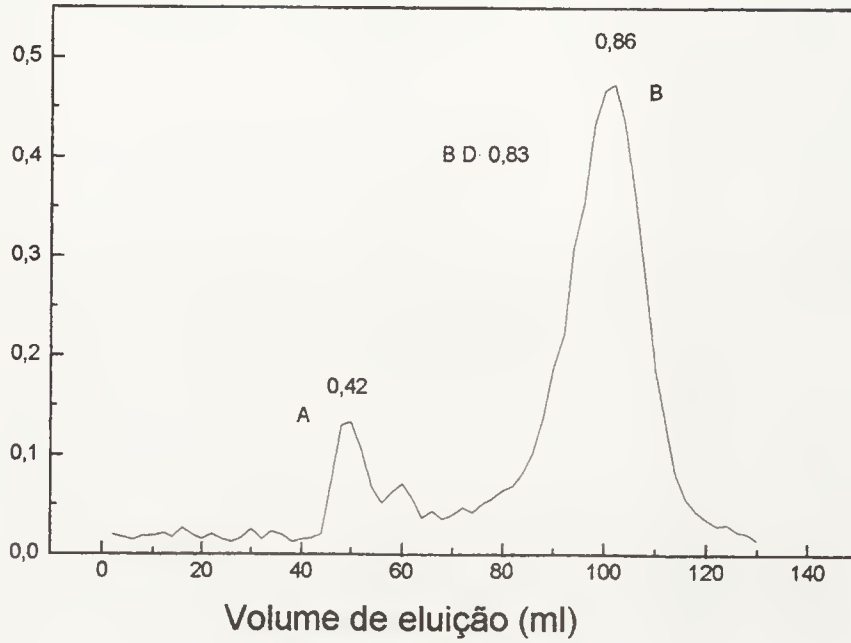


Figura 5b: Cromatograma de filtração em gel Sephacryl S-500 do PC de cultura “velha”. As razões  $V_e/V_t$  para cada fração estão indicadas acima dos picos. “A” e “B” são as frações e BD, o dextran de 2.000.000 daltons. Coluna: 1,6 x 60 cm, fluxo: 0,4 ml/min.

As porcentagens de participação das frações “A” e “B” em cada cromatograma (Sephacryl S-400) foram calculadas e os dados são apresentados através da Tabela 1.

Tabela 1: Participações percentuais das frações “A” e “B” no PED e no PC de culturas “jovem” e “velha”

Idade da cultura (Dias)	Frações	PED (%)	PC (%)
25	A	45	45
25	B	55	55
48	A	49	8
48	B	51	92

Os dados apresentados por meio da Tabela 1 mostraram que, quando se trata de PED, houve um equilíbrio nas porcentagens de participação das frações “A” e “B” em relação ao total, tanto para cultura “jovem” quanto para cultura “velha”.

No caso do PC, as porcentagens de participação das frações “A” e “B” de cultura “jovem” mostraram-se equilibradas. Entretanto, quando se trata de cultura “velha” houve um predomínio da fração “B” (de menor peso molecular) sobre a fração “A” (de maior peso molecular).

### 3.3. Cromatografia por troca iônica

Através das Figuras 6a, 6b e 6c são apresentados os cromatogramas referentes ao PED de cultura “velha” e os PCs de culturas “jovem” e “velha” submetidos a cromatografia por troca iônica, utilizando-se DEAE-Sepharose CL-6B e gradiente salino linear.



Mais uma vez foi observada uma similaridade entre os três cromatogramas: o PED de cultura “velha” apresentou apenas um pico de eluição, na concentração de 2,23 M, tendo, portanto, natureza ácida. O PC, também de natureza ácida, apresentou o pico de eluição na concentração de 2,15 M para cultura “jovem” e em 2,23 M para cultura “velha”.

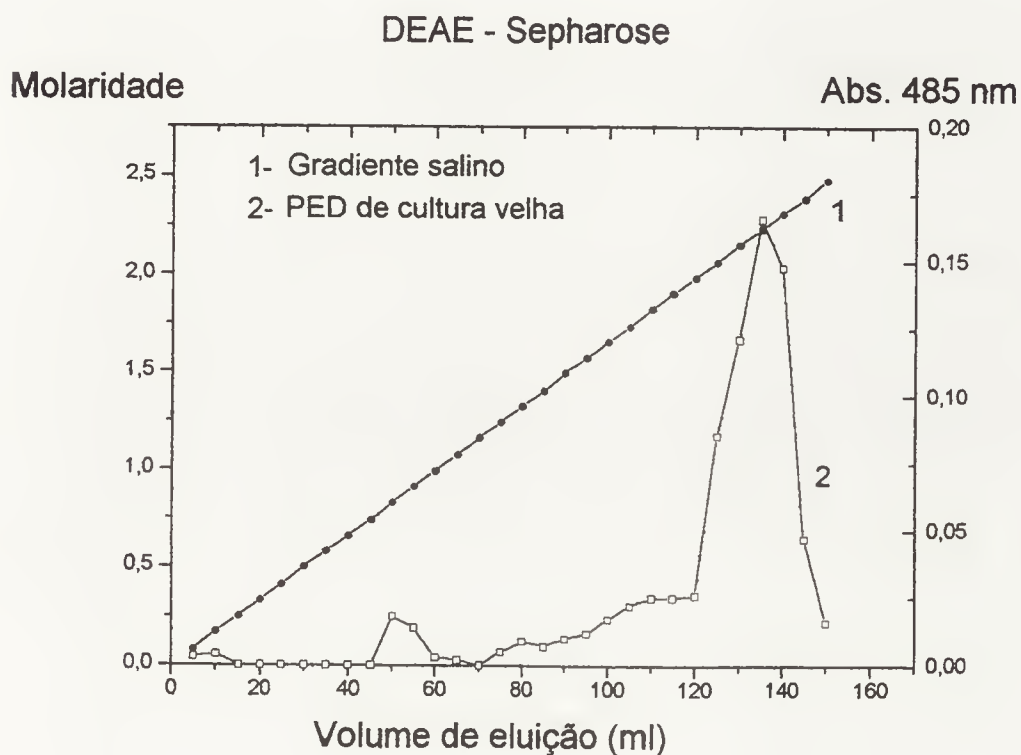


Figura 6a: Cromatograma em DEAE-Sepharose do PED de cultura “velha”, com um gradiente salino de 0,05 a 2,5 M de NaCl. Coluna 1,6 x 60 cm, fluxo: 1 ml/min.

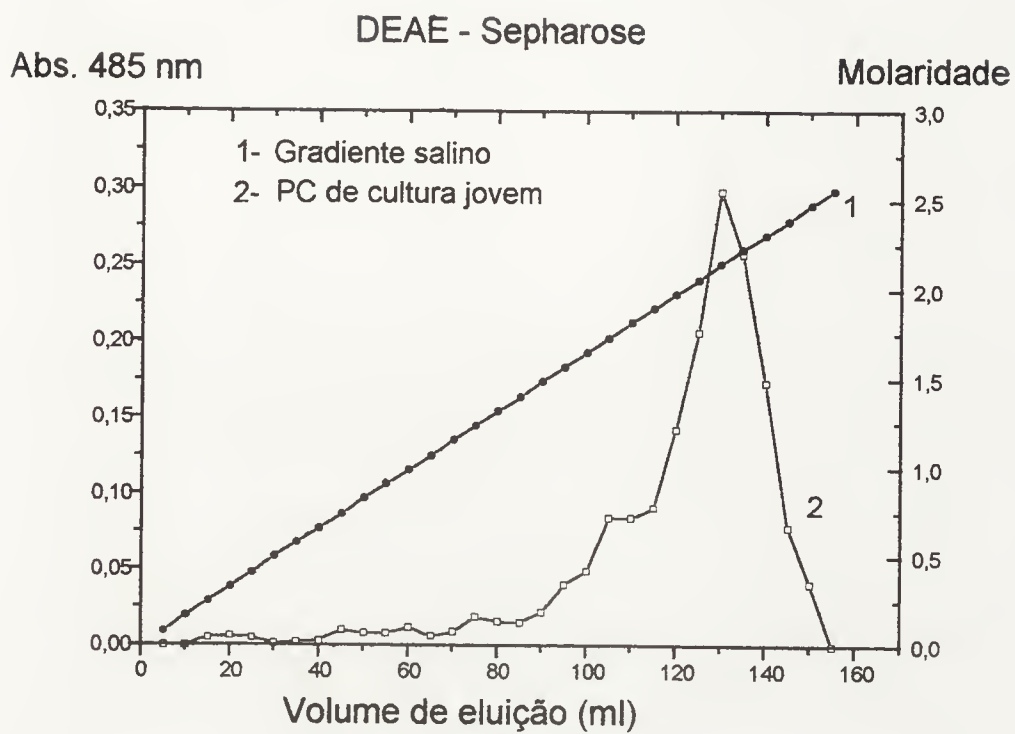


Figura 6b: Cromatograma em DEAE-Sepharose do PC de cultura “jovem”, com um gradiente salino de 0,05 a 2,5 M de NaCl. Coluna 1,6 x 60 cm, fluxo: 1ml/min.

## DEAE - Sepharose

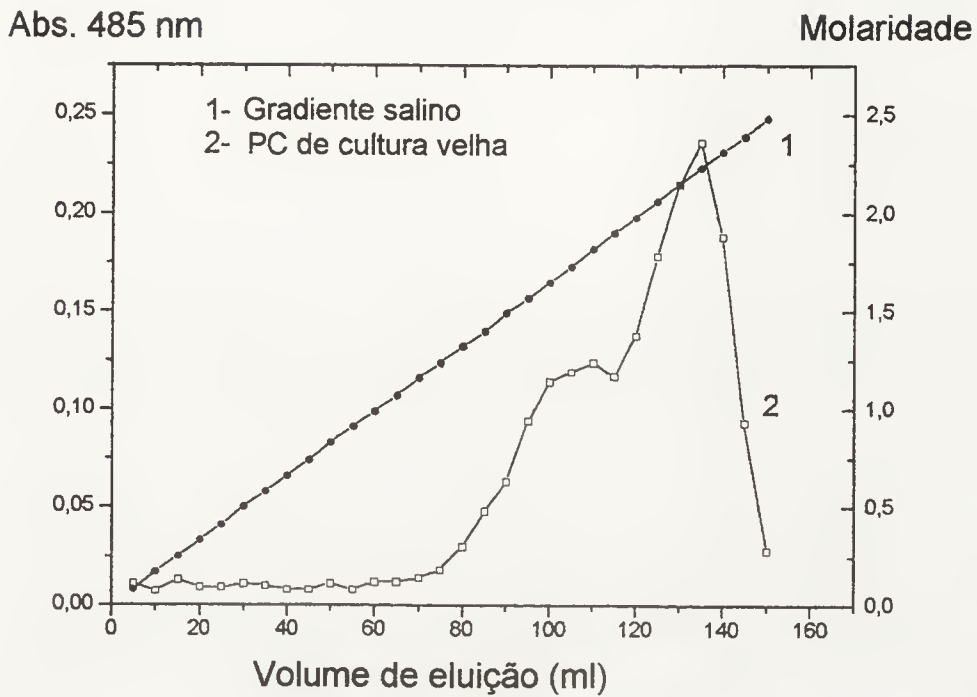


Figura 6c: Cromatograma em DEAE-Sepharose do PC de cultura “velha”, com um gradiente salino de 0,05 a 2,5 M de NaCl. Coluna 1,6 x 60 cm, fluxo: 1ml/min.

Os dados obtidos, utilizando-se cromatografia de filtração em gel, aliados aos de cromatografia por troca iônica, permitiram obter então, as seguintes informações sobre os compostos estudados: 1) tanto o PED quanto o PC de ambas as culturas (“jovem” e “velha”) apresentaram-se formados por dois tipos de polímeros diferentes com relação ao peso molecular, pois quando analisados por cromatografia de filtração em gel, foram separados em duas frações (“A” e “B”); 2) entretanto, quando se utilizou cromatografia por troca iônica, tanto o PED quanto o PC exibiram apenas um pico nas concentrações que variaram de 2,15 a 2,23 M, dependendo da idade da cultura.

### 3.4. Composição monomérica do PED e do PC

As análises de cromatografia gasosa revelaram que o PED e o PC apresentaram os mesmos monômeros, com proporções pouco diferenciadas. Os monômeros identificados foram: 1) os açúcares neutros: fucose, galactose, glicose, manose, ramnose, arabinose e 3-O-metil galactose; 2) os açúcares ácidos: ácido galacturônico e ácido glucurônico. Os açúcares que apareceram em maiores quantidades em ambos os polissacarídeos foram fucose, galactose e glicose (Tabela 2).

Tabela 2: Percentual de açúcares presentes no PED e no PC

Açúcar	PC	PED
Fucose 2	30,9	35,1
Galactose 2	17,6	20,4
Glicose 1	15,2	15,8
Manose 1	7,1	10,8
Ramnose 1	6,9	7,8
Ác. glucurônico 1	3,0	—
Arabinose 1	4,7	2,7
Ác. galacturônico 1	1,6	3,6
Ác. glucurônico 3	4,7	0,8
Ác. galacturônico 3	3,9	0,4
3-O-metil galactose 1	0,9	—
3-O-metil galactose 2	2,3	2,3
3-O-metil galactose 3	1,1	—

### **3.5. Conteúdo de carboidratos, de proteína e de sulfato do PED**

Carboidratos representaram em média 50% do polissacarídeo extracelular. Proteínas corresponderam em média a 6% do composto e nenhum teor de sulfato foi encontrado nesse material.



## 4. DISCUSSÃO

### 4.1. Dados fisiológicos

De acordo com FOGG (1975) a constante relativa de crescimento  $K$ , medida sob condições padrões, é constante para uma determinada espécie. Seu valor pode depender de vários fatores fisiológicos e metabólicos, mas geralmente o tamanho é o de maior importância, desde que ele determina a relação superfície/volume e desse modo a taxa relativa na qual materiais para o crescimento podem entrar na célula. De um modo geral, espécies pequenas crescem muito mais rápido do que espécies grandes.

*Staurastrum tohopekaligiensis* por ter, assim como muitas desmidiáceas, um tamanho relativamente grande, apresentou um valor baixo para  $K$ , quando comparado com as demais espécies cultivadas em laboratório nas mesmas condições de cultivo. Além disso, a fase exponencial da curva de crescimento de *S. tohopekaligiensis* apresentou um tempo de duração mais longo (em torno de 25 dias) do que aqueles verificados para a maioria das espécies do banco de algas do laboratório de Bioquímica e Fisiologia de Algas, com algumas exceções (observação pessoal).

Durante a fase exponencial de crescimento, a concentração de polissacarídeos extracelulares, tanto na forma de cápsulas quanto na forma dissolvida foi menor do que na fase estacionária. A quantidade obtida desses polissacarídeos foi insuficiente para se realizar qualquer tipo de análise. Este fato ocorreu provavelmente devido à utilização de inóculos com número muito reduzido de células. Não foi possível a obtenção de inóculos com maior número de células, pois a cada nova tentativa de inoculação, as células demoravam a crescer (por uma característica intrínseca à própria alga, como discutido acima). Quando se conseguia um número de células considerável, geralmente as culturas encontravam-se contaminadas, apesar de todos os cuidados tomados com relação às técnicas assépticas. Por outro lado, uma vez atingida a fase estacionária, esta alga liberou grandes quantidades de material extracelular, tanto na forma de cápsulas, quanto na forma

dissolvida, para o meio circundante. De modo geral, a intensa liberação de polissacarídeos nesta fase tem sido amplamente verificada em desmidiáceas (BROOK, 1981). Em concordância com estudos anteriores de outras espécies (FOGG, 1966), a liberação de carboidratos dissolvidos expressa em carboidratos/ $10^3$  células, mostrou-se maior nos estágios iniciais e finais da curva de crescimento.

O aumento da liberação de polissacarídeos na fase estacionária do ciclo de crescimento não só de desmidiáceas, mas de outras algas, é um fenômeno comum observado em culturas de laboratório tipo "batch" (GUILLARD & WANGERSKY, 1958; MARKER, 1965; GUILLARD & HELLEBUST, 1971; MYKLESTAD, 1974, 1977). A este respeito os autores associam o aumento da produção de carboidratos com o término de nutrientes, principalmente nitrogênio e fósforo; envelhecimento celular; artefatos de técnica ou com outro fator estressante que iniba a divisão celular (HELLEBUST, 1974; FOGG, 1980; JENSEN, 1984). Por exemplo, os experimentos de laboratório efetuados por VIEIRA & CÁCERES (1988), com diferentes meios de cultura, mostraram que as taxas de excreção de carboidratos extracelulares foram maiores em situações nas quais as algas não apresentaram as melhores taxas de rendimento (células/ml e clorofila  $a/l$ ), o que foi atribuído à exaustão de nutrientes, com algumas espécies, ou ao excesso de nutrientes com outras.

#### **4.2. Caracterização do PED e do PC de *Staurastrum tohopekaligiensis* e sua importância ecológica**

O material excretado (tanto o extracelular dissolvido quanto o capsular) de ambas as idades celulares estudadas, liberado por *S. tohopekaligiensis* é formado por dois compostos polissacarídicos, ambos de alto peso molecular, que aqui receberam a denominação de fração "A" e fração "B". A fração "A", apresentou peso molecular mais alto, estimado em maior ou igual a  $2 \times 10^6$  daltons e a fração "B" apresentou peso molecular menor, estimado em torno de  $2 \times 10^6$  daltons. Porém, deve-se ter bem claro que o termo "peso molecular" encontrado neste e em outros trabalhos que utilizam a técnica de

cromatografia de filtração em gel, na verdade, é o peso molecular aparente, uma vez que a permeação no gel depende não apenas do tamanho mas também da forma das moléculas. Por exemplo, polímeros longos, lineares permeam o gel menos extensivamente do que moléculas compactas do mesmo peso molecular. Além disso, desde que o peso molecular de um polissacarídeo não é rigidamente controlado durante sua biossíntese, existe uma distribuição dos pesos moleculares. Portanto, o peso molecular é o “peso molecular médio” do polissacarídeo em questão (PAZUR, 1986). Do mesmo modo, o peso molecular do dextran traduz uma estimativa de seus pesos moleculares. No presente trabalho, além das limitações inerentes à própria técnica, acrescentou-se o fato de não existir um maior número de dextrans padrões que teriam permitido a obtenção de maiores informações sobre a grandeza do peso molecular dos polissacarídeos.

A liberação de compostos polissacarídicos de alto peso molecular por populações naturais de algas em ecossistemas marinhos foi relatada por HOYT (1970). Este pesquisador considera moléculas de alto peso molecular como sendo aquelas com peso molecular superior a 50.000 daltons. Através de análises de redução dos coeficientes de fricção das macromoléculas dissolvidas, ele concluiu que os exsudatos, tanto de espécies fitoplanctônicas, quanto de macroalgas, podem ser uma importante fonte de compostos de alto peso molecular naqueles ambientes.

Entretanto, a faixa de variação considerada como de alto peso molecular apresenta diferenças segundo os diversos autores. Trabalhos como os de SONDERGAARD & SCHIERUP (1982); KATO & STABEL (1984); HAMA & HANDA (1987); SUNDH (1989, 1992); TRANVIK (1990), entre outros, consideram moléculas de alto peso molecular, aquelas entre 1.500 e 10.000 daltons. Para COLE *et al.* (1984), esta faixa compreende moléculas acima de 10.000 daltons. Já para CHRÓST & FAUST (1983), a amplitude de variação de compostos de alto peso molecular situa-se acima de 300.000 daltons.

Estudos de compostos polissacarídicos excretados por algas na faixa de peso molecular encontrada neste trabalho são escassos. Para espécies de água doce, podemos citar os trabalhos de ALLARD & CASADEVALL (1990) e NORDI (1993). ALLARD & CASADEVALL (1990), estudando cinco linhagens de *Botryococcus braunii*

(Chlorococcales), relataram que os polissacarídeos extracelulares excretados por essas algas são polímeros heterogêneos de alto peso molecular, sendo que dois deles apresentaram frações com pesos moleculares estimados em 2.000.000 daltons. NORDI (1993) demonstrou que o excretado de uma outra Chlorococcales, *Ankistrodesmus densus*, também é um polímero heterogêneo, formado por duas frações: uma de peso molecular estimado maior ou igual a 2.000.000 daltons e outra de aproximadamente 10.000 daltons.

Vários estudos (inclusive o de NORDI, 1993) têm focado a interação excretado algal-bactérias *in situ* e em culturas de laboratório. Esses estudos têm demonstrado que a utilização bacteriana de compostos orgânicos excretados de menor peso molecular é extremamente rápida (NALEWAJKO & LEAN, 1972). Como resultado, os compostos mais simples de baixo peso molecular são utilizados e degradados rapidamente e substâncias de alto peso molecular permanecem no ambiente por mais tempo devido a suas taxas muito lentas de degradação pelas bactérias (ITURRIAGA & ZSOLNAY, 1983; LANCELOT, 1984; HAMA & HANDA, 1987; SUND, 1992).

A distribuição de carboidratos tem sido investigada em vários ecossistemas lacustres. As concentrações encontradas são usualmente menores do que  $30 \mu\text{g.l}^{-1}$  e representam uma pequena porção da MOD total (HAMA & HANDA, 1980). Monossacarídeos e oligossacarídeos livres são assimilados prontamente por bactérias e ocorrem em concentrações muito baixas (menores do que  $\mu 10 \text{ g.l}^{-1}$ ). Polissacarídeos dissolvidos, consistindo de numerosas hexoses, pentoses e metilpentoses, ocorrem em maior abundância. Está claro que uma das maiores fontes desses compostos são produtos de excreção do fitoplâncton. Em culturas algais livres de bactérias, carboidratos, especialmente mono e dissacarídeos e MOD total aumentam na proporção do crescimento algal. Na presença de flora natural bacteriana, os produtos extracelulares são degradados rapidamente (horas). A maioria dos estudos tem demonstrado que o decaimento destes compostos é seletivo: os teores de carboidratos lábeis diminuem muito mais rápido do que os da matéria orgânica total dissolvida.

As taxas relativas de degradação microbiana, embora entendida em alguns detalhes pela abundância de informações fisiológicas da utilização bacteriana de substratos orgânicos, são muito difíceis de quantificar em populações naturais de bactérias aquáticas.





Em sistemas naturais, as populações bacterianas são heterogêneas e cada espécie pode ter diferentes habilidades para assimilar substratos específicos. Conseqüentemente, medidas de assimilação de substratos por bactérias esbarram com problemas metodológicos (BELL, 1980). Apesar disso, os estudos das taxas de assimilação de compostos orgânicos marcados radioativamente, em concentrações de substrato que ocorrem naturalmente, fornecem alguma informação sobre a cinética da utilização de substratos orgânicos por populações de bactérias planctônicas heterogêneas.

NORDI (1993), utilizando experimentos de laboratório, demonstrou que com a utilização de períodos longos de exposição dos compostos excretados de alto peso molecular de *A. densus* ao ataque bacteriano, é possível verificar que estes compostos podem ser usados como substrato para bactérias e discute a importância da duração do período de exposição ao ataque microbiano, principalmente no estudo das frações do excretado de maior peso molecular que não são lábeis, ou seja, não são rapidamente metabolizadas pelas bactérias.

Todas essas informações disponíveis na literatura permitem fazer considerações a respeito dos dados obtidos em laboratório no presente trabalho e suas possíveis implicações quando considerado o ambiente natural. Uma vez que os compostos excretados por *S. tohopekaligiensis* apresentam elevado peso molecular, eles irão, obviamente, atuar no ecossistema de maneira diferente de outros compostos de baixo peso molecular presentes na fração dissolvida. Presume-se que estes compostos tenham um tempo de residência maior na água e sejam degradados mais lentamente do que aqueles compostos com baixo peso molecular.

A esse fato soma-se um outro aspecto que deve ser discutido com relação ao excretado de *S. tohopekaligiensis*: sua natureza ácida evidenciada pelas análises de cromatografia por troca iônica e gasosa, devido à presença de ácidos urônicos (ácido galacturônico e ácido glucurônico). Ácidos glucurônicos também têm sido encontrados nos excretados de outras desmidiáceas, por exemplo, de *Hyalotheca dissiliens* (VIEIRA & PAULSEN, 1994) e de *Spondylosium panduriforme* (PAULSEN & VIEIRA, 1994). Uma das características dos ácidos urônicos constituintes dos polissacarídeos algais é a sua capacidade de complexar metais pesados (outras denominações encontradas na literatura

para este grupo de elementos são: “elementos-traço”, “metais traços”, “micronutrientes”, etc.). De acordo com ESTEVES (1988), “elementos-traço” são os elementos químicos que ocorrem na natureza, de um modo geral, em pequenas concentrações, da ordem de partes por bilhão (ppb) a partes por milhão (ppm). Alguns elementos-traço são essenciais aos seres vivos, ainda que em pequenas concentrações e ODUM (1985), que utiliza a terminologia “micronutrientes”, seleciona dez deles que são considerados especialmente importantes para os vegetais: ferro (Fe), manganês (Mn), cobre (Cu), zinco (Zn), boro (B), silício (Si), molibdênio (Mo), cloro (Cl), vanádio (V) e cobalto (Co). ODUM (*op. cit.*) divide-os em três grupos: aqueles necessários para a fotossíntese (Mn, Fe, Cl, Zn e V); aqueles necessários para o metabolismo do nitrogênio (Mo, B, Co e Fe) e aqueles necessários para outras funções metabólicas (Mn, B, Co, Cu e Si). Outros elementos-traço, como mercúrio (Hg), chumbo (Pb), cádmio (Cd), prata (Ag), cromo (Cr), níquel (Ni) e estanho (Sn), comumente chamados de metais pesados, entretanto, não têm função biológica conhecida e são geralmente tóxicos a uma grande variedade de organismos. Mesmo aqueles elementos com função biológica definida, podem, quando em grandes concentrações, apresentar alta toxicidade aos organismos vegetais e animais.

Apesar de existirem evidências de que outras substâncias, além de polissacarídeos, exibem a capacidade de complexar metais, pequenas moléculas tais como aminoácidos, açúcares ou hidroxíácidos não desempenham um papel significativo na complexação de metais devido a suas concentrações serem muito baixas nos ambientes aquáticos. A grande maioria dos componentes orgânicos nesses ecossistemas, como já citado anteriormente são macromoléculas, incluindo polissacarídeos.

KAPLAN *et al.* (1988) estudaram a capacidade de complexar metais utilizando os polissacarídeos produzidos por duas espécies marinhas de *Chlorella* (*C. stigmatophora* e *C. salina*). Os polissacarídeos dissolvidos produzidos pelas duas espécies diferiram na sua composição química e na capacidade de complexar metais. O polissacarídeo de *C. stigmatophora*, que é altamente carregado, exibiu alta capacidade de complexação de metais, enquanto que aquele de *C. salina*, que é mais neutro e fracamente carregado, não adsorveu metais sob as mesmas condições experimentais. Além disso, a fração de *C. stigmatophora* contendo a maior quantidade de ácidos urônicos foi aquela que exibiu a



maior capacidade de complexação. De acordo com esses pesquisadores, desde que os polissacarídeos das duas espécies de *Chlorella* contêm quantidades similares de sulfato, parece que a capacidade de complexar metais do polissacarídeo de *C. stigmatophora* deveu-se principalmente ao seu conteúdo de ácidos urônicos. Estudos anteriores sugerem que a capacidade de complexar metais é função da superfície de cargas iônicas, resultantes de grupos carboxílicos e hidroxílicos (KOHN *et al.*, 1968). Tem sido também relatado que outros polissacarídeos extracelulares, tais como alginatos de algas e de bactérias e pectatos de plantas, os quais são negativamente carregados e ricos em ácidos urônicos exibem alta capacidade de complexar metais (MANZINI *et al.*, 1984).

Similarmente, MANGI & SCHUMACHER (1979) demonstraram que a alga de água doce *Mesotaenium* produz um polissacarídeo extracelular, rico em ácidos urônicos, que é capaz de se ligar ao cobre, dessa forma protegendo a alga contra a toxicidade destes cátions. Entretanto, os polissacarídeos ricos em ácidos urônicos não são os únicos a exibirem essa capacidade. VIEIRA & NASCIMENTO (1989) demonstraram que o polissacarídeo produzido por *Ankistrodesmus densus* também apresenta essa característica. Mais recentemente, NORDI (1993), estudando esta mesma espécie de alga, demonstrou tratar-se de um polissacarídeo sem ácidos urônicos na sua composição, porém sulfatado.

A observação de que alguns polissacarídeos algais exibem capacidade de complexação de metais pode ter uma importante implicação ecológica, ou seja, polissacarídeos que são capazes de ligar-se a metais pesados sob condições naturais podem dessa maneira servir como quelantes naturais. KAPLAN *et al.* (1988) estudaram apenas os polissacarídeos dissolvidos de *Chlorella*. Estes pesquisadores acabaram não concluindo se a composição química das cápsulas é similar àquela da fração dissolvida. Caso seja, os autores sugerem que as células algais como um todo poderiam servir como um “varredor” de metais pesados e apontam o cultivo de algas em corpos d’água contaminados por metais pesados como uma técnica para neutralizar a toxicidade desses elementos em águas poluídas, uma vez que a formação dos chamados complexos de coordenação através do processo de quelação, mantém o elemento em solução e não tóxico, em comparação com os sais inorgânicos do metal. A esse respeito, ODUM (1985) considera que desde que, atualmente, os efluentes industriais estão repletos de metais tóxicos, é oportuno que

existam queladores na natureza para atenuar os efeitos tóxicos nos organismos. Ele relata, como exemplo, que a toxicidade do cobre em fitoplâncton está correlacionada com a concentração de íons livres ( $\text{Cu}^{++}$ ), e não com a de cobre total. Em decorrência disso, uma dada quantidade de cobre é menos tóxica num ambiente onde existe maior quantidade de matéria orgânica para complexar o metal.

Além disso, a formação dos complexos de coordenação, através do fenômeno de quelação, pode interferir na disponibilidade de nutrientes e dessa forma atuar de diversos modos numa série de processos no sistema aquático. Esses complexos de coordenação, uma vez formados se precipitam no sedimento (ESTEVEZ, 1985). Este fato é de grande importância para a produtividade primária, pois o fosfato também se adsorve às moléculas orgânicas, porém menos eficazmente do que os elementos-traço. Desse modo, quando muitos complexos de coordenação se formam, grande parte do fosfato permanece livre, podendo ser absorvido pelo fitoplâncton e pelas macrófitas aquáticas, aumentando muitas vezes a produtividade (HUNTSMAN & SUNDA, 1980). Assim, a importância dos elementos-traço na produção do sistema seria indireta. Uma outra decorrência da precipitação da MOD juntamente com metais, na forma de complexos de coordenação seria a melhoria das condições ópticas da coluna d'água, influenciando também, neste caso, positivamente sobre a produção fitoplanctônica. Portanto, cabe ressaltar que o PED e o PC de *S. tohopekaligiensis*, devido à presença de ácidos urônicos na sua composição, podem atuar como quelantes de íons metálicos, diminuindo sua toxicidade ou ainda interferir na disponibilidade de nutrientes do meio.

A determinação dos monossacarídeos que compõem a parte polissacarídica do PED e do PC de *S. tohopekaligiensis* revelou a presença dos mesmos açúcares, porém em proporções um pouco diferentes. São estes: os açúcares neutros fucose, galactose, glicose, manose, ramnose, arabinose, 3-O-metil galactose e os açúcares ácidos; ácido galacturônico e ácido glucurônico. Entre as Chlorophyceae já estudadas, os açúcares mais comuns são: glicose, galactose, manose, xilose, arabinose, fucose, ramnose e ácidos urônicos (VOGEL, FRISH, GOTHAM, 1978; CRAYTON, 1980; ALLARD & CASADEVALL, 1990; NORDI, 1993; PAULSEN & VIEIRA, 1994; VIEIRA & PAULSEN, 1994). Portanto, os açúcares que compõem o polissacarídeo extracelular de *S. tohopekaligiensis* estão entre

aqueles comumente encontrados nos polissacarídeos excretados de diversas algas, exceto o 3-O-metil galactose. ALLARD & CASADEVALL (1990) também obtiveram dois açúcares menos comuns no excretado da alga *Botryococcus braunii*, 3-O-metil fucose e 3-O-metil ramnose, além dos açúcares usuais. NORDI (1993) relata que 3-O-metil galactose apareceu em grandes proporções na fração "A" do polissacarídeo excretado de *A. densus*. Embora tenha sido encontrado 3-O-metil galactose no polissacarídeo extracelular de *S. tohopekaligiensis*, as suas proporções (em torno de 2,3 % do total) não são comparáveis àquelas obtidas por NORDI em seu estudo com o polissacarídeo excretado de *A. densus* (37 % da fração "A" e 6 % da fração "B").

Os mesmos açúcares presentes no polissacarídeo extracelular de *S. tohopekaligiensis*, com exceção de manose, 3-O-metil galactose e ácido galacturônico, foram também encontrados em duas outras desmidiáceas, *Spondylosium panduriforme* e *Hyalotheca dissiliens*, porém em proporções diferentes (PAULSEN & VIEIRA, 1994; VIEIRA & PAULSEN, 1994). Similarmente a *S. tohopekaligiensis*, as células de *Spondylosium panduriforme* são circundadas por uma cápsula mucilaginosa bem definida consistindo de um polissacarídeo capsular e também produzem um polissacarídeo que se dissolve no meio de cultura (polissacarídeo extracelular dissolvido). No entanto, os autores estudaram a composição química do polissacarídeo capsular e do polissacarídeo extracelular e verificaram que ambos os polímeros apresentaram galactose, fucose, xilose, glicose, arabinose e ramnose, porém em proporções diferentes. Uma diferença marcante entre os dois polímeros de *S. panduriforme* foi aquela observada para o ácido glucurônico, que representou 24% do polissacarídeo extracelular mas apenas traços foram encontrados no polissacarídeo capsular. Após as duas amostras terem sido liofilizadas, o material capsular foi muito mais difícil de dissolver do que o material extracelular. A hipótese proposta pelos autores é de que a partir de um certo estágio de crescimento da alga, as unidades de ácido glucurônico sejam adicionadas ao material capsular para solubilizar o polímero, permitindo sua liberação no meio de cultura. *Hyalotheca dissiliens*, por sua vez, é caracterizada por uma expressiva liberação de material extracelular, formando uma bainha cujos bordos são irregulares e não bem delineados. Essa bainha mostra uma grande região de dissolução dos polissacarídeos ao lado de uma cápsula interior bem definida próximo à



parede celular. Nesse estudo dos polissacarídeos extracelulares de *H. dissiliens* desenvolvido por VIEIRA & PAULSEN (1994), análises de cromatografia gasosa do polissacarídeo dissolvido revelaram que o maior componente foi o ácido glucurônico (39 %), seguido de galactose (19 %), fucose (12 %), arabinose (10 %), xilose (10 %), ramnose (5 %) e glicose (5 %). Os polissacarídeos da bainha e da cápsula interna não foram analisados, mas os autores acreditam que caso sejam realizadas análises específicas da composição desses polímeros, irão revelar similaridades com o polissacarídeo extracelular.

Comparando-se os dados obtidos neste trabalho com *S. tohopekaligiensis* com os resultados de outras pesquisas com *H. dissiliens* e *S. panduriforme* (VIEIRA & PAULSEN, 1994; PAULSEN & VIEIRA, 1994), verifica-se que *S. tohopekaligiensis* apresentou algumas características do excretado comuns a *H. dissiliens*, outras comuns a *S. panduriforme* e ainda outras comuns a ambas as algas. Por exemplo, com relação ao conteúdo de sulfato e de proteína, os dados são similares para as três espécies: sulfato não foi detectado em qualquer das amostras dessas três algas. O conteúdo proteico do polímero extracelular foi 6 %, tanto para *S. tohopekaligiensis* quanto para *S. panduriforme* e 6,2 % para *H. dissiliens*.

Com relação aos açúcares presentes no polissacarídeo extracelular e no polissacarídeo capsular, tanto *S. tohopekaligiensis* quanto *S. panduriforme* apresentaram fucose e galactose como maiores componentes. Outra semelhança entre *S. tohopekaligiensis* e *S. panduriforme* diz respeito à forma da cápsula: ambas apresentam cápsulas mucilaginosas com os bordos bem definidos. Entretanto, como já foi mencionado, *S. panduriforme* apresentou diferenças na composição dos açúcares presentes no polissacarídeo da cápsula e do polissacarídeo extracelular, o que não aconteceu com *S. tohopekaligiensis* (como já mencionado anteriormente, os dados de cromatografia gasosa demonstram que o polímero capsular e o polímero extracelular de *S. tohopekaligiensis* são similares quanto à composição dos açúcares). Os polissacarídeos extracelular e capsular de *S. tohopekaligiensis* apresentaram também ácido glucurônico na sua composição, porém não nas proporções dos polissacarídeos extracelulares de *S. panduriforme* e de *H. dissiliens*, que o exibiram em quantidade significativamente maior.

Portanto, quando se procura agrupar as características químicas com os aspectos morfológicos das cápsulas, a tentativa de enquadrar *S. tohopekaligiensis* dentro dos padrões de excreção já conhecidos frustra-se.

As pesquisas já realizadas com os polissacarídeos produzidos por desmidiáceas mostram que algumas semelhanças ocorrem. Por exemplo, os polissacarídeos de *Spondylosium panduriforme* são também similares aos polissacarídeos ácidos de alto peso molecular produzidos por *Closterium* sp (DOMOZYCH *et al.*, 1993 *apud* PAULSEN & VIEIRA, 1994). Este polímero contém ácido glucurônico, fucose e xilose como os maiores componentes e galactose, glicose e arabinose em menores quantidades. Grande parte dos tipos de ligações são idênticas, mas existem certas diferenças.

Nesse sentido, pode-se afirmar que o número de espécies pesquisadas é ainda muito pequeno e os dados sobre a estrutura molecular são muito escassos para permitir a discussão se há ou não homogeneidade a respeito da composição química desses compostos nas estruturas extracelulares de desmidiáceas.

Acerca das possíveis funcionalidades dos polissacarídeos excretados, trabalhos mais recentes (COESEL, 1994, entre outros) têm confrontado teorias anteriores (HUTCHINSON, 1967; REYNOLDS, 1986). Uma dessas teorias considera os envoltórios mucilaginosos das algas planctônicas como meio de reduzir a taxa de afundamento dos organismos considerados. De fato, devido à baixa densidade do material gelatinoso, a velocidade de afundamento das células tende a diminuir. Por outro lado, a diminuição da relação superfície/volume da célula como um inevitável efeito do envoltório extracelular, irá diminuir a resistência e conseqüentemente aumentar a taxa de afundamento. Através de cálculos matemáticos COESEL (1994) deduz que uma alga hipotética dotada de longos processos e portanto tendo uma alta relação superfície/volume, iria afundar mais rápido quando envolvida por um envelope mucilaginoso globular, ainda que a densidade média da célula seja diminuída pelo envelope. Desde que desmidiáceas planctônicas como *Staurastrum* e *Staurodesmus* são conhecidas por apresentarem expressivos envelopes gelatinosos nos quais os processos celulares alongados geralmente estão completamente envolvidos na mucilagem, este autor questiona se a função principal do material extracelular seja de fato a redução da taxa de afundamento.

Uma outra teoria a respeito do significado ecológico da mucilagem de algas fitoplanctônicas sugere que ela pode proteger contra o “grazing” pelo zooplâncton (PORTER, 1977; REYNOLDS, 1986). No entanto, em desmidiáceas planctônicas as densidades populacionais costumam ser tão baixas que supõe-se que o “grazing” não seja uma variável importante na regulação da dinâmica populacional.

Uma terceira teoria sobre a função de uma matriz extracelular gelatinosa é que ela poderia auxiliar no aprisionamento de nutrientes escassos (YEH & GIBOR, 1970, entre outros). Os estudos de COESEL (1994) vêm reforçar esta última teoria. Estudando clones de desmidiáceas isolados de uma série de ambientes com diferentes estados tróficos, ele classificou o muco extracelular dessas algas em três tipos: a) nenhum muco extracelular visível; b) a presença de uma camada fina e frouxa de muco, irregularmente seguindo o contorno celular; c) a presença de um extenso envelope extracelular bem delineado envolvendo a célula, inclusive seus possíveis processos. Desse modo classificados, 75% dos taxa oligo-mesotróficos examinados foram caracterizados pela exibição do muco tipo c, contra 0% dos taxa euritróficos. COESEL (*op. cit.*) considera o envelope mucilaginoso tipo c uma parte essencial da célula e não uma mera massa de metabólitos celulares em excesso. Para este autor, uma evidência desta característica é o fato do envelope ser firmemente fixo à célula. Por exemplo, a configuração do muco extracelular não é perturbada por vigorosa aeração da cultura ou por pressão numa suspensão de células. Mesmo em suspensões extremamente densas nas quais as células ficam muito próximas umas às outras, as configurações do muco extracelular não se fundem em uma massa amorfa como acontece nas suspensões de células com muco tipo b. Os envelopes mucilaginosos do tipo c são conhecidos por sua estrutura fibrilar (BROOK, 1981) que pode explicar o alto grau de coerência interna. Um outro indicativo é que as células de *Cosmocladium saxonicum*, de *Cosmariium abbreviatum* var. *planctonicum* e de *Staurodesmus cuspidatus* var. *curvatus*, das quais foram extraídas as cápsulas restabeleceram a formação de novas cápsulas num período de 5 horas. O investimento de energia fotossintética na construção e, possivelmente, também na manutenção de um envelope extracelular sugere que essa estrutura seja de vital importância para a espécie em questão. COESEL (*op. cit.*) ressalta que a estrutura fibrilar da mucilagem extracelular em



desmidiáceas é tão complexa que, ao lado de uma mera qualidade de proteção, é mais provável que haja uma outra função envolvida, por exemplo, a absorção e secreção de compostos químicos específicos. A esse respeito, é interessante destacar que a presença do muco tipo c parece estar estritamente confinada aos “taxa” conhecidos por sua exclusiva ocorrência em habitats que são pobres em nutrientes. Além do mais, a maioria das desmidiáceas ticoplanctônicas e bênticas estudadas (todas originárias de habitats oligotróficos) é marcada por essa característica. Portanto, a observação de que um distinto envelope extracelular falta nas desmidiáceas euritróficas é inconsistente com a alta pressão de herbivoria encontrada em lagos eutróficos e a presença de um extenso envelope mucilaginoso em desmidiáceas ticoplanctônicas e bênticas é incompatível com a idéia de que sua função primária seja a redução da velocidade de afundamento. As cápsulas mucilaginosas de *S. tohopekaligiensis* apresentam as características do tipo c descritas por COESEL (1994), ou seja, presença de um extenso envelope extracelular bem delineado envolvendo a célula, inclusive seus processos. Esta espécie, inclusive, exibiu o mesmo comportamento mencionado por ele com relação à dificuldade de extração das cápsulas. Essa separação das cápsulas de suas respectivas células é tão mais difícil quanto mais jovem for a cultura. À medida em que as culturas foram envelhecendo, as cápsulas que envolvem as células tornaram-se mais extensas, porém ficou relativamente mais fácil a sua extração (observação pessoal).

Assim sendo, é aceitável que a mucilagem produzida por essa alga desempenhe uma função de vital importância, provavelmente relacionada com a troca de substâncias entre o meio e as células, principalmente nos estágios de crescimento ativo (ocasião em que as cápsulas estão fixas firmemente às células). Entretanto, ao contrário do que foi encontrado em outros estudos para algas das classes Cyanophyceae, Phaeophyceae e Rhodophyceae (KOSENKO, 1975; BONEY, 1981), no caso de *S. tohopekaligiensis* não foi possível analisar a ocorrência de mudanças qualitativas na composição do polissacarídeo extracelular quando se considera diferentes épocas do ciclo de crescimento.

Como já mencionado anteriormente, as análises de cromatografia de filtração em gel e por troca iônica revelaram neste estudo que o polissacarídeo capsular foi formado por dois tipos de polímeros (frações “A” e “B”) diferentes no peso molecular (maior ou igual a

$2 \times 10^6$  e  $2 \times 10^6$  daltons, respectivamente), porém ambos apresentaram natureza ácida. O polissacarídeo extracelular foi semelhante ao polissacarídeo capsular e pareceu não apresentar variação no que se refere à distribuição dos pesos moleculares em função da idade celular. A única diferença observada foi com relação ao polissacarídeo capsular de culturas “jovem” e “velha”: ambas as frações (“A” e “B”) tiveram participações equilibradas na formação deste polissacarídeo em cultura “jovem” (45 % e 55 %, respectivamente). Porém, no polissacarídeo capsular de cultura “velha”, houve um considerável aumento da participação da fração “B” (92 %) e diminuição relativa da fração “A” (8 %).

KOSENKO (1975), trabalhando com culturas de *Anabaena variabilis* e *Amorphonostoc paludosum*, verificou que, em culturas jovens, os monossacarídeos componentes dos polissacarídeos celulares e extracelulares foram diferentes e em culturas velhas, foram similares. Foi sugerido que a liberação de carboidratos extracelulares no meio de cultura deve-se a diferentes causas. Em culturas jovens, ocorre por excreção ativa e em culturas velhas, por autólise. Contudo, esses resultados foram obtidos para Cyanophyceae e infelizmente não existem trabalhos com microalgas clorofíceas, abordando diferentes épocas do ciclo de crescimento. Estudos desta natureza são altamente necessários, ao se considerar que a comunidade fitoplanctônica é composta por organismos diferentes que têm em comum apenas o fato de serem organismos fotossintetizantes e que certamente, diferentes algas possuem estratégias ecológicas diferentes. Provavelmente diferenciações adaptativas tenham surgido para certos compostos em diferentes espécies como resposta à complexidade fisiológica durante a evolução.

Com relação aos aspectos fisiológicos, função e composição química de exopolissacarídeos, os dados disponíveis na literatura são em número muito reduzido ao se considerar que espécies de microalgas produtoras de exopolissacarídeos são encontradas em quase todas as ordens taxonômicas que ocorrem em água doce. Com exceção de espécies que apresentam interesse econômico imediato, como é o caso de algumas espécies de *Porphyridium*, trabalhos mais sistemáticos de laboratório são raros e, portanto, o conhecimento a respeito da liberação de polissacarídeos extracelulares ainda é reduzido. Apesar da importância das microalgas em sistemas aquáticos, apenas recentemente um

número maior de pesquisadores voltaram suas atenções para as substâncias extracelulares liberadas por esses organismos.

Apesar de várias hipóteses a respeito da função dos compostos excretados por algas terem sido formuladas, nenhuma delas foi comprovada integralmente. Os trabalhos enfocando esse aspecto fornecem informações confusas e muitas vezes contraditórias. Isso se deve, provavelmente, ao fato destes trabalhos terem estudado a excreção total, como um fenômeno global sem levar em conta que compostos diferentes podem ter padrões de excreção diferentes e que esses padrões podem não ser os mesmos em espécies diferentes.

Uma abordagem experimental desse problema deve passar por trabalhos de laboratório que verifiquem a produção de carboidratos extracelulares durante o ciclo biológico dos organismos em culturas axênicas, separando a produção de carboidratos simples dos polissacarídeos extracelulares que, provavelmente, devem ter origens diferentes.

A importância do estudo das influências do estado fisiológico é óbvia, considerando-se que afeta diretamente as taxas de fotossíntese e trabalhos com culturas contínuas, sob estresse, poderão fornecer importantes informações.

Ao lado do estudo da excreção em populações fitoplanctônicas naturais, esse tipo de abordagem torna-se valioso ao se considerar, sob o ponto de vista ecológico, as grandes quantidades desses compostos, provenientes da produção primária e dispostos para o meio, ainda com seus produtores vivos.

Apesar de as possíveis funções dos carboidratos dissolvidos no meio natural não serem completamente conhecidas, com certeza pelo menos três maneiras de atuação direta no meio afetam as comunidades aquáticas de um modo efetivo e já bem descrito: como substrato para comunidades heterótrofas, como quelantes de íons metálicos e participando na formação de substâncias húmicas (estas duas primeiras discutidas no presente trabalho).

## 5. CONCLUSÕES

Com base nos experimentos realizados e nas análises efetuadas, os resultados obtidos permitiram chegar nas seguintes conclusões:

- 1) Os polissacarídeos extracelular dissolvido e capsular de *S. tohopekaligiensis* são similares. Quando submetidos a cromatografia de filtração em gel, esses polímeros apresentaram duas frações, denominadas de fração "A" e fração "B", tanto para cultura "jovem" quanto para cultura "velha".
- 2) A fração "A" apresentou peso molecular mais alto, estimado em maior ou igual a  $2 \times 10^6$  daltons e a fração "B" apresentou peso molecular menor, estimado em torno de  $2 \times 10^5$  daltons.
- 3) Com o avanço da idade celular (culturas "velhas"), foi observado um aumento relativo da participação percentual da fração "B" do polissacarídeo capsular sobre a fração "A".
- 4) O polissacarídeo extracelular de cultura "velha" e os polissacarídeos capsulares de culturas "jovem" e "velha", quando submetidos a cromatografia por troca iônica com gradiente linear, exibiram picos de eluição similares em concentrações que variaram de 2,15 a 2,23 M, evidenciando a natureza ácida destes compostos.
- 5) O material extracelular é composto de uma porção polissacarídica maior não sulfatada que representou 50 % e de uma porção proteica menor, correspondente a 6% do peso seco total.
- 6) A determinação dos monossacarídeos que compõem os polissacarídeos extracelular dissolvido e capsular de *S. tohopekaligiensis* revelou a presença, em ambos, dos açúcares neutros fucose, galactose, glicose, manose, ramnose, arabinose, 3-O-metil galactose e dos



açúcares ácidos: ácido galacturônico e ácido glucurônico, sendo que fucose, galactose e glicose foram os mais abundantes nos dois polissacarídeos. Estes dados sugerem que o polissacarídeo extracelular é proveniente da dissolução das cápsulas.

7) Houve um acúmulo de carboidratos totais dissolvidos no meio de cultura durante a fase estacionária de crescimento de *Staurastrum tohopekaligiensis*.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLARD, B. & CASADEVALL, E. Carbohydrate composition and characterization of sugars from the green microalga *Botryococcus braunii* **Phytochemistry**, v. 6, n. 22, p. 1845-78, 1990.
- ANTONOPOULOS, C. A. A modification for the determination of sulphate in mucopolysaccharides by the benzidine method. **Acta Chem. Scand.**, n. 16, p. 1521-1522, 1962.
- BALLESTER, M. V. R. **Fixação biológica do nitrogênio por bactérias heterotróficas na Lagoa do Infernã: uma lagoa marginal do Rio Mogi Guaçu (Estação Ecológica de Jataí, Luiz Antônio, SP)**. São Carlos. 1989 87 p. Dissertação.
- BELL, W. H. Bacterial utilization of algal extracellular products. 1. The kinetic approach. **Limnol. Oceanogr.**, n. 25, p. 1007-1020, 1980.
- BELL, W. H., SAKSHAUG, E. Bacterial utilization of algal extracellular products. 2. A kinetic study of natural populations. **Limnol. Oceanogr.**, v. 6, n. 25, p. 1021-1033, 1980.
- BITTON, G., FREIHOFER, V. Influence of extracellular polysaccharides on the toxicity of copper and cadmium toward *Klebsiella aerogenes*. **Microbial Ecol.**, n. 4, p. 119-125, 1978.
- BONEY, A. D. Mucilage: The ubiquitous algal attribute. **Br. Phycol. J.**, n. 16, p. 115-132, 1981.



- BROOK, A. Y. The biology of desmids. In: **Botanical Monographs**, Blackwell Scientific Publication. Oxford., 1981, v. 16, p. 79-98.
- BURNEY, C. M. Bacterial utilization of total in situ dissolved carbohydrate in offshore waters. **Limnol. Oceanogr.** v. 2, n. 31, p. 427-431, 1986.
- CÁCERES, O., VIEIRA, A. A. H. Produção de carboidrato intra e extracelular durante o crescimento de quatro espécies de algas de água doce. **An. Sem. Reg. Ecol. VI**, p. 183-195, 1988.
- CHRISTIAN, G. **Analytical Chemistry**. John Wiley & Sons, 1986, 676 p.
- CHRÓST, R. J., FAUST, M. A. Organic carbon released by phytoplankton: its composition and utilization by bacterioplankton. **J. of Plankton Research**, v. 4, n. 5, p. 477-493, 1983.
- CLEARE, M. A., PERCIVAL, E. Carbohydrates of fresh water alga *Tribonema aequale*. I. Low wight and poysaccharides. **Br. Phycol. J.**, n. 7, p. 185-193, 1972.
- COESEL, P. F. M. On the ecological significance of a cellular mucilaginous envelope in planktic desmids. **Algological Studies**, n. 73, p. 65-74, 1994.
- COLE, J. J., MACDOWELL, W. H., LIKENS, G. E. Sources and molecular weight of dissolved organic carbon in a oligotrophic lake. **Oikos**, n. 42, p. 1-9, 1984.
- COLLINS, C. H., BRAGA, G. L. BONATO, P. S. **Introdução a métodos cromatográficos**. Editora da UNICAMP, 4 ed., 1990, 279 p.

- COUTINHO, M. E. **Ecologia populacional de *Eichhornia azurea* (KtH) e sua participação na dinâmica da vegetação aquática da Lagoa do Infernã, SP.** São Carlos, UFSCar, 1989, 145 p. Dissertação.
- CRAYTON, M. A. Presence of sulfated polysaccharide in the extracellular matrix of *Pandorina caudata* (Volvocales, Chlorophyta). **J. Phycol.**, n. 16, p. 80-87, 1980.
- DIAS Jr., C. **Ciclo anual do fitoplâncton e algumas variáveis ambientais da Lagoa do Infernã (SP).** São Carlos, UFSCar, 1990, 108 p. Dissertação.
- DUBOIS, M., GILLES, K. A., HAMILTON, J. K., REBERS, P. A., SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Anal. Chem.**, n. 28, p. 350-356, 1956.
- EBERLEIN, K., BROCKMAN, U. H. Development of particulate and dissolved carbohydrates in parallel enclosure experiments with monoculture of *Thalassiosira rotula*. **Mar. Ecol. Prog. Ser.** n. 3, p. 133-138, 1986.
- ESTEVEES, F. A. **Fundamentos de limnologia.** Rio de Janeiro, Interciência/FINEP, 1988, 575 p.
- ESTEVEES, M. R. **Dinâmica da fixação do nitrogênio pela comunidade perifítica de *Eichhornia azurea* Kunth, em um ecossistema de inundação do Rio Mogi Guaçu (Lagoa do Infernã).** São Carlos, UFSCar., 1991, 100 p. Dissertação.
- EVANS, L. V., CALLOW, M. E., PERCIVAL, E., FAREED, V. Studies on the synthesis and composition of extracellular mucilage in the unicellular red alga *Rhodella*. **J. Cell. Sci.**, n. 16, p. 1-21, 1974.

- FERESIN, E. G. **Nitrificação em uma lagoa marginal do Rio Mogi Guaçu (Lagoa do Infernã, Estação Ecológica de Jataí, Luiz Antônio, SP).** São Carlos. UFSCar, 1991, 77 p. Dissertação.
- FERESIN, E. G. **Produção de carbono orgânico via fitoplâncton e bacterioplâncton em duas lagoas da planície de inundação do Rio Mogi Guaçu (Estação Ecológica de Jataí, SP).** São Carlos. UFSCar, 1994, 111 p. Tese.
- FISHER, L. **Gel filtration chromatography.** Elsevier North-Holland Biomedical Press 2<sup>nd</sup> ed., 1980, 269 p.
- FLAIBANI, A., OLSEN, Y., PAINTER, T. J. Polysaccharides in desert reclamation composition of exocellular proteoglycan complexes produced by filamentous blue green and unicellular green edaphic algae. **Carbohydr. Res.** n. 190, p. 235-248, 1989.
- FOGG, G. E. The extracellular products of algae. **Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev.**, n. 4, p. 195-212, 1966.
- FOGG, G. E. Biochemical pathways in unicellular plants. In: COOPER, J. P. ed. **Photosynthesis and productivity in different environments.** Cambridge University Press, Cambridge, 1975, p. 437-457.
- FOGG, G. E. **Algal cultures and phytoplankton ecology.** The University of Wisconsin Press. 2<sup>nd</sup> ed., 1975, 175 p.
- FOGG, G. E. Phytoplanktonic primary production. In: BARNES, R. S. K. & MANN, K. H. (ed.) **Fundamentals of Aquatic Ecosystems.** Blackwell Scientific Publ., 1980, p. 24-45.

- FOGG, G. E. Ecological significance of extracellular products of phytoplankton photosynthesis. **Bot. Mar.**, n. 26, p. 13-14, 1983.
- FREITAS, E. A. C. **Bactérias do sedimento da Lagoa do Infernã (Luiz Antônio, SP): distribuição temporal e composição por grupos produtores de exoenzimas.** São Carlos, UFSCar., 1989, 100 p., Dissertação.
- FULTON, A. B. Colonial development in *Pandorina morum*. Structure and composition of extracellular matrix. **Dev. Biol.**, n. 64, p. 224-235, 1978.
- GALETTI Jr., P. M. et al. Aspectos comparativos da ictiofauna de duas lagoas marginais do rio Mogi-Guaçu (Alto Paraná - Estação Ecológica do Jataí, SP). **Acta Limnol. Brasil.**, 3 (2), p. 865-885, 1990.
- GIANOTTI, E. P. **Desnitrificação em uma lagoa marginal do Rio Mogi Guaçu, Lagoa do Infernã, Estação Ecológica de Jataí (município de Luiz Antônio, SP).** São Carlos, UFSCar, 1994, 300 p., Tese.
- GOLTERMAN, H. L., CLYMO, R. S., OHNSTAD, M. A. M. Methods for physical and chemical analysis of fresh waters. **IBP Handbook 8.** Blackwell Scientific Public., 1978, 215 p.
- GUILLARD, R. R. L., WANGERSKY, P. J. The production of extracellular carbohydrates by some marine flagellates. **Limnol. Oceanogr.**, n. 3, p. 449-454, 1958.
- GUILLARD, R. R. L., HELLEBUST, J. A. Growth and the production of extracellular substances by two strains of *Phaeocystis poucheti*. **J. Phycol.**, n. 7, p. 330-338, 1971.
- GUILLARD, R. L., LORENZEN, C. J. Yellowgreen algae with chlorophyllid-c. **J. Phycol.**, n. 8, p. 10-14, 1972.

- HAMA, T., HANDA, N. Molecular weight distribution and characterization of dissolved organic matter from lake waters. **Arch. Hydrobiol.**, n. 90, p. 106-120, 1980.
- HAMA, T., HANDA, N. Pattern of organic matter production by natural phytoplankton population in a eutrophic lake. 1. Extracellular products. **Arch. Hydrobiol.**, v. 2, n. 109, p. 227-243, 1987.
- HELLEBUST, J. A. Extracellular products. In: STEWART, W.D.P. **Algal Physiology and Biochemistry**. Blackwell. Oxford, 1974, p. 838-863.
- HOSHAW, R. W., McCOURT, R. M. The Zygnemataceae (Chlorophyta): a twenty-year update of research. **Phycologia**, n. 27, p. 511-548, 1988.
- HOYT, J. W. High molecular weight algal substances in the sea. **Mar. Biol.**, n. 7, p. 93-99, 1970.
- HUNSTMAN, S. A., SUNDA, W. G. The role of trace metals in regulating phytoplankton growth. In: MORRIS, I. ed. **The physiological ecology of phytoplankton**. Boston, Blackwell, 1980, p. 285-328.
- HUTCHINSON, G. E. **A treatise on limnology**. II. Introduction to lake biology and limnology. New York, John Wiley & Sons, 1967, 1115 p.
- ITURRIAGA, R., ZSOLNAY, A. Transformation of some dissolved organic compounds by natural heterotrophic populations. **Mar. Biol.**, n. 62, p. 125-129, 1981.
- ITURRIAGA, R., ZSOLNAY, A. Heterotrophic uptake and transformation of phytoplankton extracellular products. **Bot. Mar.**, n. 26, p. 375-381, 1983.



- JENSEN, L. M. Phytoplankton release of extracellular organic carbon molecular weight composition and bacterial assimilation. **Mar. Ecol. Prog. Ser.**, v. 1, n. 11, p. 39-48, 1983.
- JENSEN, A. Excretion of organic carbon as function of nutrient stress. In: HOLM-HANSEN, O., BOLIS, L. & GILLES, R. (ed) **Marine Phytoplankton and Productivity Lecture Notes on Coastal and Estuarine Studies**. Springer Verlag, Berlin, v. 8, 1984, p. 61-72.
- JURGENS, U. J., WECKESSER, J. Polysaccharide covalently linked to the peptideoglycan of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. Strain PCC 6714. **J. Bacteriol.**, v. 2, n. 168, p. 568-573, 1986.
- KAPLAN, D., CHRISTIAEN, D., MARAD, S. M. Binding of heavy metals by algal polysaccharides In: **Algal Biotechnology**. Ed. Stadler, T. et al. Elsevier Applied Sciences., 1988, p. 179-187.
- KATNER, E., LORCH, D., WEBER, A. Die Bausteine der Zellwand und der Gallerte eines Stammes von *Netrium digitus* (Ehr.) Itzigs & Rothe. **Mitt. Inst. Allg. Bot. Hamburg.**, n. 15, p. 33-39, 1970.
- KATO, K., STABEL, H. H. Studies on the carbon flux from phyto to bacterioplankton communities in Lake Constance. **Arch. Hydrobiol.**, v. 2, n. 102, p. 177-192, 1984.
- KOHN, R., FURDA, I., HAUG, A., SMIDSRØD, O. Binding of calcium and potassium to some polyuronides and monuronates. **Acta. Chem. Scand.**, n. 22, p. 3098-3102, 1968.
- KOSENKO, L. V. Cellular and extracellular carbohydrates in cultures of *Anabaena variabilis* (Kutz.) 359 and *Amorphonostoc paludosum* (Kutz.). **Hydrobiol. J.**, 11 (1), p. 41-46, 1975.



- LANCELOT, C. Factors affecting phytoplankton extracellular release in the Southern Bight of the North Sea. **Mar. Ecol. Prog. Ser.**, n. 12, p. 115-121, 1983.
- LANCELOT, C. Extracellular release of small and large molecules by phytoplankton in the Southern Bight of the North Sea. **Estuar. Coast. Shelf. Sci.**, n. 18, p. 65-67, 1984.
- LEWIN, R. A. Extracellular polysaccharide of green algae. **Can. J. Microbiol.**, n. 2, p. 665-672, 1956.
- LEWIN, J. G., LEWIN, R. A., PHILPOTT, D. E. Observations on *Phaeodactylum tricoratum*. **J. Gen. Microbiol.**, n. 18, p. 418-426, 1958.
- LIMA, N. R. Análises dos níveis de metais pesados no sistema hídrico da Estação Ecológica do Jataí, SP. **Acta. Limnol. Brasil.**, 3 (2), p. 1001-1021, 1990.
- LOWRY, O. H., ROSENBROUGH, N. J., FARR, A. L., RANDALL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, n. 193, p. 265-275, 1951.
- MANZINI, G., CEESARO, A., DELBIN, F., PAOLETTI, S., REISENHOFER, E. Copper (II) binding by natural ionic polysaccharides I. Potentiometric and spectroscopic data. **Bioelectrochemistry and Bioenergetics**, n. 12, p. 443-454, 1984.
- MARKER, A. F. H. Extracellular carbohydrate liberation in the flagellates *Isochrysis galbana* and *Prymnesium parvum*. **J. Mar. Biol.**, n. 45, p. 755-772, 1965.
- MAGUE, T. H. E., FRIBERG, E., HUGHES, D. J., MORRIS, I. Extracellular release of carbon by marine phytoplankton, a physiological approach. **Limnol. Oceanogr.**, 25 (2), p. 262-279, 1980.

- MANGI, J. I., SCHUMACHER, G. J. Physiological significance of copper-slime interactions in *Mesotaenium* (Zygnematalea: Chlorophyta). **Amer. Midl. Nat.**, n. 102, p. 134-139, 1979.
- MARLOWE, I. T., ROGERS, L. J., SMITH, A. J. Extent and nature of extracellular organic production by marine coccolithophorid *Hymenomonas carterae*. **Mar. Biol.** n. 100, p. 381-391, 1989.
- MIX, M. Licht und elektronmikroskopische Untersuchungen an Desmidiaceen. XII. Zur Feinstruktur der Zellwand und Mikrofibrillen einiger Desmidiaceen vom Cosmarium-Type. **Arch. Mikrobiol.**, n. 55, p. 116-133, 1966.
- MUNSTER, U., CHRÓST, R. J. Origin, composition, and microbial utilization of dissolved organic matter. In: OVERBECK, J., CHRÓST, R. J. (ed.). **Aquatic Microbial Ecology - biogeochemical and molecular approaches**. Springer-Verlag., 1990, p. 9-46.
- MYKLESTAD, S. Production of carbohydrates by planktonic diatoms. I. Comparison of nine different species in culture. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.**, n. 15, p. 261-274, 1974.
- MYKLESTAD, S. Production of carbohydrates by marine planktonic diatoms. II. Influence of the N/P ratio in the growth medium on the assimilation ratio, growth rate, and production of cellular and extracellular carbohydrates by *Chaetoceros affinis* var. *willei* (Gran) Hustedt and *Skeletonema costatum* (Grev.) Clev. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.**, n. 29, p. 161-179, 1977.
- MYKLESTAD, S., HAUG, A., LARSEN, B. Production of carbohydrates by the marine diatom *Chaetoceros affinis* var. *Willei* (Gran) Hustedt. II. Preliminary investigation of the extracellular polysaccharide. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.**, n. 9, p. 137-144, 1972.

- NAKAGAWA, M., TAKAMURA, Y., YAGI, O. Isolation and characterization of the slime from a cyanobacterium, *Microcystis aeruginosa* k-3A. *Agric. Biol. Chem.*, v. 2, n. 51, p. 329-337, 1987.
- NALEWAJKO, C., LEAN, D. S. R. Growth and excretion in planktonic algae and bacteria. *J. Phycol.*, n. 8, p. 361-366, 1972.
- NALEWAJKO, C., MARIN, L. Extracellular production in relation to growth of four planktonic algae and phytoplaktonic populations from lake Ontario. *Can. J. Bot.* 47: 405-413, 1969.
- NOGUEIRA, F. M. B. **Importância das macrófitas aquáticas *Eichhornia azurea* Kunth e *Scirpus cubensis* Poepp & Kunth na ciclagem de nutrientes e nas principais características limnológicas da Lagoa do Infernã (SP).** São Carlos, UFSCar, 1989, 147 p., Dissertação.
- NOGUEIRA, F. M. B., ESTEVES, F. A. Variação temporal da biomassa de duas espécies de macrófitas aquáticas em uma lagoa marginal do Rio Mogi-Guaçu (SP). *Acta Limnol. Brasil.*, 3 (2), p. 617-632, 1990.
- NORDI, C. S. F. **Compostos polissacarídicos de alto peso molecular excretados por *Ankistrodesmus densus* (Kors) (Chlorophyceae): sua utilização como substrato para bactérias.** São Carlos, UFSCar. 1993, 89 p. Tese.
- OBARA, A. T. **Dinâmica da fixação biológica do nitrogênio e a influência de herbicidas na comunidade de diazotróficos perifíticos das raízes de *Scirpus cubensis* (Lagoa do Infernã, Estação Ecológica de Jataí, Luiz Antonio, SP).** São Carlos. UFSCar, 1992, 155 p. Dissertação.
- ODUM, E. P. **Ecologia.** Interamericana, Rio de Janeiro. 1985, 434 p.

- PAINTER, T. J. Algal polysaccharides. In: ASPINALL, G. (ed.) **Polysaccharides**. Academic Press, Orlando, Florida, 1983, p. 195-285.
- PANOFF, J. M., PRIEM, B., MORVAN, H., JOSET, F. Sulphated exopolysaccharides produced by two unicellular strains of cyanobacteria, *Synechocystis* PCC 6803 and 6714. **Arch. Microbiol.**, n. 150, p. 558-563, 1988.
- PANOFF, J. M., JOSET, F. Selection by anion-exchange chromatography of exopolysaccharide mutants of cyanobacterium *Synechocystis* strain PCC 6803. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 6, n. 55, p. 1452-1456, 1989.
- PAULSEN, B. S., HAUG, A., LARSEN, B. Structural studies of a carbohydrate-containing polymer in the mucilage tubes of the diatom *Berkeleya rutilans* (Trent.) Grun. **Carbohydr. Res.**, n. 66, p. 103-111, 1978.
- PAULSEN, B. S., VIEIRA, A. A. H., KLAVENESS, D. Structure of extracellular polysaccharides produced by a soil *Cryptomonas* (Cryptophyceae). **J. Phycol.** v. 28 (1), p. 61-63, 1992.
- PAULSEN, B. S., VIEIRA, A. A. H. Structure of the capsular and extracellular polysaccharides produced by the desmid *Spondylosium panduriforme* (Chlorophyta). **J. Phycol.**, n. 30, p. 638-641, 1994.
- PAZUR, J. H. Neutral polysaccharides. In: CHAPLIN, M. F., KENNEDY, J. F. (ed.) **Carbohydrates analysis - a practical approach**. Oxford, England. Irl. Press, 1986, p. 55-64.
- PERCIVAL, E., FOYLE, R. A. J. The extracellular polysaccharide of *Porphyridium cruentum* and *Porphyridium aerugineum*. **Carbohydr. Res.**, n. 72, p. 165-176, 1979.

- PHARMACIA. **Gel filtration: theory and practice.** Uppsala. Pharmacia Laboratory Separation Division, 1987a, 64 p.
- PHARMACIA. **Ion exchange chromatography: principles and methods.** Uppsala. Pharmacia Laboratory Separation Division, 1987b, 71 p.
- PHILIPS, E. J., ZEMAN, C., HANSEN, P. Growth, photosynthesis, nitrogen fixation and carbohydrate production by a unicellular cyanobacterium, *Synechoccus* sp (Cyanophyta). **J. Appl. Phycol.**, n. 1, p. 137-145, 1989.
- PORTER, K. G. The plant-animal interface in freshwater ecosystems. **Am. Sci.**, n. 65, p. 159-170, 1977.
- REINHOLD, V. N. Gasliquid chromatographic analysis of constituent carbohydrates in glycoproteins. **Methods Enzimol.** n. 25, p. 244-249, 1972.
- REYNOLDS, C. S. **The Ecology of Freshwater Phytoplankton.** Cambridge University Press, London. 1984, 384 p.
- REYNOLDS, C. S. **The Ecology of Freshwater Phytoplankton.** Cambridge University Press, London. 1986, 384 p.
- ROUND, F. E. **The Biology of Algae.** 2. ed. N. York: St. Martins Press, 1973, 278 p.
- SCHWARZBOLD, A. **Efeitos do regime de inundação do rio Mogi Guaçu (SP) sobre a estrutura, diversidade, produção e estoques do perifiton de *Eichhornia azurea* (Sw) Kunth da Lagoa do Infernãõ.** São Carlos, UFSCar. 1992, 237 p. Tese.



- SILVA, A. C. **Produção primária e excreção de matéria orgânica dissolvida de populações fitoplanctônicas da Lagoa do Infernã - Estação Ecológica de Jataí, SP - variação anual e diurna.** São Carlos, UFSCar. 1990, 102 p., Dissertação.
- SMESTAD, B., HAUG, A., MYKLESTAD, S. Structural studies of the extracellular polysaccharides by the diatom *Chaetoceros curvisetus* (Cleve). **Acta Chem. Scand.**, n. 29, p. 337-340, 1975.
- SNYDER, L. R., KIRKLAND, J. J. **Introduction to modern liquid chromatography.** John Wiley and Sons. New York. 2<sup>nd</sup> ed., 1979, 862 p.
- SOEDER, C. J., BOLZER, A. Sulphate deficiency stimulates release of dissolved organic matter in synchronous culture of *Scenedesmus obliquus*. **Physiol. Plant.**, n. 52, p. 233-238, 1981.
- SONDERGAARD, M., SCHIERUP, H. H. Release of extracellular organic carbon during a diatom bloom in lake Moss. Molecular weight fractionation. **Freshwater Biol.**, n. 12, p. 813-820, 1982.
- SUNDH, I. Characterization of phytoplankton extracellular products (PDOC) and their subsequent uptake by heterotrophic organisms in a mesotrophic forest lake. **J. Plankton Res.**, v. 3, n. 11, p. 463-486, 1989.
- SUNDH, I. Biochemical composition of dissolved organic carbon derived from phytoplankton and used by heterotrophic bacteria. **Appl. Environ. Microb.**, n. 48, p. 1181-1185, 1992.
- TAUTVYDAS, K. J. Isolation and characterization of an extracellular hydroxyproline-rich glycoprotein and a mannose-rich polysaccharide from *Eudorina californica* (Shaw). **Planta (Berl.)**, n. 140, p. 213-220, 1978.

- TRANVIK, L. J. Bacterioplankton growth on fractions of dissolved organic carbon of different molecular weights from humic and clear waters. **Appl. Environ. Microb.**, v. 6, n. 36, p. 1672-1677, 1990.
- VIEIRA, A. A. H. **Estudos experimentais em fitoplâncton marinho - culturas e aspectos ecofisiológicos.** São Paulo. Instituto Oceanográfico. USP, 1975, 115 p. Dissertação.
- VIEIRA, A. A. H. **Excreção de matéria orgânica dissolvida por populações fitoplanctônicas marinhas.** São Paulo. Instituto Oceanográfico. USP, 1980, 121 p. Tese.
- VIEIRA, A. A. H. Excretion of dissolved organic matter (DOM) in the photic column by marine phytoplankton population from Ubatuba region. **Rev. Microb.**, São Paulo, v. 1, n. 13, p. 83-94, 1982.
- VIEIRA, A. A. H., AIDAR-ARAGÃO, E. Alguns aspectos metodológicos da medida da excreção de matéria orgânica pelo fitoplâncton por espectrometria de cintilação líquida. **Bolm. Inst. Oceanogr.**, São Paulo, v. 1, n. 31, p. 39-53, 1982.
- VIEIRA, A. A. H., TEIXEIRA, C. Excreção diurna de matéria orgânica dissolvida em populações naturais do fitoplâncton marinho. **Rev. Microbiol.** São Paulo, v. 3, n. 13, p. 205-210, 1982.
- VIEIRA, A. A. H., MYKLESTAD, S. Production of extracellular carbohydrates of *Ankistrodesmus densus* Kors. (Chlorophyceae). **Journal of Plankton Research.**, 8 (5), p. 985-994, 1986.

- VIEIRA, A. A. H., CÁCERES, O. Excreção de carboidratos solúveis por microalgas de água doce. I. Comparação de nove diferentes espécies em quatro meios de cultura. **Ciência e Cultura**. 39 (11), p. 1070-1074, 1987.
- VIEIRA, A. A. H., NASCIMENTO, O. R. Copper immobilization by high molecular weight compounds excreted by aging culture of *Ankistrodesmus densus* (Chlorococcales). **Rev. Microbiol.**, 20 (1), p. 133-139, 1989.
- VIEIRA, A. A. H., PAULSEN, B. S. Studies on the composition of extracellular polysaccharide produced by *Hyalotheca dissiliens* (Desmidiaceae). **Biologia, Bratislava**, 49/4, p. 535-538, 1994.
- VISSER, S. A., COUTURE, P. Les effets de la matière organique dissoute d'une eau douce sur la croissance de l'algue *Selenastrum capricornutum*. **Water Res.**, v. 15, p. 1355-1361, 1981.
- VOGEL, S. L., FRISCH, H. L., GOTHAM, I. J. Qualitative assay of dissolved aminoacids and sugars by *Chlamydomonas reinhardtii* (Chlorophyceae), and *Euglena gracilis* (Euglenophyceae). **J. Phycol.**, n. 14, p. 403-406, 1978.
- WATANABE, Y. A study of excretion and extracellular products of natural phytoplankton in lake Nakamura Japan. **Int. Revue. Ges. Hydrobiol.** v. 6, n. 65, p. 809-834, 1980.
- WETZEL, R. G. **Limnology**. Saunders Publ. Philadelphia. 2<sup>nd</sup> ed., 1983, 860 p.
- WETZEL, R. G., LIKENS, G. E. **Limnological analyses**. 2<sup>nd</sup> ed. Springer-Verlag, N. York., 1991, 391 p.
- YEH, P. Z., GIBOR, A. Growth patterns and motility of *Spirogyra* spp and *Closterium acerosum*. **J. Phycol.**, n. 6, p. 44-48, 1970.

