



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
MESTRADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
BIOLOGIA ESTRUTURAL E FUNCIONAL

NEDNALDO DANTAS DOS SANTOS

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DAS FRAÇÕES RICAS
EM POLISSACARÍDEOS SULFATADOS EXTRAÍDOS DE MACROFITAS
DULCÍCOLAS.**

NATAL
2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

NEDNALDO DANTAS DOS SANTOS

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DAS FRAÇÕES
RICAS EM POLISSACARÍDEOS SULFATADOS EXTRAÍDOS DE MACROFITAS
DULCÍCOLAS.**

Dissertação de Mestrado apresentada para ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Centro de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Norte para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Hugo Alexandre de Oliveira Rocha.

Departamento de Bioquímica / CB / UFRN.

NATAL

2007

Divisão de Serviços Técnicos

Catálogo da Publicação na Fonte. UFRN/Biblioteca Central Zila Mamede

Santos, Nednaldo Dantas dos

Identificação e caracterização química das frações ricas em polissacarídeos sulfatados de macrófitas dulcícolas / Nednaldo Dantas dos Santos. - Natal, RN, 2007

93 f. : il.

Orientador: Hugo Alexandre de Oliveira Rocha.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas.

1. Polissacarídeos Sulfatados - Dissertação. 2. Macrófitas aquáticas - Dissertação. 3. Vegetais dulcícolas - Dissertação. I. Rocha, Hugo Alexandre de Oliveira. II. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. III. Título.

RN/UF/BCZM

CDU 577.144.4.(043.3)



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
MESTRADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
BIOLOGIA ESTRUTURAL E FUNCIONAL**

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DAS FRAÇÕES RICAS
EM POLISSACARÍDEOS SULFATADOS EXTRAÍDOS DE MACRÓFITAS
DULCÍCOLAS.**

NEDNALDO DANTAS DOS SANTOS

Esta dissertação apresentada pelo aluno Nednaldo Dantas dos Santos ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, do Centro de Biociências, da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, foi julgada adequada e aprovada, pelos Membros da Banca Examinadora, na sua redação final, para a conclusão do Curso e à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Hugo Alexandre Oliveira Rocha
Departamento de Bioquímica - CB (UFRN)
Orientador

Prof^a Dra. Luciana Guimarães Alves Filgueira
Faculdade de Ciências, Cultura e Extensão do Rio Grande do Norte - (FACEX)
Examinadora

Prof. Dr. Iuri Goulart Baseia
Departamento de Botânica, Ecologia e Zoologia - CB (UFRN)
Examinador

Natal/RN, 27 de fevereiro de 2007.

Dedico a minha mãe Sueli e em especial a memória de meu pai Nilo Abílio, que tanto lutaram para que esse momento de êxito pudesse ser conquistado, com todo o meu carinho e reconhecimento.

Dedico esta obra:

A Hugo, uma pessoa com a qual aprendi não só a conviver, entender e respeitar, mas principalmente a admirar, pois além de ser um pesquisador é uma pessoa humana em suas atitudes, sendo dessa forma muito mais que um mestre e sim um amigo.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a Deus, por ter me dando força para continuar seguindo em frente mesmo diante das dificuldades.

A Universidade Federal do Rio Grande do Norte por fornecer as condições necessárias para realização desse trabalho;

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Centro de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Norte pela oportunidade de cursar o mesmo.

Ao professor e meu orientador Dr. Hugo Alexandre, pela confiança, credibilidade e paciência para a conclusão desse trabalho e, principalmente, por sua amizade durante esses anos.

À professora Dra. Edda Lisboa Leite, por ter me recebido em seu laboratório e por ter estado sempre a disposição em tudo que precisei.

À Professora M.Sc. Naysandra Bezerra da Silva e Maria de Lurdes do Departamento de Morfologia da Universidade Federal do Rio Grande do Norte que me apoiaram em diversos momentos de dificuldades na realização desse trabalho.

Aos professores e funcionários do Departamento de Bioquímica, pelo ótimo convívio e pelos conhecimentos passados, principalmente a M.Sc. Creuza Bernardino por seu carinho e apoio em diversos momentos.

A meus pais, Sueli e Nilo, por seu carinho, atenção e estímulo para o estudo.

A todos os meus familiares, que fazem da convivência familiar a melhor coisa da minha vida. Em especial a minha prima Izabel, que me mostrou o quanto é importante persistir para ser conquistar os objetivos em especial o conhecimento acadêmico.

Ao meu amigo José Willame que foi um apoio em momentos difíceis nessa caminhada me estimulando a continuar firme em meus objetivos.

Aos amigos de departamento, muito obrigado, poderia citar um por um, pois todos sempre me proporcionaram bons momentos na minha vivência na bioquímica, a Adeliana pela companhia nos finais de semana e acima de tudo pelo exemplo de dedicação, a Cybelle que de uma forma especial foi uma ponte para que eu chegasse ao Departamento de Bioquímica.

A minhas estimadas amigas Sara e Mariana que me apoiaram na realização dos experimentos e foram um porto seguro nos momentos de solidão no laboratório.

A minha família do BIOPOL, Ivan, Eduardo (Dr. Duda), Ana Karinne, Diego (Popó), Edjane, Leonardo (Bolinha), Leandro (Gordinho), Jailma (Mestre Ioda), Dayanne (Daiana) e Andréa, pela convivência, amizade, apoio e participação direta neste trabalho.

Aos amigos da turma de Mestrado em Bioquímica que me acolheram e caminharam comigo no transcorrer desses anos.

Aos amigos da turma de da Pós-graduação em Ciências Biológicas que, apesar de não ter compartilhado muitos momentos devido a minha área de pesquisa, guardo em meu coração a lembrança de momentos importantes de nossa caminhada no mestrado.

Aos amigos do Colégio Degraus do Saber, em especial a professora Ionara Peixoto, que sempre me apoio sendo uma verdadeira irmã e Eliene que acreditou em minha capacidade.

E a todos que, por um acaso, tenham ficado fora dessa lista, que se sintam agradecidos da mesma forma, pois não estaria aqui sem que vocês me apoiassem.

Deus disse: “Produza a terra plantas, ervas que contenham semente e árvores frutíferas que dêem fruto segundo a sua espécie e o fruto contenha a sua semente.”

Gênesis 1, 11.

RESUMO

Os Polissacarídeos sulfatados (PS) são macromoléculas com um grande potencial biotecnológico devido ao fato de apresentarem diversas atividades biológicas e farmacológicas. Esses polímeros ainda não foram encontrados em macrófitas dulcícolas. Com intuito de verificar a presença desses polímeros nesses vegetais, foi realizada a coleta de nove macrófitas de água doce (*Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms., *Egeria densa* Planch, *Egeria naja* Planchon, *Eleocharis interstincta* (Vahl) Roemer & J.A. Shultes, *Cabomba caroliniana* Gray, *Ceratophyllum aquaticum* Lam., *Hydrocotyle bonariensis* Comm. ex Lam., *Nymphaea ampla* (Salisb.) DC e *Salvinia auriculata* Aublet.). Estas plantas foram separadas em partes distintas (raiz, caule, pecíolo, folha e flor) e de cada uma foram extraídas frações ricas em polissacarídeos. A presença de PS foi investigada por análises químicas, espectroscopia de infravermelho e eletroforese em gel agarose. Três vegetais (*E. interstincta*, *E. crassipes* e *S. auriculata*) apresentaram PS, eles foram encontrados em todas as porções, porém em diferentes proporções. Análises histoquímicas confirmaram a sua presença. Os principais monossacarídeos constituintes das frações de PS foram: galactose, glicose, arabinose, xilose e manose. Este é o primeiro relato de polissacarídeos sulfatados em vegetais superiores de água doce.

Palavras chaves: Polissacarídeos sulfatados. macrófitas aquáticas. vegetais dulcícolas

ABSTRACT

The sulfated polysaccharides (SP) are macromolecules with a large range of biotechnological application due they showed several biological and pharmacological activities. These polymers had not yet been described in fresh water macrophytes. To verify the presence of these polimers in these plants, it was colleted nine macrophytes (*Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms., *Egeria densa* Planch, *Egeria naja* Planchon, *Eleocharis interstincta* (Vahl) Roemer & J.A. Shultes, *Cabomba caroliniana* Gray, *Ceratophyllum aquaticum* Lam., *Hydrocotyle bonariensis* Comm. ex Lam., *Nymphaea ampla* (Salisb.) DC e *Salvinia auriculata* Aublet.). These plants were divided into five distinct parts (root, rhizome, stem, petiole, leaf and flower) and from each one it was extracted polysaccharide-rich fractions. The presence of SP was investigated by chemical analysis, infra-red espectroscopy and agarose gel electrophoresis. Three plants (*E. interstincta*, *E. crassipes* e *S. auriculata*) showed SP. In addition, SP were found in all plant parts, but in different ratio. Histochemical analysis confirmed the presence of SP. The mainly monosaccharide residues of SP fractions were: galactose, glucose, arabinose, xylose and mannose. This is the first report of sulfated polysaccharides in fresh water plants.

Key words: Sulfated polysaccharides. aquatic macrophyta. fresh water plants.

ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Principais características estruturais dos GAGs mais conhecidos	20
Quadro 1. Unidades dissacarídicas encontradas em galactanas de algas vermelhas.....	23
Quadro 2. Algumas atividades farmacológicas atribuídas a fucanas e fucoidans.....	24
Figura 2. Estrutura proposta por Aquino et al., 2005 para a galactana sulfatada purificada de <i>Ruppla marítima</i> L.	25
Fotografia 1. Vista geral do local de coleta das macrófitas - Riacho Água Quente em Pirangi do Norte - RN.	28
Fotografia 2. Riacho Água Quente em Pirangi do Norte, no litoral sul do Rio Grande do Norte.	29
Fotografia 3. Aspecto geral do ramo de <i>Cabomba caroliniana</i> Gray	31
Fotografia 4. Macrófita aquática <i>Ceratophyllum aquaticum</i> Lam.....	32
Fotografia 5. Aspecto geral do hábito de <i>Eichhornia crassipes</i> (Mart.) Solms	33
Fotografia 6. Detalhe do hábito de <i>Egeria densa</i> Planch.	34
Fotografia 7. Aspecto geral do hábito de <i>Egeria naja</i> Planchon.	35
Fotografia 8. Aspecto geral do hábito de <i>Eleocharis interstincta</i> (Vahl) Roemer & J.A. Shultes.	36
Fotografia 9. Macrófita aquática <i>Hydrocotyle bonariensis</i> Comm. ex Lam.	37
Fotografia 10. Macrófita aquática <i>Nymphaea ampla</i> (Salisb.) DC.	38
Fotografia 11. Macrófita aquática <i>Salvinia auriculata</i> Aublet.	39
Figura 3. Esquema de obtenção do cru de polissacarídeos das macrófitas aquáticas.	43
Lâmina 1. Comportamento eletroforético do cru de polissacarídeos das porções vegetativas de <i>Eichhornia crassipes</i> (Mart.) Solms.	55

Lâmina 2. Comportamento eletroforético do cru de polissacarídeos das porções vegetativas da <i>Eleocharis interstincta</i> (Vahl) R. & J.A.S. (A) e <i>Salvinia auriculata</i> Aublet. (B).....	56
Gráfico 1. Rendimento percentual das soluções polissacarídicas das macrófitas aquáticas dulcícolas	57
Figura 4. Espectros de infravermelho da região entre 1000 - 800 cm ⁻¹ da raiz (A), rizoma (B), pecíolo (C) e folha (D) da macrófita aquática <i>Eichhornia crassipes</i> (Mart.) Solms.	59
Figura 5. Espectros de infravermelho da região entre 1000 - 800 cm ⁻¹ da raiz (A) e folha (B) da macrófita aquática <i>Eleocharis interstincta</i> (Vahl) Roemer & J.A.	60
Figura 6. Espectros de infravermelho da região entre 1000 - 800 cm ⁻¹ da raiz (A) e folha (B) da macrófita aquática <i>Salvinia auriculata</i> Aublet.	60
Fotomicrografia 1. Raiz de <i>Eichhornia crassipes</i> (Mart.) Solms. A - HE (200x); B-AT (200x); C-AApH1 (400x); D-AApH2 (400x); E-AAPAS (200x) e F-PAS (200x).....	61
Fotomicrografia 2. Rizoma de <i>Eichhornia crassipes</i> (Mart.) Solms. A-HE (200x); B-AT (40x); C-AApH1 (200x); D-AApH2 (200x) e E-PAS (100x).	62
Fotomicrografia 3. Pecíolo de <i>Eichhornia crassipes</i> (Mart.) Solms. A-HE (200x); B-AT (200x); C-AApH1 (200x); D-AApH2 (200x); E-AAPAS (200x) e F-PAS (200x).	64
Fotomicrografia 4. Folha de <i>Eichhornia crassipes</i> (Mart.) Solms. A-HE (200x); B-AT (200x); C-AApH1 (200x); D-AApH2 (200x); E-AAPAS (200x) e F-PAS (200x).	65
Fotomicrografia 5. Raiz de <i>Eleocharis interstincta</i> (Vahl) Roemer & J.A. Shultes. A-HE (100x); B-AT (200x); C-AApH1 (100x); D-AApH2 (200x); E-AAPAS (100x) e F-PAS (200x).	66
Fotomicrografia 6. Folha de <i>Eleocharis interstincta</i> (Vahl) Roemer & J.A. Shultes. A-HE (200x); B-AT (200x); C-AApH1 (200x); D-AApH2 (200x); E-AAPA	67
Fotomicrografia 7. Raiz de <i>Salvinia auriculata</i> Aublet. A-HE (200x); B-AT (200x); C-AApH1 (200x); D-AApH2 (200x); E-AAPAS (100x) e F-PAS (400x).	69

Fotomicrografia 8. Folha de <i>Salvinia auriculata</i> Aublet. A -HE (200x); C -AApH1 (200x); D -AApH2 (200x); E -AAPAS (100x) e F -PAS (400x).	70
Figura 7. Relação filogenética das macrófitas aquáticas e presença de polissacarídeos sulfatados.....	81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Relação massa/massa de açúcares totais, sulfato e proteínas presentes nas partes isoladas e analisadas das macrófitas aquáticas.....	54
Tabela 2. Análises químicas e relações molares dos açúcares presentes nas porções vegetativas das macrófitas aquáticas.....	58
Tabela 3. Fatores climatológicos, parâmetros ambientais, peso úmido e peso seco das macrófitas aquáticas <i>Eichhornia crassipes</i> (Mart.) Solms., <i>Eleocharis interstincta</i> (Vahl) Roemer & J.A. Shultes e <i>Salvinia auriculata</i> Aublet.....	71
Tabela 4. Composição química das macrófitas aquáticas <i>Eichhornia crassipes</i> (Mart.) Solms., <i>Eleocharis interstincta</i> (Vahl) Roemer & J.A. Shultes e <i>Salvinia auriculata</i> Aublet.....	74

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO	
1.1 POLISSACARÍDEOS SULFATADOS	18
1.2 POLISSACARÍDEOS SULFATADOS EM ANIMAIS	19
1.3 POLISSACARÍDEOS SULFATADOS EM MACROALGAS MARINHAS	22
1.4 POLISSACARÍDEOS SULFATADOS DE VEGETAIS SUPERIORES	25
1.5 MACRÓFITAS AQUÁTICAS	26
2 OBJETIVOS	
2.1 OBJETIVO GERAL	27
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
3 MATERIAL E MÉTODOS	
3.1 ÁREA DE ESTUDO	28
3.2 SELEÇÃO E COLETA DO MATERIAL	29
3.3 DESCRIÇÃO E TAXONOMIA DAS ESPÉCIES EM ESTUDO	30
3.4 OUTROS MATERIAS	
3.4.1 Reagentes	40
3.4.2 Aparelhos	41
3.5 MÉTODOLOGIA	
3.5.1 Extração polissacarídeos sulfatados das macrófitas	
3.5.1.1 Obtenção do pó cetônico	41
3.5.1.2 Proteólise	42
3.5.2 Caracterização dos polissacarídeos	
3.5.2.1 Caracterização química	43
3.5.2.1.1 <u>Dosagem de açúcares totais</u>	43
3.5.2.1.2 <u>Dosagem de sulfato</u>	44
3.5.2.1.3 <u>Dosagem de proteínas</u>	44
3.5.2.1.4 <u>Determinação quantitativa dos monossacarídeos</u>	44
3.5.2.2 Caracterização físico-química	
3.5.2.2.1 <u>Eletroforese em gel de agarose</u>	44

3.5.2.2.2 <u>Cromatografia em papel (sistema descendente)</u>	46
3.5.2.2.3 <u>Espectroscopia de infravermelho</u>	46
3.5.2.3 Caracterização histoquímica	46
3.5.2.3.1 <u>Técnicas para emblocamento</u>	47
3.5.2.4 Determinação da composição centesimal das macrófitas aquáticas	49
3.5.2.4.1 <u>Umidade</u>	49
3.5.2.4.2 <u>Proteína bruta</u>	49
3.5.2.4.3 <u>Lipídios</u>	50
3.5.2.4.4 <u>Cinzas ou resíduo mineral fixo</u>	51
3.5.2.4.5 <u>Estimativa de carboidratos</u>	51
3.5.2.4.6 <u>Estimativa de fibras</u>	51
3.5.3 Fatores climatológicos	52
3.5.4 Parâmetros ambientais	52
4 RESULTADOS	53
5 DISCUSSÃO	75
6 CONCLUSÕES	82
7 REFERÊNCIAS	83

1 INTRODUÇÃO

1.1 POLISSACARÍDEOS SULFATADOS

Os polissacarídeos constituem um dos quatro grupos de macromoléculas que compõem os seres vivos, nos quais, atualmente, lhes são atribuídas, principalmente, funções estruturais e energéticas. Quantitativamente, seus principais representantes, são a celulose e a quitina, duas das mais abundantes moléculas orgânicas do planeta (LEHNINGER; NELSON; COX, 1995). Nas últimas décadas, um grupo específico de polissacarídeos vem chamando a atenção de vários pesquisadores por apresentarem uma gama de atividades farmacológicas: o grupo dos polissacarídeos sulfatados (BOISSON-VIDAL ET AL., 1995; MOURÃO ET AL., 1996).

Os polissacarídeos sulfatados como os demais polissacarídeos apresentam polidispersão estrutural, porém, devido à ligação dos grupamentos de sulfatos, essa polidispersão se demonstra mais acentuada quando comparada a dos polissacarídeos neutros, carboxilados ou dos fosforilados, já que os grupos sulfatos podem variar em quantidade como também, na posição de substituição (DIETRICH, 1984; BOISSON-VIDAL ET AL., 1995; SUGAHARA; KITAGAWA, 2000; HARON-BOUHEDJA ET AL., 2000).

Esses polímeros parecem ser encontrados em todos os filos de animais, apesar de existirem alguns filos ainda não estudados. Acredita-se que eles estão presentes em todos os animais devido as importantes funções desempenhadas por esses compostos nos organismos multicelulares (MEDEIROS ET AL., 2000). Outro grande grupo de seres vivos que apresenta polissacarídeos sulfatados em sua composição é o das macroalgas marinhas (KLOAREG; QUATRANO, 1988). Não há relatos desses polissacarídeos em organismos unicelulares, porém alguns polissacarídeos extraídos desses seres podem ser sulfatados artificialmente,

como o Spirulan que é extraído da microalga *Spirulina platensis*. Há poucos trabalhos demonstrando a presença dos polissacarídeos sulfatados em fungos (DORE, 2006) e há apenas um relato de sua presença em vegetais (AQUINO ET AL., 2005).

1.2 POLISSACARÍDEOS SULFATADOS EM ANIMAIS

Os principais polissacarídeos sulfatados encontrados em animais são os glicosaminoglicanos (GAGs). Eles foram, inicialmente, denominados de mucopolissacarídeos por Meyer (1938) e, atualmente, são definidos como um grupo estruturalmente complexo de heteropolissacarídeos lineares formados por unidades dissacarídicas constituídas por uma hexosamina (D-glucosamina ou D-galactosamina) unida por uma ligação glicosídica a um açúcar não nitrogenado (ácido D-glucurônico, ácido L-idurônico ou galactose). A maioria destes polissacarídeos apresenta-se sulfatado, que juntamente com as carboxilas dos ácidos urônicos conferem uma alta densidade aniônica a esses compostos (DIETRICH, 1984).

A identidade de um GAG é fornecida pelo tipo de hexosamina e açúcar não nitrogenado que o compõem, o grau e a posição em que se encontram os grupos sulfatos, bem como, as ligações glicosídicas inter e intradissacarídica. As variedades de combinações observadas resultaram na caracterização dos seguintes GAGs: heparina, heparam sulfato, condroitim 4-sulfato, condroitim 6-sulfato, dermatam sulfato, queratam sulfato e ácido hialurônico (Figura 1) (DIETRICH, 1984; SUGAHARA; KITAGAWA, 2000).

Apesar de várias revisões e livros textos citarem as unidades dissacarídicas fundamentais repetitivas dos diversos GAGs, unidades dissacarídicas “peculiares” podem ser observadas, e em alguns casos, elas aparecem em grande quantidade que podem dificultar a classificação do polímero em questão em um dos atuais grupos de GAGs. Um exemplo é o condroitim fucosilado encontrado em pepinos do mar, ele apresenta radicais formados de L-

fucose sulfatada ligados ao ácido glucurônico (MOURÃO ET AL., 1996; KARIYA ET AL., 1997). Outro exemplo é o acaram sulfato, um novo GAG só encontrado no molusco *Achatina fulica* (KIM ET AL., 1996).

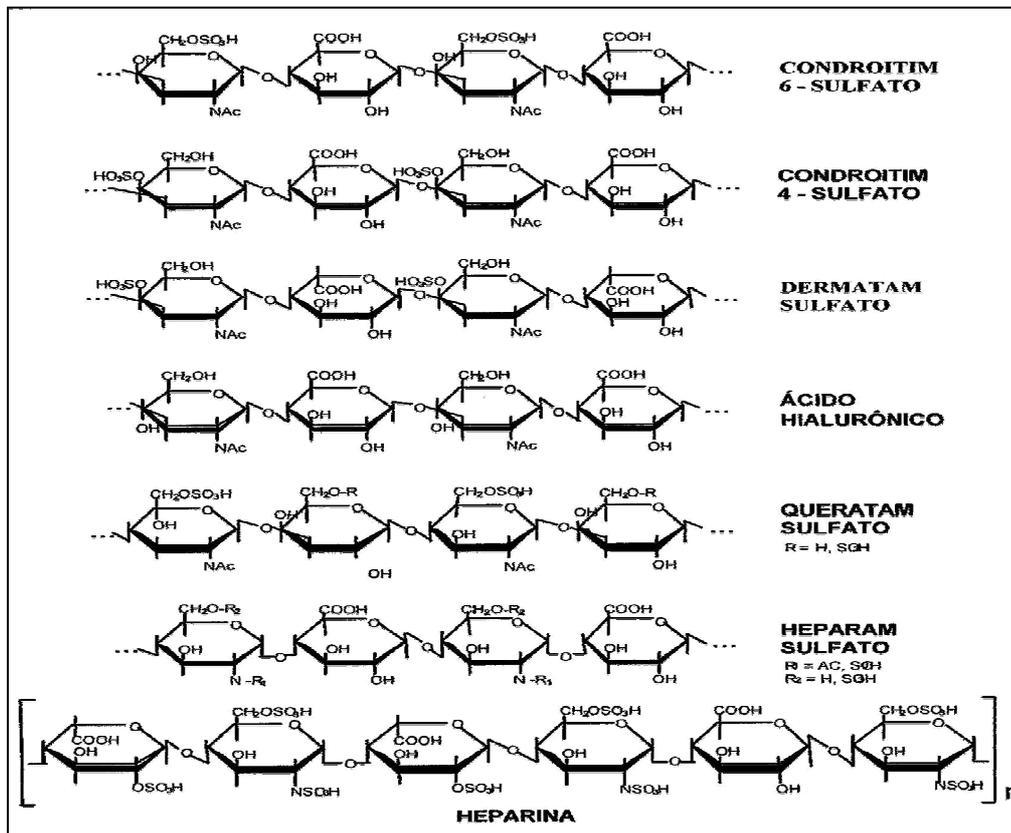


Figura 1-Principais características estruturais dos GAGs mais conhecidos.

Os glicosaminoglicanos, com exceção do ácido hialurônico, são encontrados nos animais ligados covalentemente a proteínas formando os proteoglicanos (DIETRICH, 1984; IOZZO, 1998; LANDER ; SELLECK, 2000). Estes glicoconjugados são encontrados intracelularmente em grânulos secretórios, na superfície celular, matriz extracelular e membrana basal (DIETRICH, 1984; NADER ET AL., 1991; BERNFIELD ET AL., 1999).

Atualmente, são conhecidos mais de trinta tipos diferentes de proteoglicanos, os quais exercem uma grande variedade de funções biológicas, tais como: organização de tecido; crescimento celular; maturação de tecidos especializados (KOLSET ; SALMIVIRTA, 1999); têm um importante papel na formação e permeabilidade de membrana (JACKSON ET AL.,

1991); modulação da atividade de determinados fatores de crescimento (GALLAGHER, 2001); regulação da hidrólise de colágeno; crescimento e invasão tumoral (SANDERSON, 2001); adesão, proliferação, diferenciação e migração celular; alterações morfológicas durante o desenvolvimento, remodelagem e mudanças ocorridas durante o ciclo celular (DIETRICH, 1984; PORCIONATO; NADER; DIETRICH, 1999); transparência da córnea; crescimento de neuritos; bem como em patologias cardiovasculares, diabetes, doenças amilóides, mucopolissacaridoses e interações com patógenos (TOMA; DIETRICH; NADER, 1996); entre outras funções (BERNFIELD ET AL., 1999). O estudo de suas funções biológicas utilizando animais transgênicos tem indicado que certos proteoglicanos são essenciais para a vida (IOZZO, 1998; BERNFIELD ET AL., 1999).

Além dos GAGs, outros tipos de polissacarídeos sulfatados também já foram descritos em animais. Como por exemplo, em ouriços do mar foram achadas fucanas e galactanas sulfatadas fazendo parte da constituição do gel que cobre os seus óvulos, sendo esses polissacarídeos relacionados com a ativação da reação acrossômica durante o processo de fecundação (ALVEZ ET AL., 1997). As análises têm indicado que são espécies-específicos, impedindo assim, um intercruzamento das várias espécies de ouriços (VILELA-SILVA ET AL., 2002). Há também, poucos relatos sobre fucanas em pepinos do mar, contudo elas são descritas como participantes da constituição do tecido muscular do animal (RIBEIRO ET AL., 1994).

Dentre esses compostos, a heparina é a única que é utilizada comercialmente como fármaco. A heparina foi o primeiro fármaco utilizado como anticoagulante, e depois de 60 anos ainda continua sendo o anticoagulante mais utilizado devido ao fato de possuir vários sítios de ação e conseqüentemente um maior espectro de utilização. Ela é principalmente usada na prevenção de trombose venosa profunda em pós-cirurgias e pós-parto, em pacientes

com estado de hipercoagulopatia, ou sujeito à trombose causada por diferentes etiologias (WEIZT, 1994; FABRIS ET AL., 2000; NADER ET AL., 2001).

1.3 POLISSACARÍDEOS SULFATADOS EM MACROALGAS MARINHAS

Nas algas, os polissacarídeos sulfatados estão localizados na matriz mucilaginosa e devido ao seu caráter altamente higroscópico, acredita-se que protejam as algas da desidratação quando essa é submetida a longos períodos de exposição ao sol durante as marés baixas. A natureza mucilaginosa destes compostos, também parece contribuir para tornar a alga flexível o bastante para crescer em ambiente líquido, e rígida o suficiente para permanecer estendida, e assim, melhor captar a luz e os nutrientes existentes (PERCIVAL; MAC DOWELL, 1967). No entanto, há poucos estudos dedicados ao esclarecimento das funções fisiológicas dos polissacarídeos sulfatados nas algas e por isso não se pode descartar a possibilidade de que esses compostos venham desempenhar outras funções além das estruturais já conhecidas.

Nas algas vermelhas (Rhodophyta), encontram-se homopolissacarídeos de galactose sulfatada, essas galactanas sulfatadas também são conhecidas como carragenanas e agaranas. Elas são compostas por unidades alternadas de β (1 \rightarrow 3) -D-galactose e α (1 \rightarrow 4)-D-galactose, a sulfatação pode ocorrer em diferentes pontos (LAHAYE, 2001). Contudo, variações estruturais podem ocorrer devido à origem da galactana. Uma grande maioria desses polímeros pode apresentar o resíduo de 3,6-anidro- α -L-galactose. A diferença da quantidade e da posição da sulfatação, além da presença ou não da 3,6-anidro- α -L-galactose permite a construção de 42 unidades dissacarídicas hipotéticas, dessas 15 estruturas já foram identificadas em algas vermelhas e assinaladas em letras gregas (Quadro 1) (STORTZ; CEREZO, 1991)

Das algas pardas (Phaeophyta) extraem-se polissacarídeos que apresentam α -L-fucose sulfatada na sua composição. Aqueles que possuem mais de 90% desse monossacarídeo na sua estrutura são chamados de fucanas e os demais são denominados de fucoidans (BERTEAU; MULLOY, 2003). Contudo, vários autores empregam esses termos como sinônimos.

Família	Símbolo grego	1,3-ligadas	1,4-ligadas
kappa	Kappa (κ)	β -D-galactose 4-sulfato	3,6-anidro- α -D-galactose
	Iota (ι)	β -D-galactose 4-sulfato	3,6-anidro- α -D-galactose 2-sulfato
	Mu (μ)	β -D-galactose 4-sulfato	α -D-galactose 6-sulfato
	Nu (ν)	β -D-galactose 4-sulfato	α -D-galactose 2,6-di-sulfato
	Omicron (\omicron)	β -D-galactose 4-sulfato	α -D-galactose 2-sulfato
Beta	Beta (β)	β -D-galactose	3,6-anidro- α -D-galactose
	Gamma (γ)	β -D-galactose	α -D-galactose 6-sulfato
	Omega (ω)	β -D-galactose 6-sulfato	3,6-anidro- α -D-galactose
	Psi (ψ)	β -D-galactose 6-sulfato	α -D-galactose 6-sulfato
Lambda	Delta (δ)	β -D-galactose	α -D-galactose 2,6-di-sulfato
	Alfa (α)	β -D-galactose	3,6-anidro- α -D-galactose 2-sulfato
	Lambda (λ)	β -D-galactose 2-sulfato	α -D-galactose 2,6-di-sulfato
	Theta (θ)	β -D-galactose 2-sulfato	3,6-anidro- α -D-galactose 2-sulfato
	Xi (ξ)	β -D-galactose 2-sulfato	α -D-galactose 2-sulfato
	Pi (π)	β -D-galactose P,2-sulfato	α -D-galactose 2-sulfato

Quadro 1-Unidades dissacarídicas encontradas em galactanas de algas vermelhas
Fonte : Adaptado de Lahaye 2001, P: Piruvato

A estrutura desses polímeros varia de acordo com a espécie de alga parda e às vezes nas diferentes partes da alga (DIETRICH ET AL., 1995). Dessa forma, cada nova fucana extraída e purificada é um composto estruturalmente único e conseqüentemente, apresenta, também, um potencial farmacológico e biotecnológico único. As fucanas e fucoidans apresentam uma variedade muito grande de atividades farmacológicas e biotecnológicas atribuídas a eles como visto no quadro 2.

Atividade	Alga
Angiogênico	<i>Fucus vesiculosus</i>
Anti complemento	<i>Laminaria cichorioides</i> , <i>L. japonica</i> , <i>Fucus evanescens</i> , <i>Ascophyllum nodosum</i>
Anti migratória	<i>F. vesiculosus</i> , <i>A. nodosum</i>
Antiadesiva	<i>A. nodosum</i> , <i>Laminaria brasiliensis</i> , <i>Spatoglossum schröderi</i> , <i>Sargassum stenophyllum</i>
Anticoagulante	<i>A. nodosum</i> , <i>Ecklonia kurome</i> , <i>Eisenia bicyclis</i>
Antioxidante	<i>F. vesiculosus</i>
Antiproliferativa	<i>A. nodosum</i> , <i>Turbinaria ornata</i>
Antitrombótico	<i>A. nodosum</i>
Antitumoral	<i>A. nodosum</i> , <i>Sargassum thumbergii</i> , <i>E. bicyclis</i>
Anti-úlceras	<i>C. okamuranus</i>
Antiviral	<i>Sargassum horneri</i> , <i>F. vesiculosus</i>
Antimetastático	<i>F. vesiculosus</i>
Bloqueio de ligação célula-célula via selectina	<i>F. vesiculosus</i>
Bloqueio de ligação de <i>Helicobacter pylori</i> a células da parede gástrica	<i>Cladosiphon okamuranus</i> , <i>F. vesiculosus</i>
Bloqueio de ligação espermatozóide-epitélio do oviducto	<i>F. vesiculosus</i>
Estímulo da liberação de TNF- α de monócitos	<i>F. vesiculosus</i>
Estímulo de síntese de heparan antitrombótico por células endoteliais	<i>S. schröderi</i>
Fibrinolítica	<i>E. kurome</i> , <i>F. vesiculosus</i>
Impedir a rolagem de leucócitos	<i>F. vesiculosus</i>
Veículo para dispensação de fármacos	<i>S. schröderi</i>
Modificação da síntese de FN e trombospodina	<i>F. vesiculosus</i>

Quadro 2 - Algumas atividades farmacológicas atribuídas a fucanas e fucoidans.

Fonte: Adaptado de Rocha et al., 2006.

As algas verdes (Chlorophyta) possuem polissacarídeos sulfatados mais heterogêneos, difíceis de serem reunidos em grupos. Na sua maioria são ricos em galactose, manose, xilose, arabinose, glicose e ou rafnose. Homo e heteropolissacarídeos podem ser encontrados, inclusive numa mesma alga, como é o caso da alga *Codium dwarkense* (SIDDHANTA ET AL, 1999). Parece haver uma predominância de um monossacarídeo em detrimento dos demais em várias ordens, como exemplo, as Codiales apresentam polissacarídeos sulfatados ricos em arabinose ou galactose, enquanto as Caulerpales e Ulvales apresentam

Santos, N.D. *Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas*

polissacarídeos compostos principalmente de galactose e rhamnose, respectivamente (MATZUBARA, 2004). Porém, há ainda poucas evidências para se estabelecer correspondências sistemáticas entre estrutura, incluindo composição monossacarídica, e ordem das algas verdes.

1.4 POLISSACARÍDEOS SULFATADOS DE VEGETAIS SUPERIORES

Com relação aos vegetais superiores até pouco tempo não se tinha registro de polissacarídeos sulfatados em macrófitas, quando em janeiro de 2005, foi publicado o primeiro trabalho demonstrando a presença de polissacarídeos em três espécies de angiospermas marinhas conhecidas popularmente como capim do mar: *Ruppia maritima* Linnaeus (*Ruppiaceae*), *Halodule wrightii* Ascherson (*Cymodoceaceae*) e *Halophila decipiens* Ostenfeld (*Hydrocharitaceae*). Os autores concentraram seus estudos num polissacarídeo sulfatado de *Ruppla marítima*. Esse se mostrou como uma D-galactana sulfatada composta por uma estrutura regular tetrassacarídica: [3-β-D-Gal-2(OSO₃)-1→4-α-D-Gal-1→4-α-D-Gal-1→3-β-D-Gal-4(OSO₃)-1→] (Figura 1). A galactana sulfatada dessa angiosperma marinha está localizada na parede celular, principalmente nos rizomas e raízes, indicando a relação entre a absorção de nutrientes e sua possível função fisiológica (AQUINO ET AL, 2005).

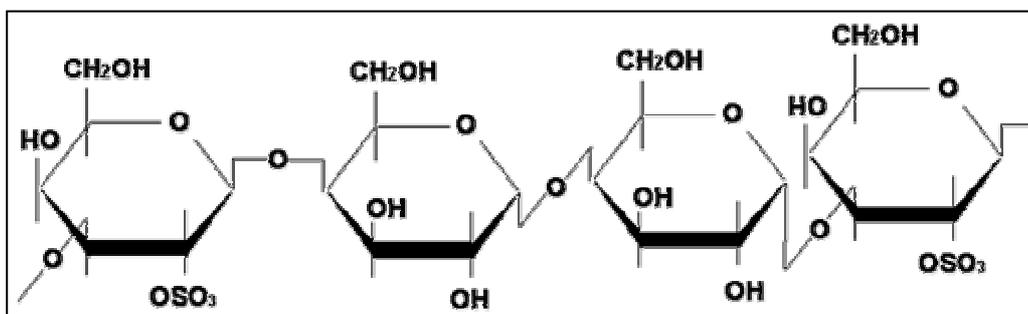


Figura 2-Estrutura proposta por Aquino para a galactana sulfatada purificada de *Ruppia marítima*
Fonte: Aquino et al., 2005

1.5 MACRÓFITAS AQUÁTICAS

As macrófitas aquáticas são organismos que possuem uma organização celular mais complexa, ou seja, suas células possuem um envoltório nuclear, a carioteca, e apresentam mais do que um cromossomo, sendo sua fotossíntese baseada na clorofila (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2001).

Segundo Weaner e Clements (1983), as macrófitas aquáticas são constituídas por um conjunto de espécies herbáceas que habitam em ambiente aquático, solos cobertos por água ou saturados por esta. As macrófitas aquáticas são vegetais possíveis de serem vistos a olho nu, em que suas estruturas vegetativas responsáveis pela realização do processo de fotossíntese se encontram no decorrer de períodos longos parcialmente ou totalmente submersas em água doce, salobra, ou ainda flutuantes na mesma (IRGANG; GASTAL, 1996).

As macrófitas aquáticas se encontram presentes em todos os ecossistemas aquáticos, variando somente a composição entre si. Comumente, os vegetais aquáticos apresentam uma distribuição mais ampla do que a maioria dos vegetais terrestres; isto decorre da pequena variação sofrida pelos fatores no ambiente aquático, o que confere as macrófitas aquáticas uma ampla distribuição fitogeográfica, possibilitando o aparecimento de muitas espécies cosmopolitas (IRGANG; GASTAL, 1996).

Os vegetais aquáticos desempenham um papel, fundamental em ecossistemas aquáticos aumentando a área disponível para colonização de invertebrados (PINDER, 1986). Esses vegetais em ambientes dulcícolas apresentam em relação aos invertebrados um papel importante na adição de substrato para os mesmos (BECKETT ET AL., 1992), uma vez que as porções vegetativas constituintes dos vegetais aquáticos que ficam submersas compõem um habitat complexo colonizado por algas e invertebrados. A esse habitat se associam diversas espécies de peixes e devido à complexidade de suas estruturas submersas reduzem a pressão

da predação sobre os peixes de pequeno porte desse ecossistema (HENDERSON; HAMILTON, 1995; DIEHL; EKLOV, 1995; ARAÚJO-LIMA; GOULDING, 1997; SÁNCHEZ-BOTERO; ARAÚJO-LIMA, 2001).

Portanto, com o intuito de obter novos registros de polissacarídeos sulfatados no Reino Plantae, foram selecionados algumas espécies de plantas dulcícolas.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Identificar e caracterizar quimicamente frações ricas em polissacarídeos sulfatados extraídos de macrófitas aquáticas dulcícolas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Extrair polissacarídeos sulfatados das partes constituintes de cada macrófita dulcícolas estudada;
- Determinar a composição monossacarídica e o teor de sulfato dos polissacarídeos sulfatados extraídos;
- Localizar histologicamente esses polissacarídeos nas diferentes partes dos vegetais.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ÁREA DE ESTUDO

Essas espécies utilizadas neste estudo foram coletadas no riacho Água quente (Fotografia 1 e 2), localizado no município de Parnamirim, distrito de Pirangi do Norte, litoral sul do Rio Grande do Norte, cuja localização geográfica se dá pelas seguintes coordenadas 05°59'17"S de latitude e 35°07'49"W de longitude, sendo a mesma possuidora de uma altitude de 12 m a uma profundidade entre 10 e 30 cm.

Essas plantas estavam sobre as mesmas condições de luminosidade e as águas do riacho se caracterizam pela ausência de salinidade e pH 7,0.



Fotografia 1-Vista geral do local de coleta das macrófitas - Riacho Água Quente em Pirangi do Norte - RN.



Fotografia 2 - Riacho Água Quente em Pirangi do Norte, no litoral sul do Rio Grande do Norte.

3.2 SELEÇÃO E COLETA DO MATERIAL

As plantas utilizadas neste estudo foram: *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms., *Egeria densa* Planchon, *Egeria naja* Planchon, *Eleocharis interstincta* (Vahl) Roemer & J.A. Shultes, *Cabomba caroliniana* Gray, *Ceratophyllum aquaticum* Lam., *Hydrocotyle bonariensis* Comm. ex Lam., *Nymphaea ampla* (Salisb.) D.C. e *Salvinia auriculata* Aublet., as quais são denominadas de macrófitas aquáticas.

As coletas foram realizadas no mês de março de 2004. Após essa etapa, as amostras acondicionadas em sacos de polietileno foram trazidas ao Laboratório de Biotecnologia de Polímeros Naturais (BIOPOL) da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, no mesmo dia da coleta. Sendo lavadas em água corrente, examinadas cuidadosamente para se retirar epífitas, inclusões calcárias e sais, e demais resíduos contaminantes. Posteriormente, as

porções vegetativas (raiz, caule, pecíolo, folha e flor) foram separadas e colocadas para secagem em estufa aerada a 60°C por 24h. Em seguida, foram trituradas, pesadas e guardadas em frascos hermeticamente fechados.

Alguns exemplares de cada espécie foram reservados para a obtenção de excicatas e classificação por especialista. Essa etapa foi realizada no Herbário da Universidade Federal do Rio Grande do Norte no Departamento de Botânica, Ecologia e Zoologia com auxílio de bibliografia especializada.

3.3 DESCRIÇÃO E TAXONOMIA DAS ESPÉCIES EM ESTUDO

Para a realização desse estudo, coletou-se representantes de macrófitas pertencentes a diferentes famílias. A seguir, são apresentadas as espécies e as porções vegetativas analisadas, as categorias taxonômicas a que pertencem e o aspecto geral do hábito (Fotografia 03 a 11). A classificação seguiu o sistema de Cronquist (1988).

➤ *Cabomba caroliniana* Gray

Divisão: Magnoliophyta

Classe: Magnoliopsida

Ordem: Nymphaeales

Família: Nymphaeaceae

Porções analisadas: caule e folha.



Fotografia 3 - Aspecto geral do ramo de *Cabomba caroliniana* Gray

➤ *Ceratophyllum aquaticum* Lam.

Divisão: Magnoliophyta

Classe: Magnoliopsida

Ordem: Ceratophyllales

Família: Ceratophyllaceae

Porções analisadas: raiz, caule e folha.



Fotografia 4 - Macrófita aquática *Ceratophyllum aquaticum* Lam.

➤ *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms.

Divisão: Magnoliophyta

Classe: Liliopsida

Ordem: Commelinales

Família: Pontederiaceae

Porções analisadas: raiz, rizoma, pecíolo e folha.



Fotografia 5 - Aspecto geral do hábito de *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms.

➤ *Egeria densa* Planchon

Divisão: Magnoliophyta

Classe: Liliopsida

Ordem: Alismatales

Família: Hydrocharitaceae

Porções analisadas: raiz, pecíolo e folha.



Fotografia 6 - Detalhe do hábito de *Egeria densa* Planchon.

➤ *Egeria naja* Planchon

Divisão: Magnoliophyta

Classe: Liliopsida

Ordem: Alismatales

Família: Hydrocharitaceae

Porções analisadas: raiz, pecíolo e folha.



Fotografia 7 - Aspecto geral do hábito de *Egeria naja* Planchon.

➤ *Eleocharis interstincta* (Vahl) Roemer & J.A. Shultes

Divisão: Magnoliophyta

Classe: Liliopsida

Ordem: Poales

Família: Cyperaceae

Porções analisadas: raiz e folha.



Fotografia 8 - Aspecto geral do hábito de *Eleocharis interstincta* (Vahl) Roemer & J.A. Shultes.

➤ *Hydrocotyle bonariensis* Comm. ex Lam.

Divisão: Magnoliophyta

Classe: Magnoliopsida

Ordem: Apiales

Família: Apiaceae

Porções analisadas: raiz pecíolo e folha.



Fotografia 9 - Macrófita aquática *Hydrocotyle bonariensis* Comm. ex Lam.

➤ *Nymphaea ampla* (Salisb.) D.C.

Divisão: Magnoliophyta

Classe: Magnoliopsida

Ordem: Nymphaeales

Família: Nymphaeaceae

Porções analisadas: raiz, rizoma, pecíolo, folha e flor.



Fotografia 10 - Macrófita aquática *Nymphaea ampla* (Salisb.)

➤ *Salvinia auriculata* Aublet.

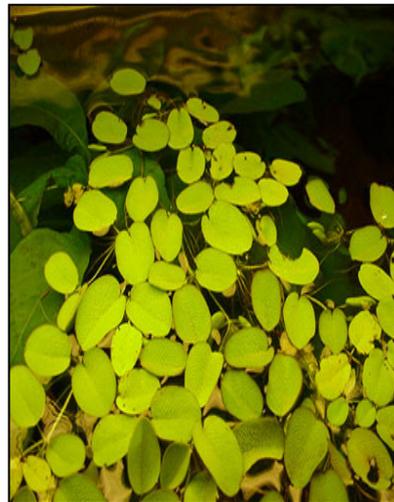
Divisão: Pteridophyta

Classe: Filicopsida

Ordem: Hydropteridales

Família: *Salviniaceae*

Porções analisadas: raiz e folha.



Fotografia 11 - Macrófita aquática *Salvinia auriculata*

3.4 OUTROS MATERIAS

Estão listados abaixo, a relação dos materiais e aparelhos usados para a realização das análises, com os respectivos locais de procedências.

3.4.1 Reagentes

- Acetona, metanol, etanol, da Qeel (São Paulo - SP).
- Ácido acético, Cloreto de sódio, da VETEC (Rio de Janeiro - RJ).
- Álcool 96°, da Sertanejo (Dix Sept Rosado - RN).
- Agarose, adquirida da Bio Agency (São Paulo - SP).
- Butanol, tiosulfato de sódio, da Reagen Quimibrás Indústrias Químicas S.A. (Rio de Janeiro, RJ, Brasil).
- Ácido sulfúrico, ácido clorídrico, da Merck (Darmstadt, Alemanha).
- Azul de toluidina, vermelho de cresol, coomasie blue R 250, oriundos da Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, EUA).
- Maxatase (protease alcalina P 126), da BIOCON do Brasil industrial Ltda. (Rio de Janeiro, RJ, Brasil).
- Resina de troca iônica Lewatite da Bayer, gentilmente cedida por Açúcar Guarani S/A (Olimpia, São Paulo, lote AD001, safra 95/96).
- 1,3 diamino propano acetato, da Aldrich Chemical Co. Inc. (Milwake, WI, EUA).
- Heparan sulfato, condroitin sulfato e dermatan sulfato e D-galactose, L-fucose, D-xilose, D-galactose, D-manose, D-glucose, D-arabinose, D-ramnose, ácido D-glucurônico, ácido D-galacturônico, foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA).

3.4.2 Aparelhos

- Agitador orbital modelo 255-B da FANEM Ltda. (São Paulo, SP, Brasil).
- Banhos e estufas de temperatura constante da FANEM Ltda. (São Paulo, SP, Brasil).
- Bombas peristálticas Microperpex S modelo 2232 da LKB (Bromma, Suécia) e Econo.
- Câmara para eletroforese em gel de agarose, modelo desenvolvido por Jaques e col. (1968) (Técnica Permatron Ltda., São Paulo, SP, Brasil).
- Centrífuga refrigerada CR 21 da Hitachi Koki Co. Ltd. (Tóquio, Japão).
- Espectrofotômetros Femto 700 plus da Femto Ind. Com. Instrumentos LTDA (São Paulo).
- Fontes de corrente contínua regulável desenvolvidas pelo Dr. H. Rzeppa, Técnica Permatron Ltda. (São Paulo, SP, Brasil).
- Medidor de pH Orion Research, modelo 701 A/digital Ionalyzer (Cambridge, MA, EUA).
- Micrótomo, modelo 820, da América Optical Company (New York, EUA).
- Refratômetro Portátil, modelo RST 101 ATC da Sarumar Nordeste.

3.5 METODOLOGIA

3.5.1 Extração polissacarídeos sulfatados das macrófitas

3.5.1.1 Obtenção do pó cetônico

As macrófitas aquáticas foram secas, pulverizadas e tratadas quatro vezes, com dois volumes de etanol PA, sob agitação durante 12 horas, para despigmentação e delipidação do material.

O metanol foi decantado, e o resíduo colocado para secar a 45°C sob aeração, aferindo-se novamente o peso seco do material que se convencionou chamar de pó cetônico. Esse foi utilizado em seguida no processo de proteólise.

3.5.1.2 Proteólise

Para realização dessa etapa ao pó cetônico foram adicionados dois volumes de NaCl 0,25 M, sendo o pH dessa solução ajustado para 8,0 com NaOH.

A este material foi adicionada a enzima proteolítica Maxatase (15 mg por grama de pó cetônico), e o recipiente com esse material foi incubando a 60°C durante um intervalo de tempo de doze horas. A suspensão obtida foi filtrada e o sobrenadante submetido a uma centrifugação (10.000 g, durante 20 minutos à 4°C). Após a centrifugação, o sobrenadante, teve ao seu volume adicionado dois volumes de metanol. Esta mistura foi deixada à temperatura de 4°C durante 24 horas. Após esse período, o material foi centrifugado (10.000 g, durante 15 minutos a 4°C). O sobrenadante foi descartado e o precipitado seco à pressão reduzida, triturado, pesado e devidamente guardado para posteriores análises (Figura 2).

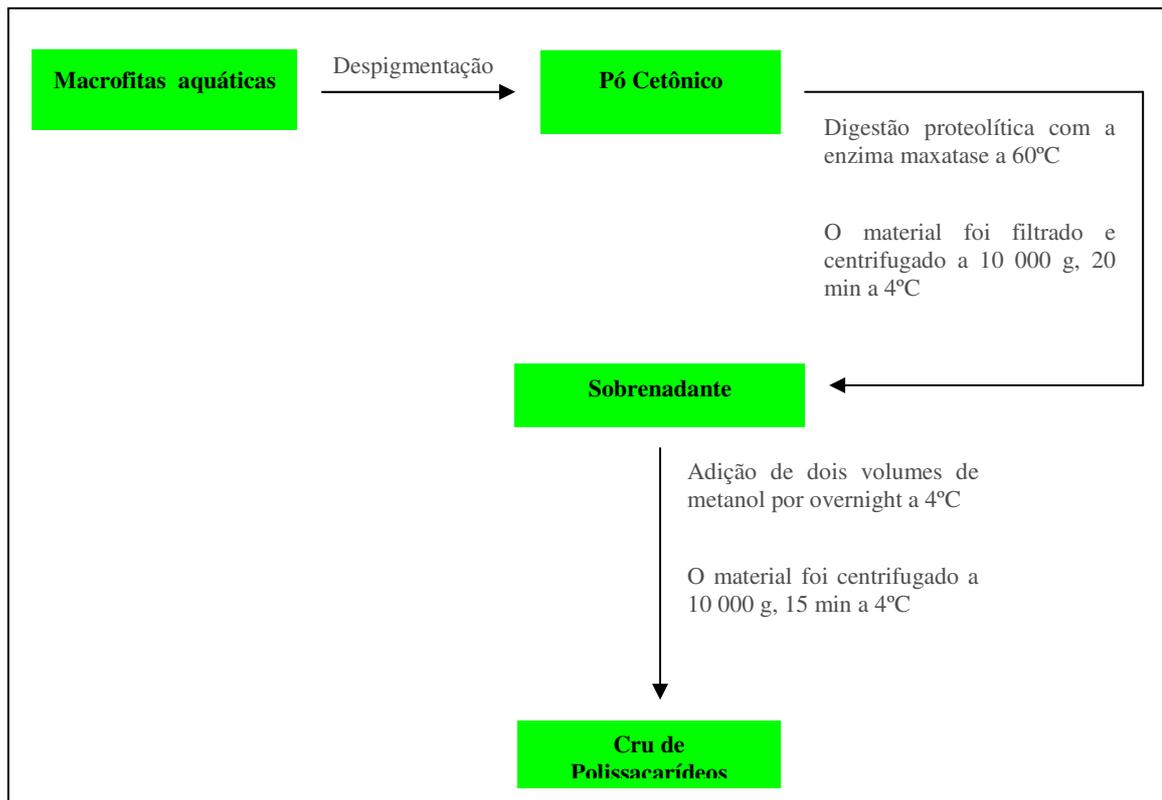


Figura 3 - Esquema de obtenção do cru de polissacarídeos das macrófitas aquáticas.

3.5.2 Caracterização dos polissacarídeos

3.5.2.1 Caracterização química

A caracterização química por meio de dosagens, foram realizadas utilizando-se de soluções preparadas a partir do cru de polissacarídeos, denominadas soluções polissacarídicas, obtido de todas as porções das macrófitas aquáticas coletadas.

3.5.2.1.1 Dosagem de açúcares totais

Para se verificar a quantidade de polissacarídeos nas soluções, foi realizado a determinação de açúcares totais pelo método do fenol/ácido sulfúrico de acordo com Dubois

et al (1956), empregando-se como padrão L-fucose, D-galactose ou D-glicose, sendo as leituras realizadas a 490 nm ou 480 nm.

3.5.2.1.2 Dosagem de sulfato

O sulfato total das frações polissacarídicas foi medido após hidrólise ácida (HCl 4N, 6 horas, 100°C) e quantificado por turbidimetria pelo método da gelatina-bário (DODGSON; PRICE, 1962). Sulfato de sódio (1,0 mg/ml) foi empregado como padrão.

3.5.2.1.3 Dosagem de proteínas

O grau de contaminação protéica foi determinado com o reagente “comassie blue R”, segundo o método de Spector (1978) e a leitura realizada à 595nm.

3.5.2.1.4 Determinação quantitativa dos monossacarídeos

Os monossacarídeos foram quantificados por densitometria dos cromatogramas obtidos após a hidrólise ácida (HCl 2,0M, 100° C, 2 h) das soluções polissacarídicas.

3.5.2.2 Caracterização físico-química

3.5.2.2.1 Eletroforese em gel de agarose

Para visualização dos polissacarídeos extraídos pela proteólise e posterior precipitação com metanol, o material obtido foi submetido a eletroforese em gel de agarose. O preparo

das lâminas passou pela pesagem do gel de agarose (0,6%) e diluição no tampão 1,3 diamino propano acetato (PDA) 0,05M, pH 9,0. Esse gel foi colocado sobre lâminas de vidro (7,5 x 7,5 cm x 1,5 mm, ou 5,0 x 7,5 cm x 1,5 mm). Alíquotas de cinco microlitros de cada solução do cru de polissacarídeos foram aplicadas em canaletas no gel e submetidas à eletroforese, em caixa resfriada a 4°C. A origem da corrida eletroforética se procedeu a partir do pólo negativo.

Nestas eletroforeses foram usados como referência de mobilidade, os padrões de glicosaminoglicanos sulfatados: heparan sulfato (HS), dermatan sulfato (DS) e condroitim sulfato (CS), uma vez que não se dispõem de padrões específicos dos polissacarídeos de vegetais. Decorrido o tempo previsto para a migração eletroforética em cada sistema de tampão a 100 Volts, os compostos foram precipitados com CETAVLON 0,1%, por no mínimo duas horas, à temperatura ambiente.

Em seguida, o gel foi seco sob uma corrente de ar quente e corado com azul de toluidina 0,1%. O excesso de corante foi removido numa solução de ácido acético 1% e etanol 50% (solução descorante). A operação foi repetida até completo descoloramento do fundo da lâmina. A seguir o gel foi seco à temperatura ambiente e analisada.

A revelação das bandas de migração é consequência da atividade metacromática característica de cada composto. Os compostos ricos em sulfato desenvolvem uma coloração roxa característica e aqueles cujas cargas são fornecidas apenas pelas carboxilas necessitam de uma imersão em acetato de sódio 0,2M pH 5,8 (NEWTON; SCOTT; WHITEMAN, 1974) desenvolvendo uma coloração roxo-avermelhada, descrita histologicamente por Mc Cully (1965).

3.5.2.2.2 Cromatografia em papel (sistema descendente)

As soluções polissacrídicas extraídas das porções das macrófitas *Eichhornia crassipes*, *Eleocharis interstincta*, *Hydrocotyle bonariensis* e *Salvinia auriculata* foram hidrolisadas com 2N de HCl por 2 horas a temperatura de 100°C. Após hidrólise, as soluções foram secas (3 vezes) a pressão reduzida na presença de pastilhas de NaOH. Por fim o hidrolisado foi ressuspensão, aplicado em papel Whatman nº 01 e submetido ao seguinte solvente: acetato de etila: piridina: água (8:2:1) v/v.

Os compostos com poder redutor foram visualizados através de revelação com prata em meio alcalino (TREVELYAN ET; PROCTER; HARRISON, 1950).

3.5.2.2.3 Espectroscopia de Infravermelho

A espectroscopia de infravermelho foi realizada em espectrômetro Perkin-Elmer, de 4400 a 400 cm^{-1} no Departamento de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Norte. O cru de polissacarídeo sulfatado extraído das porções das macrófitas *Eichhornia crassipes*, *Eleocharis interstincta*, *Hydrocotyle bonariensis* e *Salvinia auriculata* (5 mg cada) foi analisado após secagem em aparelho de Abdenhalden, sob forma de pastilha de KBr contendo P_2O_5 a 60°C.

3.5.2.3 **Caracterização histoquímica**

As macrófitas *Eichhornia crassipes*, *Eleocharis interstincta* e *Salvinia auriculata* coletadas no riacho Água Quente foram fixadas, localizado no município de Pirangi do Norte,

litoral sul do Rio Grande do Norte, foram lavadas e separadas em suas porções vegetativas para posterior fixação.

A solução fixadora utilizada foi o Fixador FAA que é uma mistura de formol, álcool etílico, ácido acético e água. As porções vegetativas das macrófitas aquáticas ficaram imersas nessa solução por 48 horas a temperatura ambiente.

3.5.2.3.1 Técnicas para emblocamento

Após a fixação no FAA, as porções vegetativas foram desidratadas em concentrações crescentes de álcool etílico (70 a 100%) para retirada de toda água contida nos tecidos. Essa etapa foi feita de forma gradual para que não houvesse danos às células teciduais. Em seguida o material foi submetido ao clareamento com xilol que foi trocado diversas vezes para que o mesmo penetrasse em todo o tecido anteriormente desidratado com álcool etílico.

As porções vegetativas, após o processo de desidratação e clareamento foram inclusas em parafina para posteriores cortes e coloração. Os cortes realizados nos blocos de parafina com as porções das macrófitas foram de aproximadamente 10 µm de espessura e montados em lâminas que desparafinados, hidratados e corados foram cobertos por uma lamínula com Entellan®.

Para localização dos polissacarídeos sulfatados nos tecidos das porções vegetativas das macrófitas aquáticas descritas anteriormente foram utilizados métodos histoquímicos específicos para diferentes polissacarídeos. Os corantes empregados na caracterização foram os seguintes:

- Hematoxilina-eosina (HE) - Nesse método os núcleos e as substâncias basófilas do citoplasma ricas em RNA coram-se de azul, com cor semelhante aos polissacarídeos

ácidos. (JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983). O citoplasma cora-se em rosa avermelhado (PROPHET ET AL., 1992).

- Ácido periódico de Schiff (PAS) - Nessa técnica o ácido periódico de Schiff oxida as ligações entre os carbonos das seqüências 1-2 glicol, dos hidratos de carbono, produzindo aldeídos. Os aldeídos são revelados pelo reagente de Schiff, que reage com os grupamentos aldeído, produzindo um composto corado e insolúvel de cor vermelha (JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983). Essa técnica permite visualizar dessa forma os polissacarídeos neutros presentes no tecido (PROPHET ET AL., 1992).
- Azul de Alcian (AA) - Essa técnica se baseia nas ligações que se formam entre o corante básico com os polissacarídeos ácidos, que possuem grupos ácidos (grupamentos carboxilas ou sulfato) na sua constituição (JUNQUEIRA; JUNQUEIRA 1983). Os polissacarídeos reagem com o Azul de Alcian em diferentes condições de pH. Dessa forma, em pH 2,5 são corados compostos carboxilados e em pH 1,0 coram-se os polissacarídeos sulfatados (LUNA, 1968; PROPHET ET AL., 1992).
- Azul de Alcian e ácido periódico de Schiff - Essa técnica é muito útil quando a possibilidade de no mesmo tecido estarem presentes polissacarídeos neutros e ácidos. Nessa metodologia os polissacarídeos ácidos se coram previamente com o azul de Alcian (pH 1,0) e os polissacarídeos neutros são modificados pelo PAS, apresentando uma coloração rósea escura (LUNA, 1968).
- Azul de toluidina (AT) - Esse método se baseia na característica básica do corante que forma ligações eletrostáticas com os radicais ácidos presentes nos tecidos. Os

polissacarídeos sulfatados e os ácidos nucléicos se coram de púrpura verdosa (JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983; MACÊDO, 1997). A lignina, os taninos e as demais estruturas não ácidas coram-se de azul (BEHMER; TOLOSA; F. NETO, 1976).

3.5.2.4 Determinação da composição centesimal das macrófitas aquáticas

Os parâmetros analisados foram: umidade, cinzas ou resíduo mineral fixo, lipídios ou extrato etéreo, proteínas, fibras e carboidratos. Os métodos utilizados na determinação de cada um desses parâmetros estão relacionados abaixo.

3.5.2.4.1 Umidade

Foi determinada pelo método gravimétrico, empregando-se o calor através de estufa a 105°C. Esse método baseia-se na determinação de perda de peso dos vegetais ao aquecimento. Vinte gramas de cada amostra foram pesadas em cápsulas de porcelana, previamente taradas, levados a uma estufa a 105°C por 48 horas, para obtenção do peso seco, expresso em gramas (AOAC,1985).

3.5.2.4.2 Proteína Bruta

O teor de proteínas foi determinado através do método semi-micro Kjeldhal (AOAC,1985). Utilizaram-se três amostras de 200 mg dos vegetais, previamente dessecadas e colocadas em balão de Kjeldahl de 50 ml. Ao balão foram adicionados os catalisadores (0,5 g de sulfato de cobre e 1,0 g de sulfato de potássio) e finalmente 5 ml de ácido sulfúrico. O balão foi conduzido ao digestor de Kjeldahl por vinte e quatro horas, quando o material

adquiriu uma coloração verde transparente. Após a digestão, o material foi transferido para o aparelho de destilação ao qual foi adicionado hidróxido de sódio a 40% até saturação. O produto da destilação foi coletado em um erlenmeyer contendo 10 ml da solução de ácido bórico saturada e 3 gotas do indicador. A destilação foi levada a efeito até que o material do erlenmeyer atingiu um volume de 50 ml. Procedeu-se então à titulação com ácido sulfúrico a 0,02N, aplicando-se o valor do volume titulado na seguinte fórmula:

$$\text{Nitrogênio total} = \frac{V \times \text{normalidade} \times \text{fator do ácido} \times 14.01}{\text{peso da amostra em gramas}}$$

sendo o teor de proteínas das amostras, igual a 6,25 x nitrogênio total.

3.5.2.4.3 Lipídios

Para verificação do teor de lipídios na amostra foi pesado 1,5 g de amostra pulverizada de cada alimento, acrescentando-se 10 ml de clorofórmio, 20 ml de metanol e 8 ml de água destilada na proporção 1: 2: 0,8 respectivamente e em seguida agitou-se por 30 min em um agitador rotativo. Em seguida foram acrescentados 10 ml de clorofórmio e 10 ml de sulfato de sódio anidro 1,5%, homogeneizando-se em seguida por dois minutos. Formaram-se duas camadas, uma hidrofílica e uma hidrofóbica, a qual continha os lipídios. Foram retirados 15 ml da camada hidrofóbica para um tubo de 30 ml, adicionando-se 1 g de sulfato de sódio anidro e o material filtrado, transferindo-se 5 ml do filtrado, para outro recipiente previamente tarado que foi levado à estufa a 105°C. Após secagem e resfriamento em dessecador, as amostras foram pesadas. O percentual de lipídios totais foi estimado a

partir do peso dos lipídios em um volume de 5 ml, corrigido para o peso da amostra utilizado (AOAC, 1985).

3.5.2.4.4 Cinzas ou resíduo mineral fixo

A fração cinzas foi determinada pelo método gravimétrico segundo a (AOAC,1985). Amostras de 1,5 g foram pesadas em cadinhos de Gooch, previamente tarados e incinerados em bico de gás até os alimentos serem transformados em carvão. Em seguida foram submetidos à temperatura de 550°C em mufla até destruição total da matéria orgânica, momento em que apresentaram coloração esbranquiçada, sem pontos de carvão. As amostras foram retiradas da mufla após a temperatura da mesma ficar em torno de 50°C, e levadas ao dessecador para esfriar e serem novamente pesadas. A diferença entre o peso líquido do cadinho e o peso bruto após incineração forneceu a quantidade de cinzas dos alimentos.

3.5.2.4.5 Estimativa de Carboidratos

A quantidade de carboidratos das macrófitas dulcícolas foi estimada por diferença a partir dos demais componentes da composição centesimal (proteínas, lipídios, fibras e cinzas), segundo normas da AOAC (1985).

3.5.2.4.6 Estimativa de Fibras

O método utilizado foi o da digestão ácida e alcalina segundo a AOAC (1985). Foram pesadas, em triplicatas, amostras de 2 gramas do material previamente delipidado e colocadas em becker de 600 mL, contendo 200 mL de ácido sulfúrico a 1,25% fervente e mantido em

ebulição por 30 minutos; após esse período o material ainda quente foi filtrado a vácuo sobre papel filtro comum. O becker foi lavado com água destilada e, a seguir, o material foi recolocado no mesmo becker sendo adicionados 200 mL de hidróxido de sódio a 1,25% e mantido em ebulição por 30 minutos. Decorrido esse tempo, o material ainda quente, foi filtrado a vácuo em cadinhos de Gooch com lã de vidro, previamente pesados, e o material lavado sucessivamente com água destilada para retirar o excesso de alcalinidade existente no filtrado, monitorado com um papel indicador, até completar a neutralização. Em seguida, o resíduo foi lavado com álcool e éter etílico por duas vezes. Após a secagem do ambiente, o cadinho foi colocado em estufa a 105°C até peso constante. A variação do peso encontrado fornece a quantidade de fibras da amostra.

3.5.3 Fatores Climatológicos

Os aspectos climáticos, tais como: precipitação pluviométrica, temperatura ambiental e insolação, no período de março de 2004 e foram analisados segundos dados fornecidos pela Estação Climatológica Principal do Departamento de Geografia da Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

3.5.4 Parâmetros Ambientais

Os parâmetros físico-químicos, temperatura (°C) e salinidade, foram determinados nas coletas realizadas. A temperatura foi verificada com um termômetro de mercúrio centígrado e a salinidade obtida por um refratômetro de salinidade portátil, modelo RTS 101 ATC.

4 RESULTADOS

Para se determinar a quantidade de polissacarídeos, sulfato e proteínas existentes nas soluções de polissacarídeos obtidas das macrófitas aquáticas, essas foram separadas em porções vegetativas, proteolisadas e submetidas a dosagens de açúcares totais, sulfato e proteínas.

Das nove macrófitas analisadas, seis demonstraram a presença de íon sulfato (Tabela 1). Entre as macrófitas que apresentaram íon sulfato, observa-se que a distribuição desse íon não foi uniforme por todo o vegetal. *Nymphaea ampla* e da *Eleocharis interstincta* apresentaram maior quantidade de sulfato na raiz, enquanto que *Salvinia auriculata*, *Hydrocotyle bonariensis* e *Egeria densa* tiveram as folhas como aquela parte mais enriquecida em sulfato. Por outro lado, *Eichhornia crassipes* apresentou o pecíolo como o mais representativo.

As soluções polissacarídicas das macrófitas após a precipitação, centrifugação e secagem foram solubilizadas em água destilada e submetidas à análise em eletroforese (Lâminas 1 e 2).

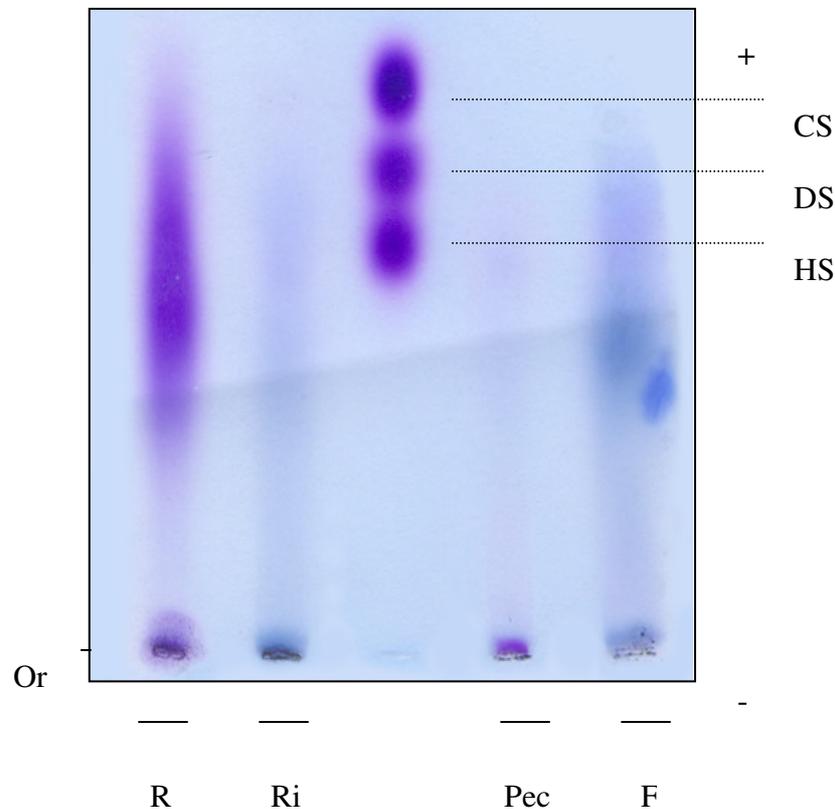
Uma vez que o azul de toluidina se complexa com compostos sulfatados e passa a apresentar coloração violácea é possível confirmar a presença de polissacarídeos sulfatados na lâmina de gel de agarose proveniente da corrida eletroforética. As lâminas do material obtido das porções de *Cabomba caroliniana*, *Ceratophyllum aquaticum*, *Egeria densa*, *Egeria naja*, *Hydrocotyle bonariensis* e *Nymphaea ampla* não apresentaram resultado positivo quando coradas com azul de toluidina. O que indica a não existência de polissacarídeos sulfatados no material avaliado.

Tabela 1 - Relação massa/massa de açúcares totais, sulfato e proteínas presentes nas partes isoladas e analisadas das macrófitas aquáticas.

		Polissacarídeos	Sulfato	Proteínas
<i>Eichhornia crassipes</i> (Mart.) Solms.	raiz	1,00	0,24	0,15
	rizoma	1,00	0,14	0,11
	pecíolo	1,00	0,34	0,20
	folha	1,00	0,06	0,19
<i>Egeria densa</i> Planchon	raiz	1,00	-	0,04
	pecíolo	1,00	-	0,02
	folha	1,00	-	0,02
<i>Egeria naja</i> Planchon	caule	1,00	-	0,05
	folha	1,00	-	0,06
<i>Eleocharis interstincta</i> (Vahl) R. & J.A. S.	raiz	1,00	0,09	0,07
	folha	1,00	0,05	0,17
<i>Cabomba caroliniana</i> Gray	caule	1,00	-	0,05
	folha	1,00	-	0,06
<i>Ceratophyllum aquaticum</i> Lam.	raiz	1,00	-	0,01
	caule	1,00	-	0,08
	folha	1,00	-	0,11
<i>Hydrocotyle bonariensis</i> Comm. ex Lam.	raiz	1,00	-	0,03
	pecíolo	1,00	0,01	0,04
	folha	1,00	0,29	0,06
<i>Nymphaea ampla</i> (Salisb.) D.C.	raiz	1,00	0,24	0,06
	rizoma	1,00	0,04	0,13
	pecíolo	1,00	0,003	0,11
	folha	1,00	0,008	0,01
	flor	1,00	0,02	0,04
<i>Salvinia auriculata</i> Aublet.	raiz	1,00	0,14	0,08
	folha	1,00	0,25	0,14

As soluções polissacarídicas extraídas da raiz e do pecíolo de *Eichhornia crassipes* apresentaram banda eletroforéticas com coloração violácea que confirmou a presença de polissacarídeos sulfatados nessas porções. Não foram identificadas bandas eletroforéticas de coloração violácea nas soluções obtidas de rizoma e folha (Lâmina 1), observou-se apenas uma banda com coloração azulada que não caracteriza polissacarídeos sulfatados. Os polissacarídeos sulfatados da raiz se mostraram bastante polidispersos e coraram bem mais

intensamente com o azul de toluidina do que os do pecíolo. Estes por sua vez concentraram-se perto da origem não migrando dessa região.

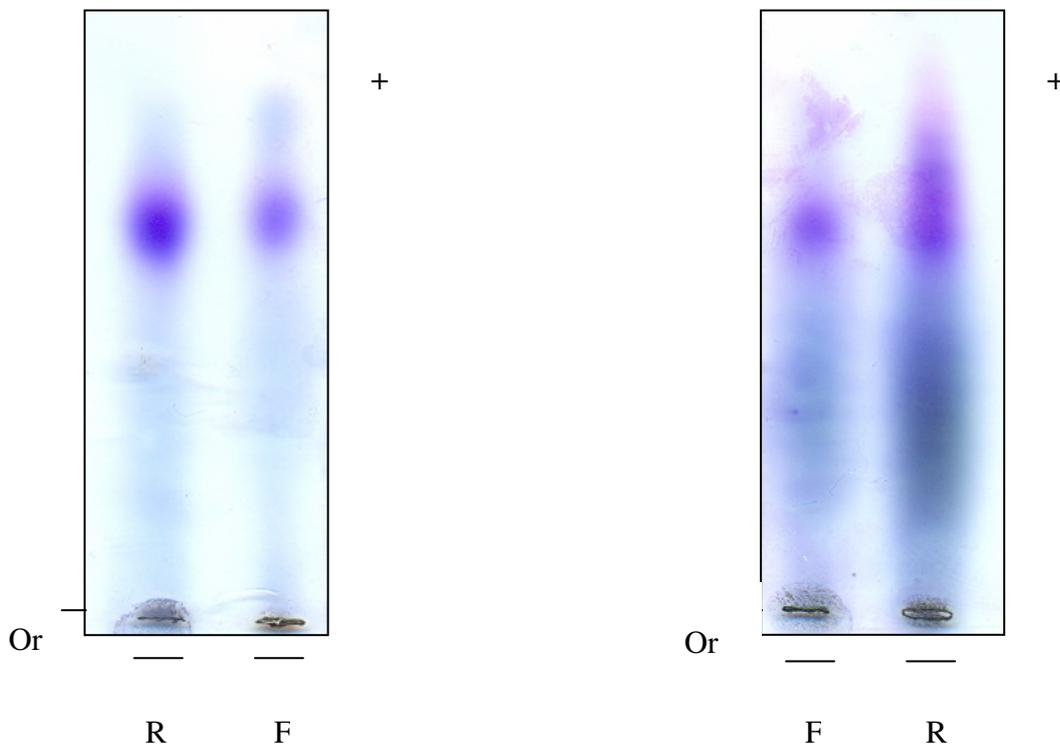


Lâmina 1 - Comportamento eletroforético do cru de polissacarídeos das porções vegetativas de *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms. Aliquotas de 5µl (250µg) foram aplicadas em laminas de agarose em tampão PDA 0,05 M, pH 9,0. Após precipitação com CETAVLON as lâminas foram coradas com azul de toluidina. **CS**, condroitin sulfato; **DS**, dermatan sulfato; **HS**, heparan sulfato; **R**, raiz; **Ri**, rizoma; **Pec**, pecíolo; **F**, folha; **Or**, Origem.

A lâmina 2A apresenta o comportamento eletroforético dos polissacarídeos ácidos das soluções obtidas das porções de *Eleocharis interstincta*. Nessa macrófita a raiz e a folha demonstraram um resultado positivo para polissacarídeos sulfatados, cor violácea, pela coloração no azul de toluidina. Diferente do observado nas outras espécies, os polissacarídeos sulfatos desse vegetal não se mostraram polidispersos e sim concêntricos em uma única banda eletroforética.

As soluções obtidas da raiz e da folha de *Salvinia auriculata* apresentaram bandas eletroforética de coloração violácea que confirmam a presença de polissacarídeos sulfatados nessas porções vegetativas. Contudo, os polissacarídeos sulfatados da raiz se demonstraram

bem mais polidispersos. Abaixo dessas bandas, observa-se a presença de bandas que assumiram uma coloração azulada não característica de polissacarídeos sulfatados, mas semelhante a aquela observada para ácidos nucleicos (Lâmina 2B).



Lâmina 2 - Comportamento eletroforético do cru de polissacarídeos das porções vegetativas de *Eleocharis interstincta* (Vahl) R. & J.A.S. (A) e *Salvinia auriculata* Aublet. (B). Aliquotas de 5µl (750µg) foram aplicadas em laminas de agarose em tampão PDA 0,05 M, pH 9,0. Após precipitação com CETAVLON as lâminas foram coradas com azul de toluidina. *CS*, condroitin sulfato; *DS*, dermatan sulfato; *HS*, heparan sulfato; *R*, raiz; *Pec*, pecíolo; *F*, folha; *Or*, Origem.

Diante dos resultados obtidos, apenas três espécies continuaram (*E. crassipes*, *E. interstincta*, *S. auriculata*) sendo objeto de estudo desse trabalho.

As soluções polissacarídicas obtidas por proteólise das porções vegetativas das macrófitas *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms., *Eleocharis interstincta* (Vahl) Roemer & J.A. Shultes e *Salvinia auriculata* Aublet. foram submetidas a secagem, pesagem e posteriormente análise de seus rendimentos (Gráfico 1).

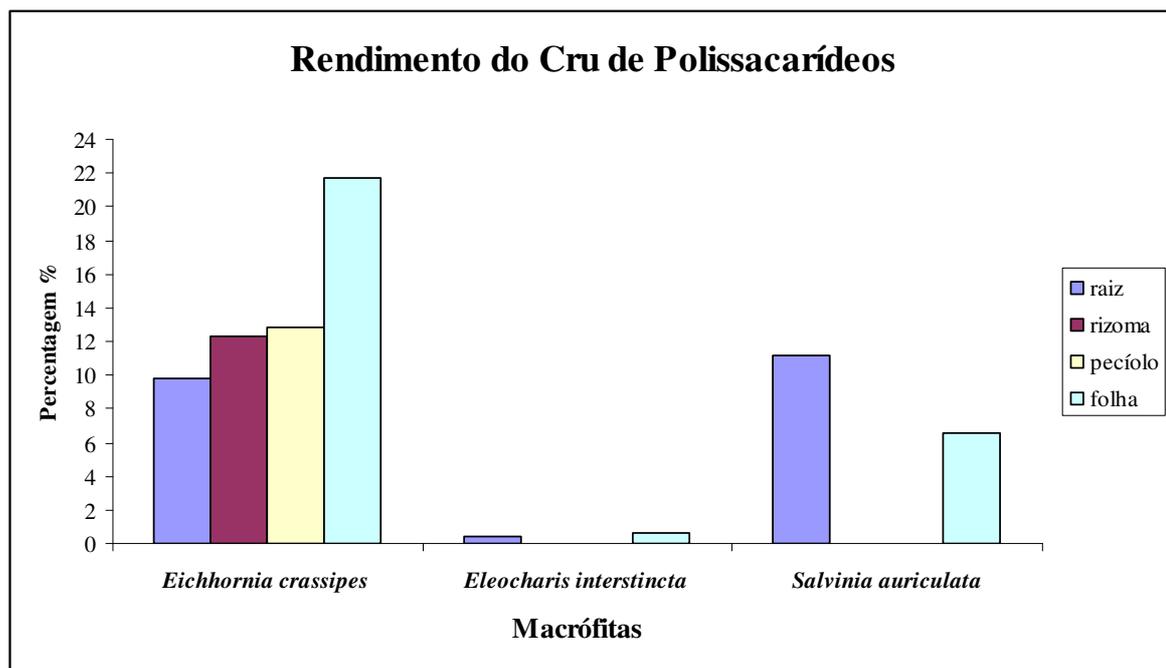


Gráfico 1 - Rendimento percentual das soluções polissacarídicas das macrófitas aquáticas dulcícolas.

O peso seco obtido para o cru de polissacarídeos obtido de cada uma das porções foi comparado com a respectiva massa do pó cetônico, assim observou-se o rendimento percentual de cada porção vegetativa nas macrófitas (Gráfico 1). Para as espécies *Eichhornia crassipes* e *Eleocharis interstincta*, suas folhas foram a porções que apresentaram melhor rendimento com relação à extração de polissacarídeos. Já em *S. auriculata* a porção vegetativa que apresentou melhor rendimento foi a raiz com 11%.

A análise qualitativa dos monossacarídeos constituintes das soluções polissacarídicas obtidas das porções vegetativas das macrófitas foi realizada em cromatografia descendente em papel. A cromatografia é um método que se baseia nas características físico químicas das misturas para separar seus componentes. Na cromatografia descendente em papel, os componentes menos solúveis possuem uma movimentação mais lenta (COLLINS; BRAGA, 1998).

As análises cromatográficas mostraram um padrão de composição monossacarídica de todas as soluções polissacarídeos analisadas. Foi observado que todas possuem em sua

composição cinco monossacarídeos comuns: galactose, glicose, manose, arabinose e xilose. Contudo, estes não se distribuíram uniformemente nas soluções polissacarídicas, a galactose sempre se apresentou como o principal constituinte.

Na Tabela 2 pode ser observada a relação molar dos monossacarídeos existentes nas soluções polissacarídicas obtidas das porções vegetativas das espécies acima descritas. A galactose foi o constituinte utilizado como referência na relação molar entre os monossacarídeos presentes nas soluções. A solução polissacarídica da folha de *Eichhornia crassipes* foi a que apresentou a relação equimolar de seus monossacarídeos. Contudo ela não apresentou nem xilose, nem manose na sua composição, fato também observado na solução proveniente do pecíolo. A solução polissacarídica de raiz de *E. interstincta* apresentou galactose e glicose (1:0,8) como os principais constituintes, enquanto que a solução polissacarídica da folha apresenta galactose, glicose e arabinose quase de forma equimolar. Quando se compara as relações moleculares dos constituintes das soluções de *Salvinia auriculata* se observa que essas são iguais, diferente do observado para as outras duas plantas.

Tabela 2 - Análise química e relações molares dos açúcares presentes nas soluções polissacarídicas obtidas das porções vegetativas das Macrófitas Aquáticas.

Macrófita	Porção Vegetativa	Açúcar Total %	Sulfato %	Proteínas %	Relação Molar				
					GAL ¹	GLI ¹	ARAB ¹	XIL ¹	MAN ¹
<i>Eichhornia</i>	raiz	13,59	3,28	1,74	1,0	0,5	0,3	0,1	0,3
	rizoma	13,67	1,96	1,35	1,0	0,4	0,7	0,1	0,1
	pecíolo	13,59	4,66	2,34	1,0	0,5	0,6	-	-
	folha	11,86	0,76	1,97	1,0	1,0	1,0	-	-
<i>Eleocharis</i>	raiz	13,86	1,33	0,82	1,0	0,8	0,1	0,1	0,1
	folha	14,21	0,81	2,06	1,0	0,9	0,9	0,2	0,1
<i>Salvinia</i>	raiz	13,67	1,88	1,00	1,0	0,5	0,2	0,2	0,2
	folha	14,02	3,62	1,74	1,0	0,5	0,2	0,2	0,2

¹ relação molar de açúcar, tendo a galactose como referência

GAL, galactose; GLI, glicose; ARA, arabinose; XIL, xilose; MAN, manose; AC. GLU, ácido glucurônico

O cru de polissacarídeos das porções vegetativas das macrófitas aquáticas foram submetidas à espectroscopia de infravermelho segundo descrito em métodos. Os espectros das soluções foram bastante similares entre si. Os dados mais relevantes foram observados na

região entre $1271 - 1259 \text{ cm}^{-1}$, essa região demonstra a presença de compostos sulfatados (Figuras 4, 5 e 6). Na região de $1068-1167 \text{ cm}^{-1}$ (estiramento do hemiacetal), e 1258 cm^{-1} (estiramento assimétrico S=O) observa-se picos que indicam a presença de monossacarídeos sulfatados.

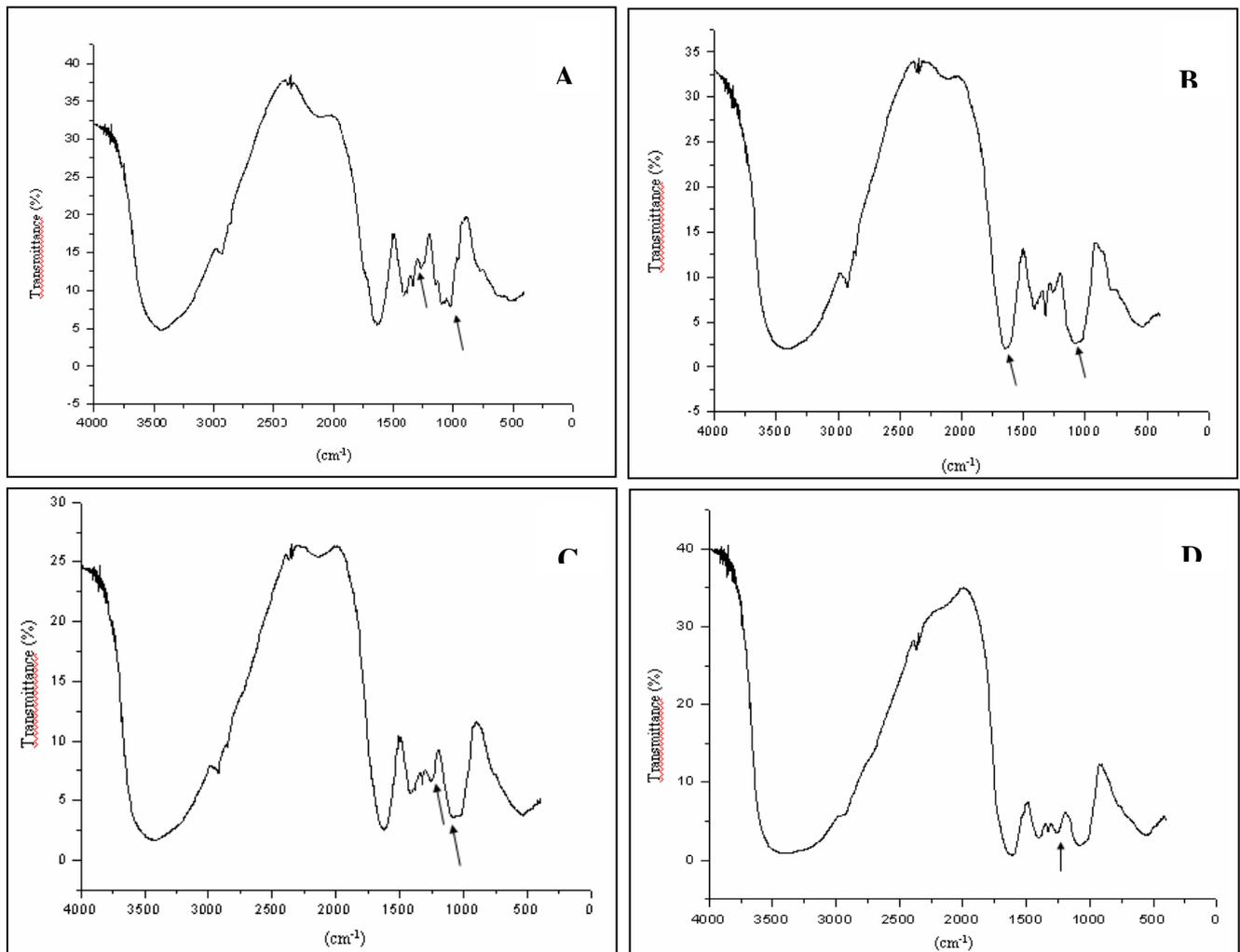


Figura 4 - Espectros de infravermelho da região entre $4000 - 500 \text{ cm}^{-1}$ da raiz (A), rizoma (B), pecíolo (C) e folha (D) da macrófita aquática *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms.

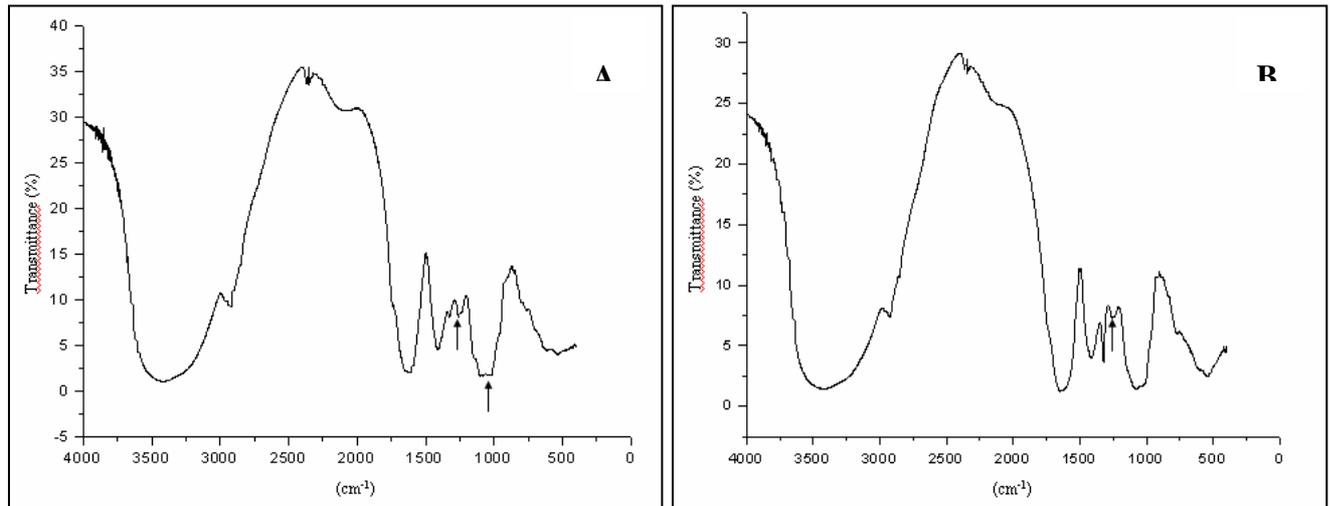


Figura 5 - Espectros de infravermelho da região entre 4000 – 400 cm^{-1} da raiz (A) e folha (B) da macrófita aquática *Eleocharis interstincta* (Vahl) Roemer & J.A.

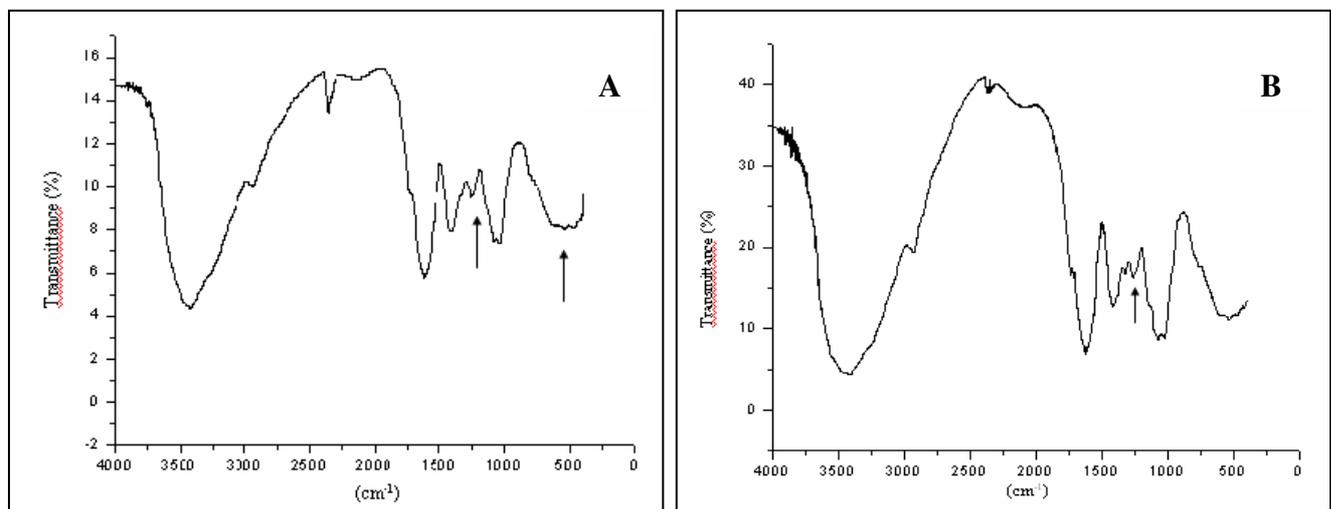
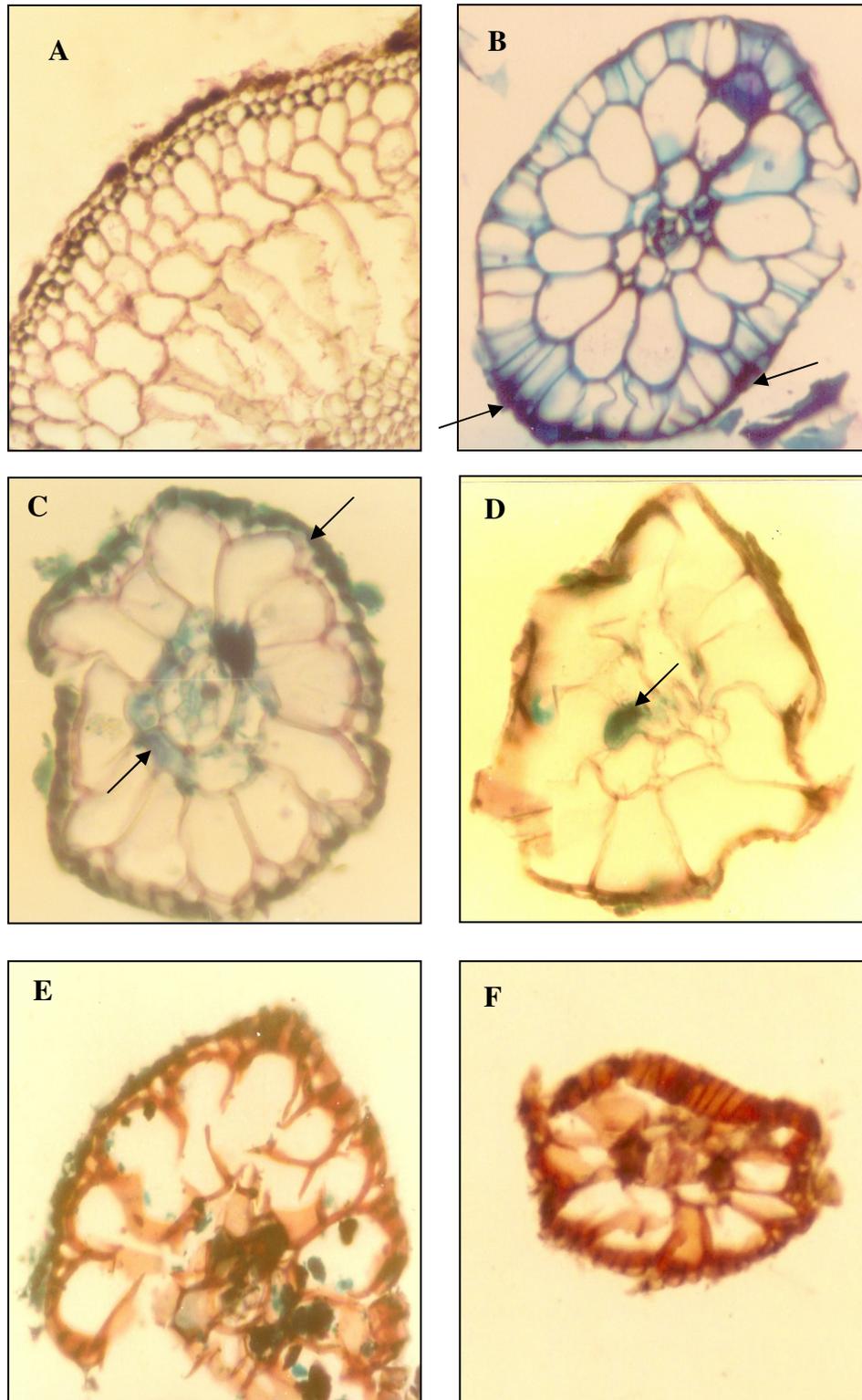


Figura 6 - Espectros de infravermelho da região entre 4000 – 500 cm^{-1} da raiz (A) e folha (B) da macrófita aquática *Salvinia auriculata* Aublet

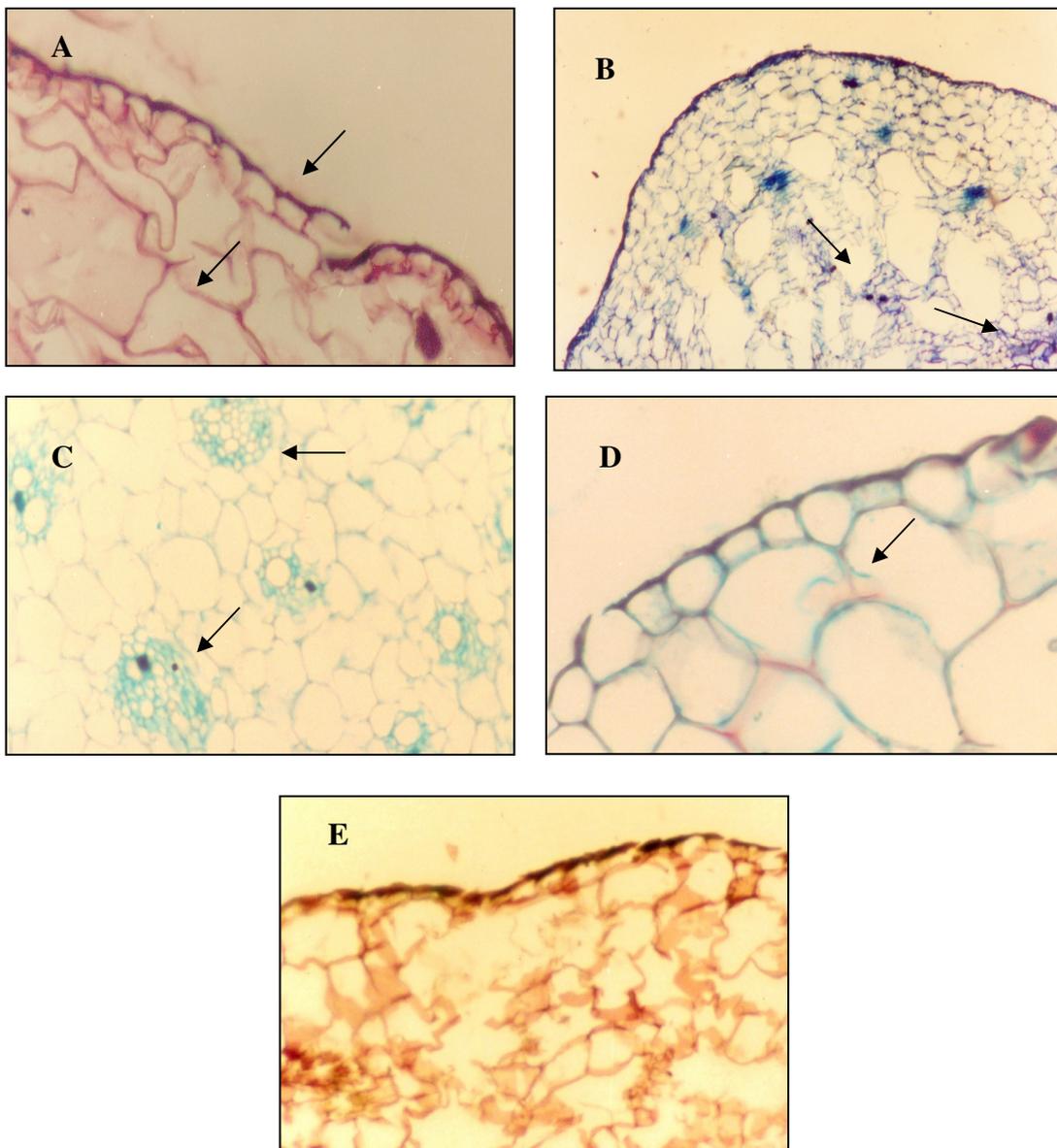
Na raiz de *Eichhornia crassipes*, pode-se observar por meio da técnica com o corante de azul de toluidina que os polímeros sulfatados encontra-se em maior quantidade na epiderme (Fotomicrografia 1B) e na exoderme do córtex dessa porção vegetativa. A coloração de azul de Alcian em pH 1,0 e 2,0 demonstraram que os polissacarídeos sulfatados encontram-se na epiderme e na endoderme do tecido vegetativo (Fotomicrografia 1C e D), enquanto que os compostos carboxilados apresentam-se em pequena quantidade próximo ao metaxilema. Por meio da coloração com o ácido periódico de Schiff (Fotomicrografia 1F) e

sua associação com azul de alcian (Fotomicrografia 1E) não foi identificado nenhum composto neutro nessa porção vegetativa.



Fotomicrografia 1 - Raiz de *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms. **A**-HE (200x); **B**-AT (200x); **C**-AAPH1 (400x); **D**-AAPH2 (400x); **E**-AAPAS (200x) e **F**-PAS (200x).

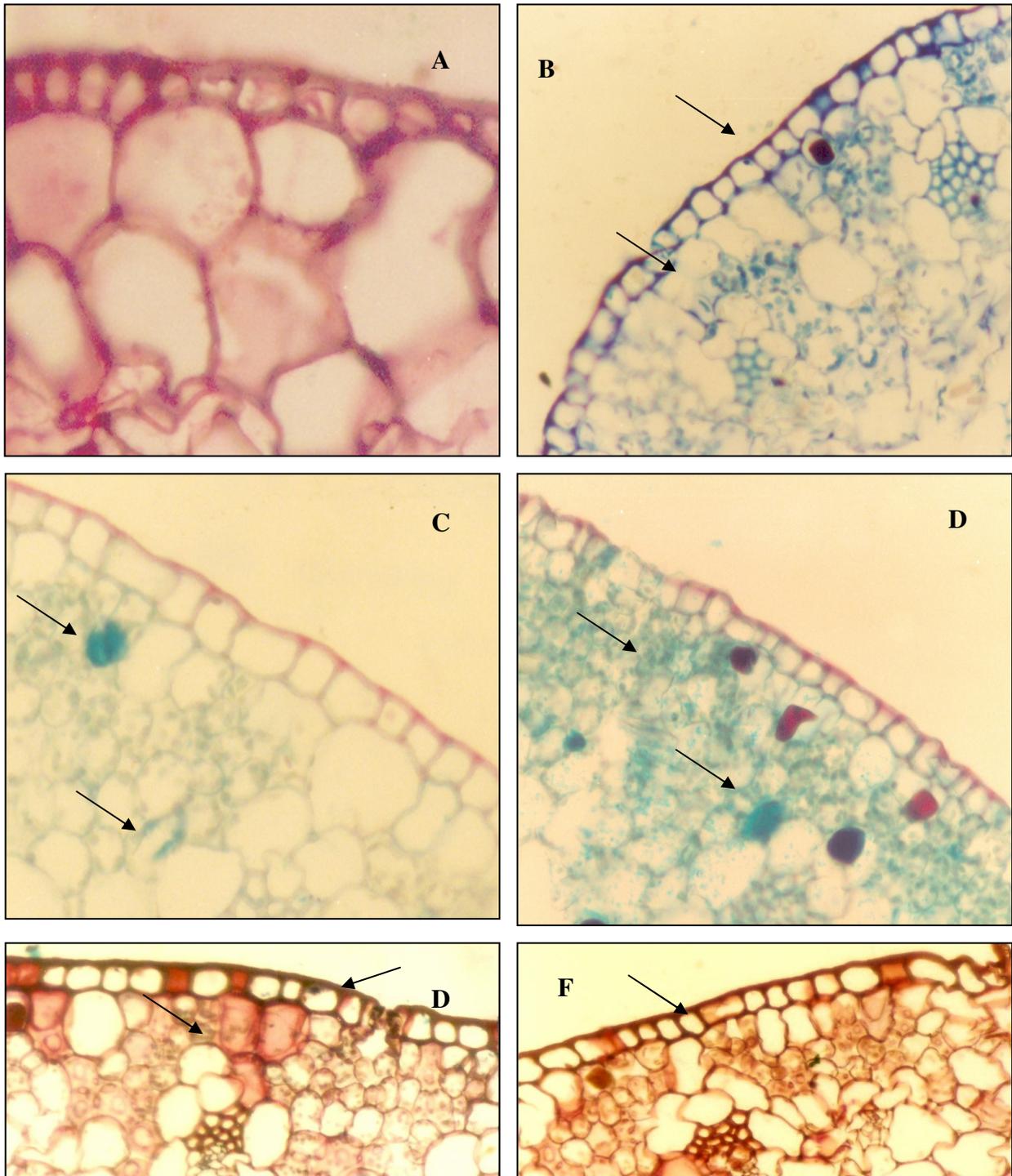
A porção do rizoma de *Eichhornia crassipes* apresenta células irregulares no córtex e uma camada de células bem organizadas na epiderme (Fotomicrografia 2A) com uma concentração de polissarídeos sulfatados maior que no seu córtex (Fotomicrografia 2B). Os polissacarídeos sulfatados estão distribuídos em todo o tecido vegetativo, concentrando-se no córtex ao redor dos feixes vasculares (Fotomicrografia 2C), assim como os carboxilados (Fotomicrografia 2D) que também podem ser visualizados em toda essa porção, não havendo a presença de polissacarídeos neutros (Fotomicrografia 2E).



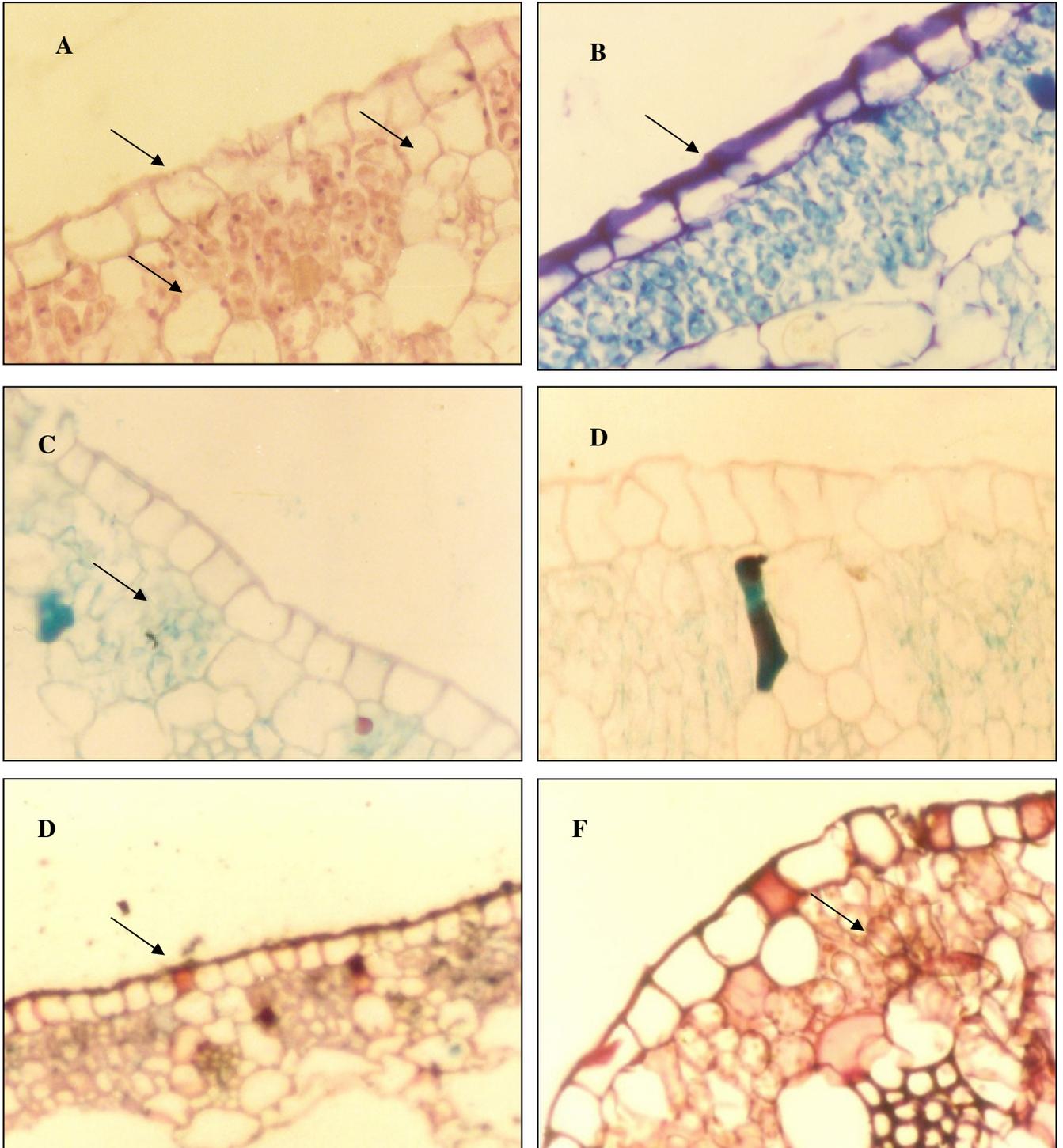
Fotomicrografia 2 - Rizoma de *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms. **A**-HE (200x); **B**-AT (40x); **C**-AApH1 (200x); **D**-AApH2 (200x) e **E**-PAS (100x).
Santos, N.D.

O pecíolo da *Eichhornia crassipes* apresenta em sua epiderme uma camada de células de tamanhos uniforme semelhante às encontradas no rizoma (Fotomicrografia 3A). Essa camada é seguida de colênquima, composto por células de formas e tamanhos diversificados. A epiderme e o colênquima dessa porção coram-se com azul de toluidina sendo dessa forma possuidores de compostos sulfatados (Fotomicrografia 3B). A região do córtex apresentou por meio da técnica com Azul de Alcian em pHs diferentes (ver métodos) polissacarídeos sulfatados (Fotomicrografia 3C) e carboxilados em maior concentração (Fotomicrografia 3D). As fotomicrografias 3E e F demonstram a presença de polissacarídeos neutros distribuídos não uniformemente na epiderme.

A folha de *E. crassipes* apresenta uma camada de células com formato cubóide mais externamente ao tecido foliar e sucessivas camadas com suas células apresentando tamanho e formato diferentes (Fotomicrografia 4A). A coloração violácea na camada de células epidermais da porção foliar indica compostos sulfatados nessa região que se apresenta fortemente corada pelo azul de toluidina em relação as demais regiões dessa porção (Fotomicrografia 4B). Uma coloração azul nas camadas do córtex corado com Azul de Alcian pH 1,0 (Fotomicrografia 4C) indica a presença de polissacarídeos sulfatados nessa região. E a ausência dessa coloração azul na a 24 D que apresenta um corte corado com Azul de Alcian em pH 2,0 indica a que esse tecido não apresenta polissacarídeos carboxilados. A coloração púrpura visualizada nas fotomicrografia 4 E e F caracterizam a presença de polissacarídeos neutros corados com o ácido periódico de Schiff (ver métodos).

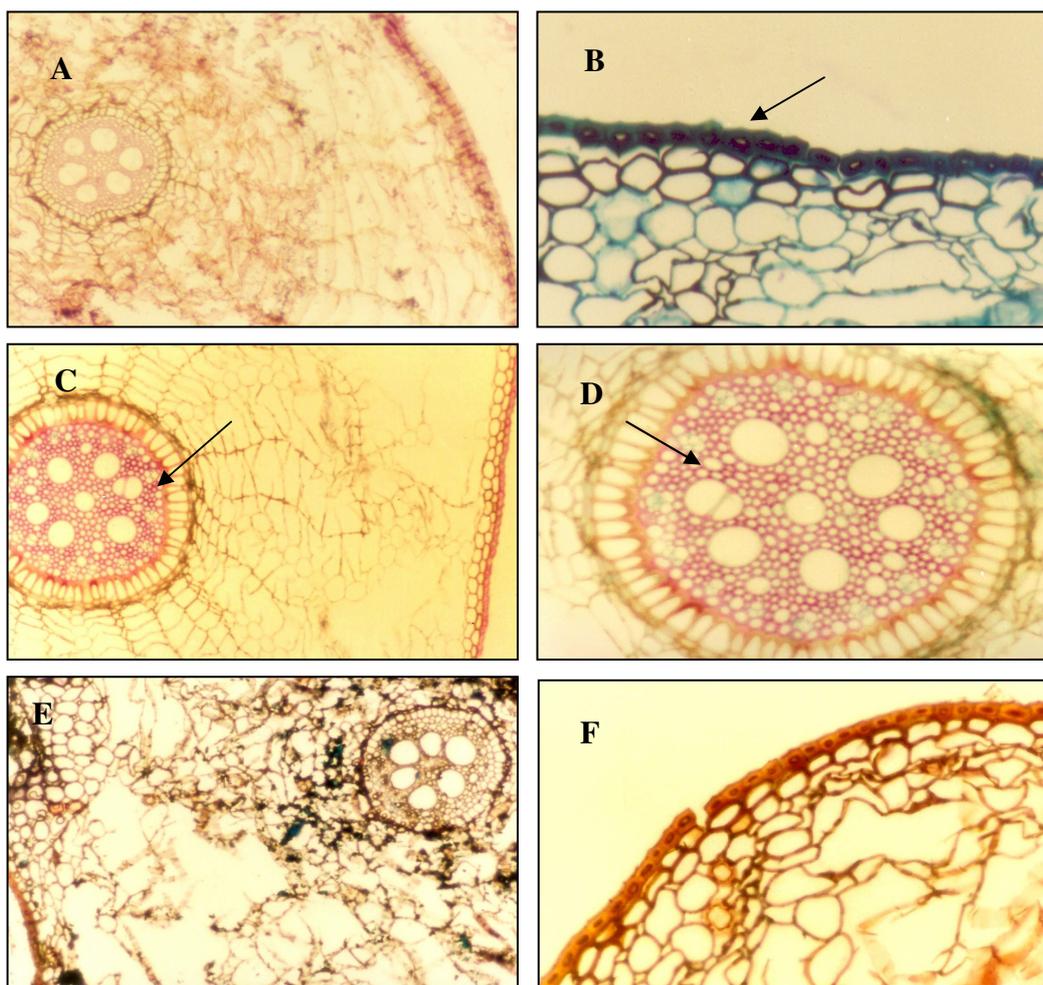


Fotomicrografia 3 - Pecíolo de *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms. A-HE (200x); B-AT (200x); C-AAPH1 (200x); D-AAPH2 (200x); E-AAPAS (200x) e F-PAS (200x).



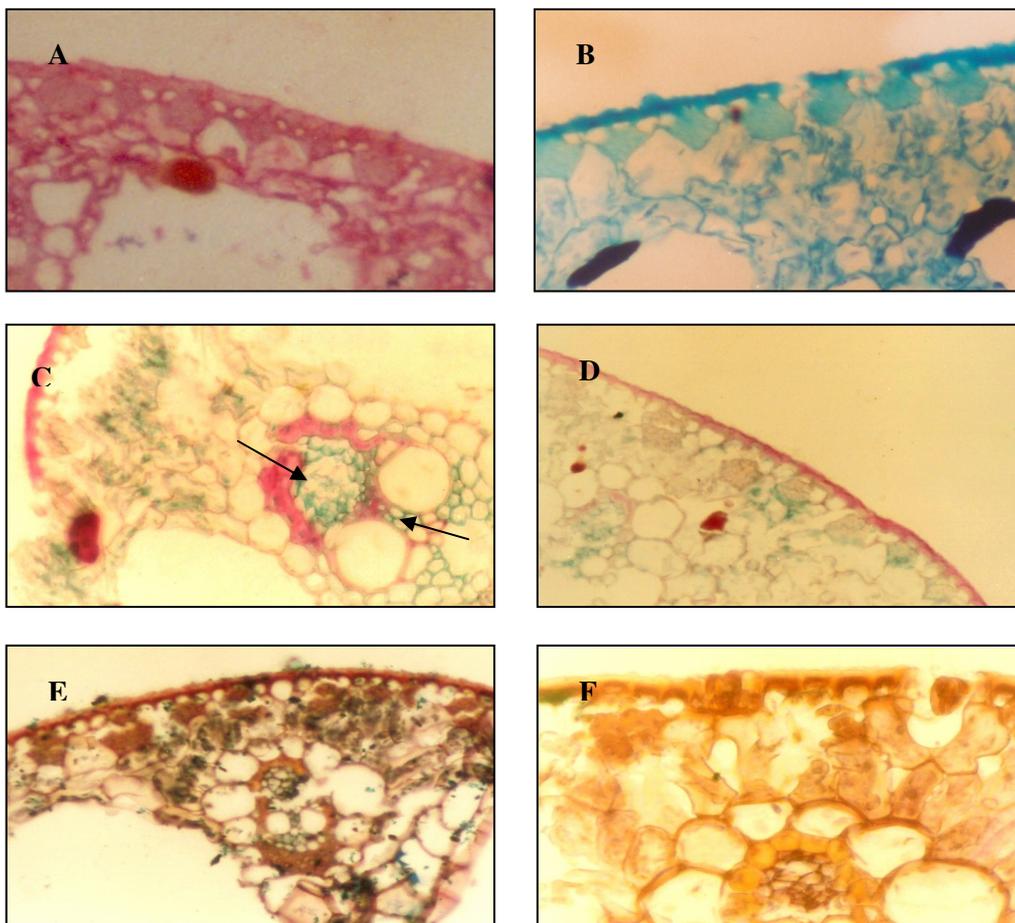
Fotomicrografia 4 - Folha de *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms. **A**-HE (200x); **B**-AT (200x); **C**-AApH1 (200x); **D**-AApH2 (200x); **E**-AAPAS (200x) e **F**-PAS (200x).

A raiz de *Eleocharis interstincta* apresenta uma epiderme composta por duas camadas de células bem definidas, um córtex composto por diversas células achatadas e alongadas e uma endoderme com células perpendiculares ao mesmo (Fotomicrografia 5A). Esse tecido apresenta uma reação metacromática positiva quando corado com o corante de azul de toluidina, o que caracteriza a presença de compostos sulfatados em maior quantidade na epiderme (Fotomicrografia 5B), a coloração rosa visualizada ao redor do metaxilama caracteriza a presença de compostos ácidos corados com safranina básica (Fotomicrografia 5 C e D). Há ausência de uma coloração vermelho-purpura nas Fotomicrografias 5 E e F indicam que nessa porção vegetativa não é encontrado polissacarídeos neutros.



Fotomicrografia 5 - Raiz de *Eleocharis interstincta* (Vahl) Roemer & J.A. Shultes. A-HE (100x); B-AT (200x); C-AApH1 (100x); D-AApH2 (200x); E-AAPAS (100x) e F-PAS (200x).

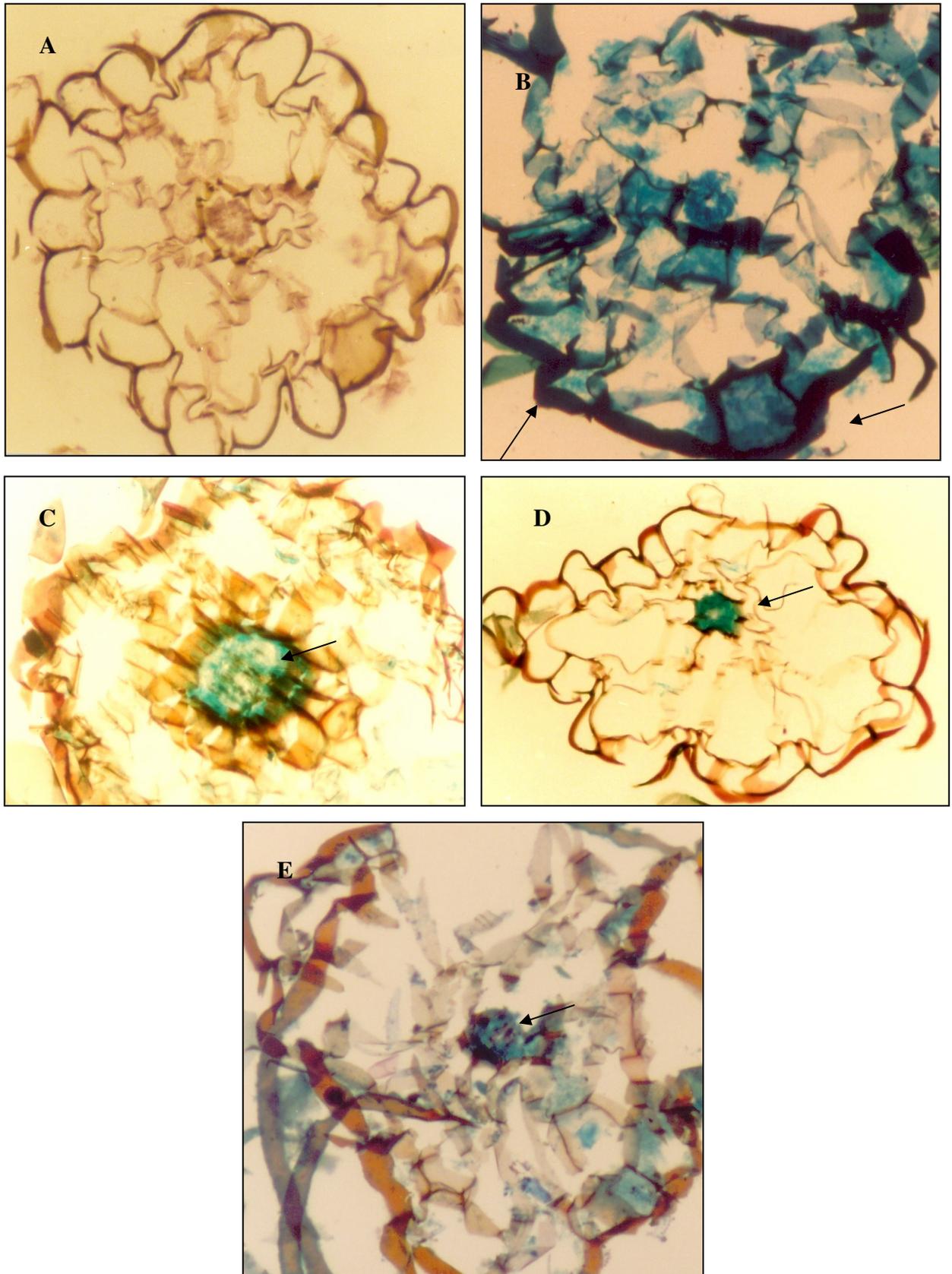
A folha de *Eleocharis interstincta* apresenta uma camada delgada de células mais externamente ao tecido foliar e sucessivas camadas celulares com suas células apresentando tamanho e formato diferentes (Fotomicrografia 6A). A coloração azulada no tecido analisado caracteriza a ausência de polissacarídeos sulfatados (Fotomicrografia 6B). Uma coloração azul ao redor do feixe vascular corado com Azul de Alcian pH 1,0 (Fotomicrografia 6C) indica a presença discreta de polissacarídeos sulfatados nessa região. E a ausência dessa coloração azul na Fotomicrografia 6 D que apresenta um corte corado com Azul de Alcian em pH 2,0 indica a que esse tecido não apresenta polissacarídeos carboxilados. Não foram identificados polissacarídeos neutros na porção foliar desta espécie, quando corada com o ácido período de Schiff (Fotomicrografia 6 E e F).



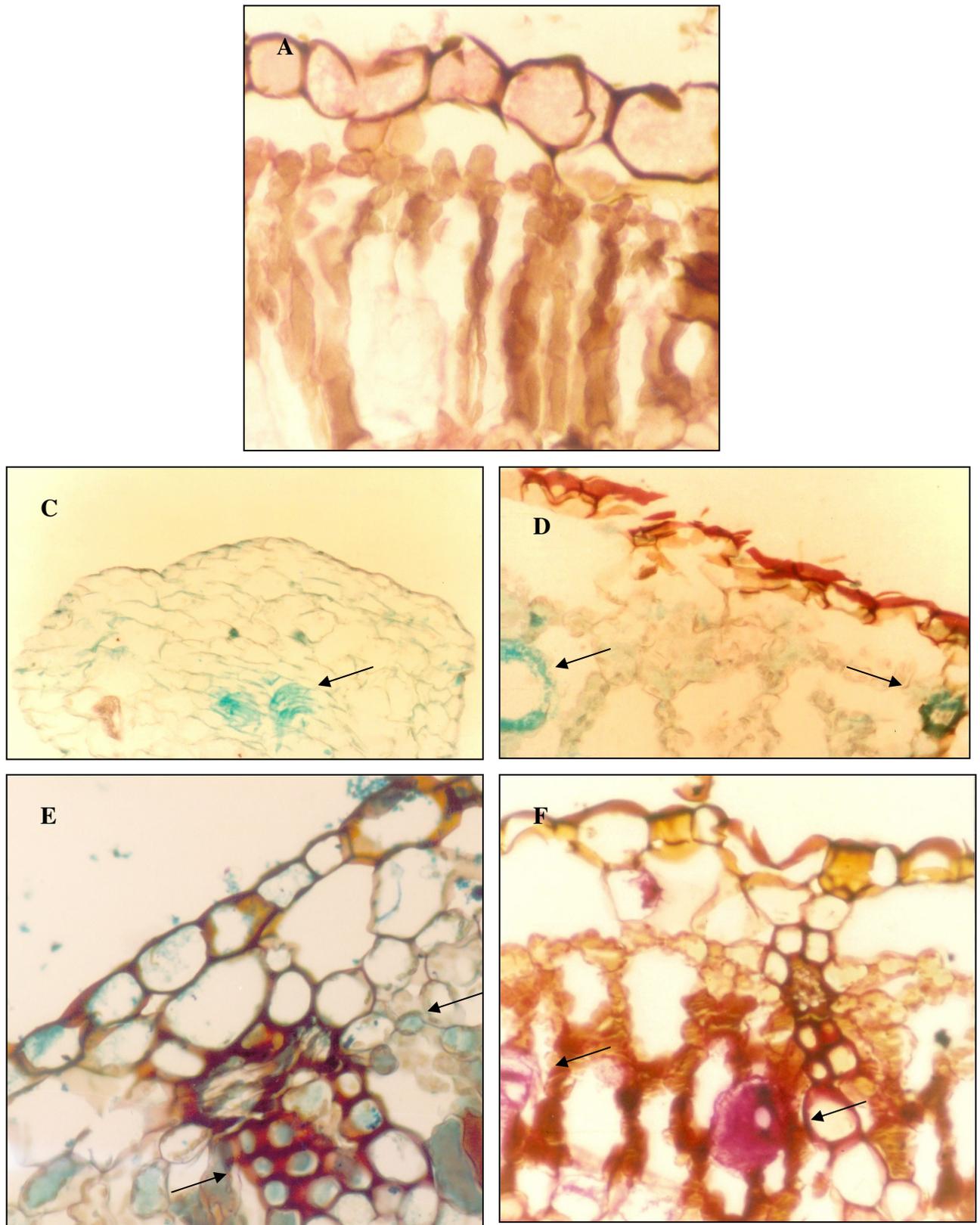
Fotomicrografia 6 - Folha de *Eleocharis interstincta* (Vahl) Roemer & J.A. Shultes. **A**-HE (200x); **B**-AT (200x); **C**-AApH1 (200x); **D**-AApH2 (200x); **E**-AAPAS (100x) e **F**-PAS (400x).

A raiz de *Salvinia auriculata* apresenta uma epiderme delgada composta por células pequenas e uniformes. Seu córtex é composto por células com tamanho semelhantes e volumes maiores do que as das células na epiderme (Fotomicrografia 7A). A coloração violácea presente no corte histológico da Fotomicrografia 7B indica a presença de polissacarídeos sulfatados em maior concentração na epiderme sendo este composto visível em todo o tecido vegetativo da raiz. A coloração azulada no cilindro vascular da Fotomicrografia 7C é característica de polissacarídeos sulfatados quando corados com Azul de Alcian pH 1,0 e essa mesma coloração em pH 2,0 no cilindro vascular da Fotomicrografia 7D indica a presença de polissacarídeos carboxilados. Os cortes histológicos corados com azul de alcian pH 1,0 e contracorados com ácido periódico de shiff indicando uma coloração azul para compostos sufatados (Fotomicrografia 7E), que são visíveis em torno do feixe vascular e em algumas porções da raiz.

A porção foliar de *Salvinia auriculata* apresenta uma epiderme delgada composta por uma camada de células alongadas, pequenas e uniformes. Seu córtex é composto por células com tamanho variados e perpendiculares a epiderme (Fotomicrografia 8A). A coloração azulada em torno a grupos de células isoladas (Fotomicrografia 8C) é característica de polissacarídeos sulfatados quando corados com Azul de Alcian pH 1,0 e essa mesma coloração em pH 2,0 na Fotomicrografia 8D indica a presença de polissacarídeos carboxilados. A Figura 28E foi obtida de cortes histológicos corados com Azul de Alcian pH 1,0 e contracorados com ácido periódico de Shiff indicando uma coloração azul para compostos sufatados, que são visíveis em alguns pontos associada a uma coloração vermelho-púrpura que indica polissacarídeos neutros que também podem ser identificado na Fotomicrografia 8F com mesma cor púrpura em alguns pontos.



Fotomicrografia 7 - Raiz de *Salvinia auriculata* Aublet. A-HE (200x); B-AT (200x); C-AApH1 (200x); D-AApH2 (200x) e E-AAPAS (100x).



Fotomicrografia 8 - Folha de *Salvinia auriculata* Aublet. A-HE (200x); C-AAph1 (200x); D-AAph2 (200x); E-AAPAS (100x) e F-PAS (400x).

Fatores Climatológicos

A temperatura do ar no período de coleta apresentou um valor superior à média do ano de 2004 que foi de 26,52°C (Tabela 3). A média da precipitação desse ano foi 204,05 mm/mês ficando seu valor inferior ao do mês de março onde foram feitas as coletas e a insolação desse mesmo mês foi de 248,20 hora/mês enquanto a média anual ficou em 241,07 (Tabela 3).

Tabela 3 - Fatores climatológicos, parâmetros ambientais, peso úmido e peso seco das macrófitas aquáticas *Eichhornia crassipes*, *Eleocharis interstincta* e *Salvinia auriculata*.

	<i>Eichhornia crassipes</i>	<i>Eleocharis interstincta</i>	<i>Salvinia auriculata</i>
Fatores climatológicos			
Temperatura do ar (°C)	27,40	27,40	27,40
Precipitação (mm/mês)	252,00	252,00	252,00
Insolação (hora/mês)	248,20	248,20	248,20
Parâmetros ambientais			
Temperatura da água (°C)	32,0	32,00	32,0
Salinidade(‰)	0,00	0,00	0,00
Peso Úmido (g)			
Raiz	100,00	100,00	100,00
Rizoma	100,00	-	-
Pecíolo	100,00	-	-
Folha	100,00	100,00	100,00
Peso Seco (g)			
Raiz	08,67	10,61	06,62
Rizoma	06,80	-	-
Pecíolo	06,81	-	-
Folha	13,53	21,81	04,13

Parâmetros Ambientais

A temperatura do riacho onde foram realizadas as coletas manteve-se em 32°C não apresentando nenhum grau de salinidade e volume constante de suas águas não havendo alteração no seu nível no decorrer dos experimentos.

Peso úmido e Seco

A massa do peso seco em *Eichhornia crassipes* apresentou valor máximo para sua porção foliar e valor mínimo para sua raiz tendo valores percentuais em relação ao peso em natura de 13,53% e 8,67%, respectivamente (Tabela 3). Já em *Eleocharis interstincta* a porção foliar apresentou um rendimento percentual de massa seca do vegetal de 21,81% em relação a massa úmida coletada dessa porção, o que não é semelhante em *Salvinia auriculata* que apresentou uma maior massa seca de tecido na raiz (Tabela 3).

Composição centesimal

Proteína Bruta

O conteúdo de proteína em *Eichhornia crassipes* apresentou um valor máximo de 13,89% na porção foliar e um valor mínimo no seu conteúdo de 08,86 (Tabela 4). Os valores encontrados para o conteúdo de proteínas totais para as porções vegetativas da *Salvinia auriculata* foram iguais atingindo um valor de 13,75. Esse valor foi semelhante ao encontrado para a porção foliar da *E. crassipes* e superior aos valores encontrados nas porções de *Eleocharis interstincta* que foram de 06,89% para raiz e 08,24% para sua porção foliar (Tabela 4).

Carboidratos

Os valores de carboidratos obtidos pela diferença na composição centesimal mostraram resultados mínimos para a porção foliar da *Eichhornia crassipes* (11,86%) e máximo para a porção foliar da *Eleocharis interstincta* (14,21%). De forma geral, as porções vegetativas apresentaram valores percentuais semelhantes para o carboidrato, apresentando um valor médio de 13% (Tabela 4).

Lipídios

Quanto à variação da percentagem lipídica, os valores percentuais mínimos e máximos registrados foram, respectivamente: 0,26% para a porção da raiz de *Salvinia auriculata* e 3,52% da porção foliar da mesma espécie (Tabela 4).

Fibra Bruta

Na análise de fibra bruta, *Eichhornia crassipes* apresentou valores semelhantes para todas as suas porções. Tal comportamento não se observou nos resultados de *Eleocharis interstincta* que apresentou o valor máximo na sua porção da raiz de 73,74% e com o valor mínimo na raiz de *S. auriculata* (47,71%) em relação aos vegetais analisados (Tabela 4).

Tabela 4 - Composição química das macrófitas aquáticas *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms., *Eleocharis interstincta* (Vahl) Roemer & J.A. Shultes e *Salvinia auriculata* Aublet.

	Carboidratos (%)	Cinzas (%)	Fibras (%)	Lipídios (%)	Nitrogênio (%)	Proteínas (%)	Umidade (%)
<i>E. crassipes</i>							
Raiz	13,59	14,61	60,09	01,11	01,46	09,14	91,33
Rizoma	13,67	13,65	60,83	01,57	01,42	08,86	93,20
Pecíolo	13,59	06,60	60,95	03,00	02,19	13,67	93,19
Folha	11,86	05,90	64,59	01,54	02,22	13,89	86,47
<i>E.interstincta</i>							
Raiz	13,86	03,07	73,74	01,34	01,10	06,89	89,39
Folha	14,21	05,54	69,62	01,07	01,32	08,24	78,19
<i>S. auriculata</i>							
Raiz	13,67	22,41	47,71	00,26	02,20	13,75	93,38
Folha	14,02	09,36	57,15	03,52	02,20	13,75	95,87

5 DISCUSSÃO

Para realização de análises envolvendo polissacarídeos sulfatados (PS) é necessário uma extração eficiente e que exclua os prováveis contaminantes. Existe uma diversidade de metodologias descritas na literatura que são utilizadas nos processos de extração e purificação de PS (KLOAREG E QUATRANO, 1988; BOISSON-VIDAL ET AL., 1995; BERTEAU; MULLOY, 2003; PEREIRA ET AL., 2005). Como não existe uma metodologia específica para a extração de PS de vegetais, utilizou-se uma metodologia descrita por Dietrich et al. (1985) que foi adaptada (ROCHA, 1998) para extração de PS de algas. Optou-se por essa metodologia por ela ter sido desenvolvida pelo nosso grupo e, por conseguinte já estar bem estabelecida para a nossa realidade tecnológica e econômica. Essa metodologia combina passos de purificação (proteólise, precipitação com metanol e cromatografias) com eletroforese em gel agarose em tampão PDA. A mesma tem como função principal atuar de ferramenta de monitoramento da identificação dos polissacarídeos sulfatados.

As análises químicas demonstraram presença do íon sulfato em seis das nove macrofitas estudadas (*Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms., *Egeria densa* Planch, *Eleocharis interstincta* (Vahl) Roemer & J.A. Shultes, *Hydrocotyle bonariensis* Comm. ex Lam., *Nymphaea ampla* (Salisb.) D.C. e *Salvinia auriculata* Aublet.). Para se verificar se esses estavam ligados covalentemente aos polissacarídeos dos vegetais, utilizou-se eletroforese em gel de agarose. Essa técnica confirmou a presença de PS em três macrófitas estudadas (*Eichhornia crassipes*, *Eleocharis interstincta* e *Salvinia auriculata*). Nessas macrófitas os PS foram encontrados em diferentes porções vegetativas, mas não em todas. A visualização de corridas eletroforéticas muito polidispersas, como aquela observada para os PS da raiz de *Eichhornia crassipes*, é indicativo da existência de mais de um grupo de PS no vegetal e conseqüentemente na porção analisada. A presença de PS de alta massa molecular também

pode ser observada, como no caso daqueles PS do pecíolo de *Eichhornia crassipes*, esses apresentaram uma baixa mobilidade eletroforética. Esses resultados indicam que uma planta pode sintetizar mais de um tipo de PS, e que porções diferentes do mesmo vegetal podem apresentar PS diferentes estruturalmente entre si. Esse fato não é inerente apenas macrófitas, ele também é muito comum em animais e algas. Fulgêncio et al. (2000) trabalhando com diferentes espécies de invertebrados, que representavam nove filos, observaram que mesmo os organismos mais simples apresentavam mais de um tipo de glicosaminoglicano (PS típicos de animais). Trabalhos que descrevem caracterização química de PS de algas marinhas mostram que esses organismos têm mais um tipo de polissacarídeo (KLOAREG; QUATRANO, 1988; BERTEAU; MULLOY, 2003; MATZUBARA, 2004). Nosso grupo tem demonstrado que algas marrons da classe Phaeophyceae apresentam três famílias de fucanas (PS típicos dessas algas) que foram denominadas de fucanas A, B e C (LEITE ET AL., 1998; ROCHA ET AL., 2001; ALBUQUERQUE ET AL., 2004, ROCHA ET AL., 2005; SILVA ET AL., 2005; ROCHA ET AL., 2006). Em algas, como nas macrófitas, os polissacarídeos podem diferir de acordo com a porção vegetativa de que foram extraídos. Dietrich et al., 1995 demonstraram que os PS dos folíolos, dos flutuadores e talos da alga *Sargassum vulgare* eram diferentes entre si, não com relação aos seus constituintes monossacarídeos, mas como também as suas massas moleculares eram diferentes.

A existência de polissacarídeos sulfatados também foi confirmada pelos espectros de infra-vermelho. Sinais nas regiões de 1271-1259 e 1255 - 1240 cm^{-1} indicam a presença de monossacarídeos sulfatados (YANG ET AL., 2005; SILVA ET AL., 2005).

A contaminação protéica é um grande problema durante a purificação de polissacarídeos sulfatados. Contudo, os resultados obtidos (mínimo de 0,8 % e máximo de 2,3 %) (Tabela 2) se mostraram inferiores aos observados na literatura para polissacarídeos de

algas. Esse fato é positivo para os PS de macrófitas, pois a contaminação protéica pode ser prejudicial quando da análise das atividades farmacológicas de PS.

A análise dos monossacarídeos indicou a presença de cinco açúcares predominantes em todas as soluções polissacarídicas avaliadas: galactose, glicose, arabinose, xilose e manose. A não presença de açúcares aminados, como glucosamina, demonstra que os PS das macrófitas estudadas não se assemelham com os glicosaminoglicanos. Por outro lado, a presença de vários monossacarídeos e a ausência de fucose faz com eles se assemelhem mais com os PS de algas verdes. Homopolissacarídeos de galactose ou galactanas (FARIAS, 2006) e de arabinose ou arabinanas, assim como a presença de heteropolissacarídeos contendo diferentes proporções de uns ou de todos esses cinco monossacarídeos já foram encontrados em algas verdes (MATZUBARA, 2004). Em todos os vegetais aqui estudados a galactose se mostrou como o principal constituinte, esse é um fato interessante, pois o único PS de macrófita que teve sua estrutura química analisada é uma galactana. Estudos posteriores deverão demonstrar se os PS dos vegetais estudados poderão ser homogalactanas ou heteropolissacarídeos.

Os resultados obtidos pelas técnicas histoquímicas demonstraram a presença de polissacarídeos em todas as porções vegetativas (Fotomicrografias 1 a 8). Dentre estas, a raiz de todos os vegetais foi o órgão em que a presença dos PS foi mais nítida. Dados semelhantes foram obtidos com *Ruppia marítima* (AQUINO ET AL., 2005). Foi sugerido que a presença desses PS na raiz dessa angiosperma marinha estaria associado às funções de absorção de nutrientes e controle osmótico de tecidos presentes na raiz e no rizoma em meio salino.

Com base nos dados aqui obtidos, não foi possível determinar a real função dos PS na raiz das macrófitas dulcícolas. Contudo, sua localização em torno dos feixes vasculares e do xilema, estruturas responsáveis por condução de nutrientes e água dos vegetais, dão indícios que também nesses vegetais os PS estariam envolvidos na absorção de nutrientes e água. A

presença dos PS na porção foliar não pode ser atribuída a uma função absorção. Em algas os PS possuem várias funções, dentre elas, é creditada a função de inibir a desidratação provocada pela radiação solar quando da maré baixa, esse atividade dos PS estaria relacionada com o seu alto poder higroscópico (KLOAREG; QUATRANO, 1988). É provável que nas porções foliares os PS estariam desempenhando a mesma função.

O resultado positivo na análise histoquímica para presença de PS nas porções do rizoma e folha de *Eichhornia crassipes* pode ser interpretado como contraditório para aquele verificado pela eletroforese. É possível essas duas porções apresentem em sua composição compostos que possam inibir a protease utilizada no passo de extração e/ou que os PS estejam presos numa rede intrincada de macromoléculas que fez com que esses não fossem extraídos do material. Acredita-se que a utilização de metodologias que se baseiam em princípios de extração diferentes dos utilizados nesse trabalho possa promover a extração dos PS dessas porções vegetativas.

A presença de PS em *Ruppia marítima* foi atribuída por Aquino et al. (2005), como uma resposta ao ambiente salino. Contudo, esse fator abiótico não foi determinante para a existência de PS nas macrófitas analisadas, pois não se detectou salinidade nas águas do riacho Água Quente.

Chadwick e Obeid (1966) demonstraram que um pH em torno de 8,3 não interfere no crescimento das espécies, o que pode ser constatado com o aumento da biomassa dos espécimes por eles estudados. Agami e Reddy (1990) concluíram que o pH entre 7,3 e 7,7 não causa supressão das macrófitas aquáticas, dentre elas *Eichhornia crassipes*. Os dados do riacho Água Quente mostram um pH em torno de 7,0, o que indica que esse fator abiótico não está discrepante do que seria esperado, e que, portanto ele pode não estar relacionado com a presença de PS nos vegetais estudados. Coletas de espécimes em ambientes que apresentem diferentes pHs possam responder essa questão. Contudo, a composição centesimal dos

Santos, N.D.

vegetais analisados nesse trabalho, como *Eichhornia crassipes*, se assemelha muito com aquela apresentada por outros trabalhos (HENRY-SILVA; CAMARGO, 2006; HENRY-SILVA; CAMARGO; PEZZATO, 2006). Esse fato pode indicar que a presença de PS nessas plantas não esteja diretamente relacionada com esses fatores abióticos.

A presença de polissacarídeos sulfatados em vegetais de água doce, anteriormente não relatado, pode estar associada à ativação de genes que transcrevem enzimas responsáveis pela sulfatação de polissacarídeos. Genes esses não estariam sendo expressos em ambiente terrestre, mais que o contato com o ambiente aquático por período prolongado teria ativado a expressão das sulfotransferases (enzimas responsáveis por sulfatação de polissacarídeos) que se encontravam inativas no ambiente terrestre.

A possível explicação para ocorrência de polissacarídeos sulfatados em macrófitas estaria na ativação das sulfotransferases que foram transferidas por diversos eventos não esclarecidos no transcorrer da evolução dos animais, plantas e fungos, fato já demonstrado para outros tipos de genes (CHO ET AL., 1998; GODDARD; BURT, 2000). Um ancestral comum do reino protista (como algas) possuidor de genes responsáveis pela transcrição de sulfotransferases pode ter transferido esse para um outro organismo do Reino Plantae no processo evolutivo. A conquista de novos ambientes, entre eles o terrestre, por organismos desse reino teria inibido esses genes. Essa explicação se torna plausível ao se observar o esquema filogenético (Figura 7) em que na mesma família gêneros apresentam polissacarídeos sulfatados e outros não. Esse fato evidencia que a expressão dos genes envolvidos com a sulfatação de polissacarídeos não estaria ligada ao estresse salino e /ou mesmo ao ambiente em que se encontram os organismos e sim a uma característica evolutiva de cada grupo de organismos.

Esses resultados descritos aqui foram inesperados, pois só há um relato da presença de PS em vegetais superiores (AQUINO ET AL., 2005), sendo esses de ambiente marinho.

Devido a esse fato, esperava-se que a identificação de polissacarídeos sulfatados em vegetais superiores, principalmente de ambiente dulcícola, exigisse uma coleta de uma grande variedade de espécies para se obter um resultado positivo. Contudo, não foi o que se observou, 33,33% das espécies coletadas foram positivas para a presença de PS.

Um detalhe importante a ser analisado é que muitas vezes vegetais de uma mesma espécie, que se desenvolvem em ambientes diferentes, podem sintetizar compostos em quantidades diferentes (VAN DER HEIJDEN ET AL., 2004) e/ou podem apresentar compostos em seus organismos que não são encontrados em seus correspondentes oriundos de outro ambiente. Portanto, a não existência de PS nas outras seis dulcícolas estudadas nesse trabalho pode não ser necessariamente uma verdade. Sendo assim, o percentual de vegetais positivos para PS encontrado nesse estudo, mais a possibilidade citada acima traz uma pergunta: Por que não se tem mais relatos da presença de PS em vegetais superiores? Talvez a resposta mais simples seja: porque até agora não existam estudos com esse objetivo. Espera-se que outros grupos de glicobiologistas venham se interessar sobre esse assunto e que em futuro não muito distante a descrição da presença de PS em vegetais superiores seja algo bem mais comum do que hoje.

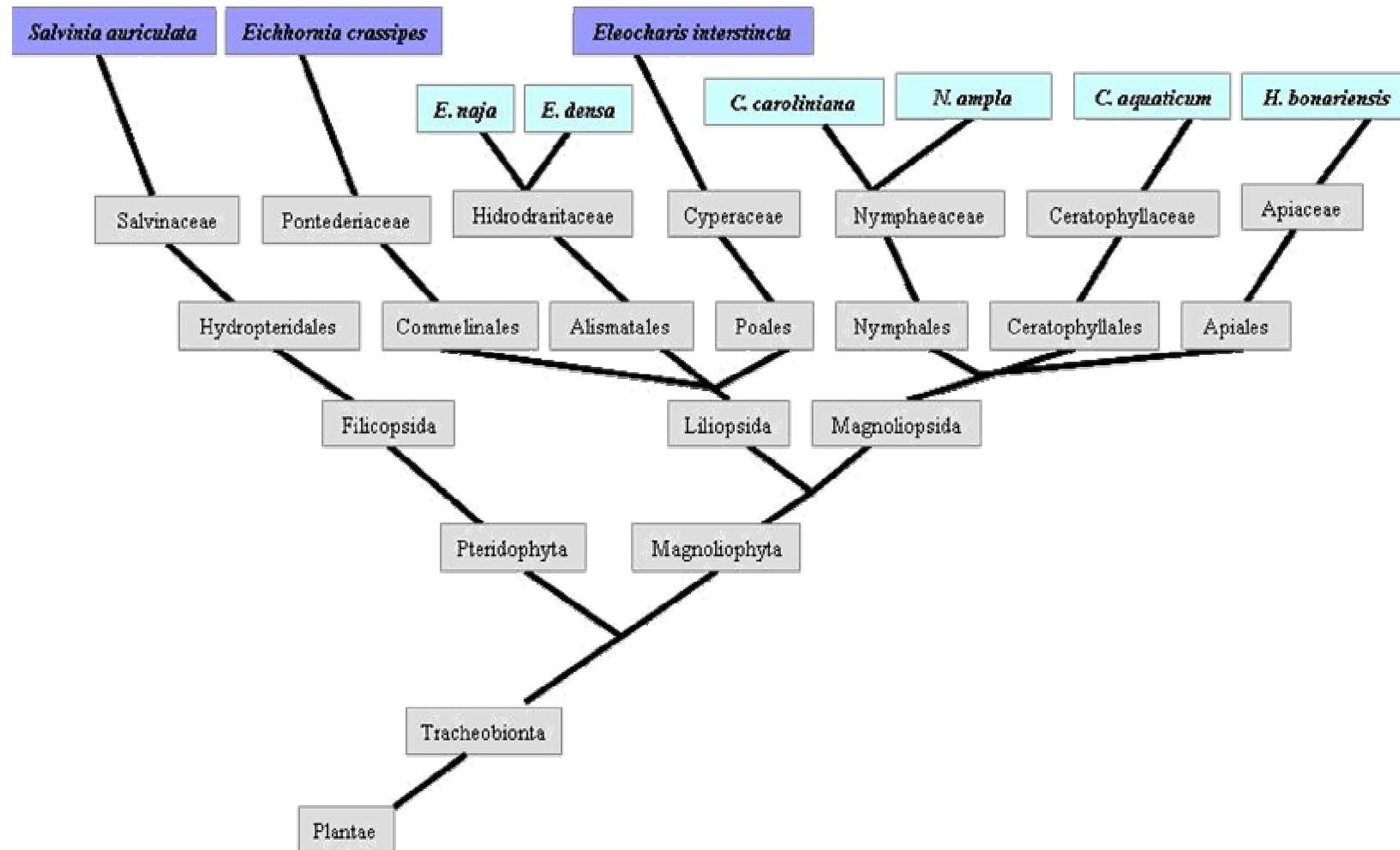


Figura 7 - Relação filogenética das macrófitas aquáticas e presença de polissacarídeos sulfatados.

6 CONCLUSÕES

Dos nove vegetais analisados somente três apresentaram polissacarídeos sulfatados;

Foram obtidas oito frações de polissacarídeos sulfatados das porções vegetativas de *Eichhornia crassipes*, *Eleocharis interstincta* e *Salvinia auriculata*;

Os principais monossacarídeos constituintes das frações de polissacarídeos sulfatados das macrófitas dulcícolas analisadas foram: Galactose, glicose, arabinose, xilose e manose;

Não existe correlação entre os fatores abióticos e a presença de polissacarídeos sulfatados nas espécies analisada;

Os polissacarídeos sulfatados foram encontrados nos tecidos de todas as porções vegetativas de *Eichhornia crassipes*, *Eleocharis interstincta* e *Salvinia auriculata*, porém em diferentes proporções.

7 REFERÊNCIAS

AGAMI, M.; REDDY, K.R. Competition for space between *Eichhornia crassipes* (Mart) Solms and *Pistia stratiotes* L. Cultured in nutrient-enriched water. **Aquatic Botany**, **38**, 195 - 208, 1990.

ALBUQUERQUE, I.R.L.; QUEIROZ, K.C.S.; ALVES, L.G.; SANTOS, E.A.; LEITE, E.L.; ROCHA, H.A.O. Heterofucans from *Dictyota menstrualis* have anticoagulant activity. **Braz. J. Med. Biol.** **37** (2), 167 - 171, 2004.

ALVES, A. P.; MULLOY, B.; DINIZ, J. A.; MOURÃO, P. A. S. Sulfated polysaccharides from the egg jelly layer are species-specific inducers of acrosomal reaction in sperms of sea urchins. **J. Biol. Chem.**, **272**, 6965-6971, 1997.

ALVES, L. G. **Polissacarídeos ácidos presentes no folíolo, talo e flutuador da alga marinha: *Sargasum vulgare***. (Dissertação Mestrado - Universidade Federal do Rio Grande do Norte-UFRN- Depto. de Bioquímica). 2000.

AMINI, A.; MOURANDI, A.; GIVERNAUD, T.; CHIADMI, N.; LAHAYE, M. Structure analysis of *Gigartina pistillata* carrageenans (Gigartinaceae, Rhodophyta). **Carbohydr. Res.**, **333**, 271- 279, 2001.

AOAC. **Official methods of analysis of the agriculture chemistry**. Washington, D.C.: Willian Horwitz, 1985.

AQUINO, R. S.; LANDEIRA-FERNANDES, A. M.; VALENTE, A. P.; ANDRADE, L. R.; MOURÃO, P. A. S. Occurrence of sulfated galactans in marine angiosperms: evolutionary implications. **Glycobiology**, **15**(1), 11-20, 2005.

ARAÚJO-LIMA, C.A.R.M.; GOULDING, M. ***So fruitful a fish***: ecology, conservation and aquaculture of the Amazon's tambaqui. New York: Columbia University Press. 1997.

BARBIERI, R. **Estudos da composição química de algumas espécies de macrófitas aquáticas e suas implicações no metabolismo da represa do Lobo (Broa)**. 1984. 221 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Recursos Naturais) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 1984.

BECKETT, D.C.; AATILA, T.P.; MILLER, A.C. Invertebrate abundance on *Potamogeton nodosus*, effects of plant surface area na condiction. **Can. J. Zool.** **70**, 300-306, 1992.

BEHMER, O.A.; TOLOSA, E.M.C.; F. NETO, A.G. **Manual de técnicas para histologia normal e patológica**. EDART, 1976.

BERNFIELD, M.; GÖTTE, M.; PARK, P. W.; REIZES, O.; FITZGERALD, M. L.; LINCECUM, J.; ZAKO, M. Functions of cell surface heparan sulfato proteoglycans. **Annu. Rev. Biochem.** **68**, 729-77, 1999.

BERTEAU, O.; MULLOY, B. Sulfated fucans, fresh perspectives: structures, functions, and biological properties of sulfated fucans and an overview of enzymes active toward this class of polysaccharide. **Glycobiology**, **13**, 29R-40R, 2003.

BOISSON-VIDAL, C.; HAROUN, F; ELLOUALI, M.; BLONDIN, C.; FISCHER, A. M.; AGOSTINI, A.; JOZEFONVICZ J. Biological activities of polysaccharides from marine algae. **Drugs Future**, **20**, 1237-1249, 1995.

CÁSSARO, C.M.F.; DIETRICH, C.P. Distribution of sulfated mucopolysaccharides in invertebrates. **J. Biol Chem.**, **252 (7)**, 2254-2261, 1977.

CHADWICK, M.J.; OBEID, M. A comparative and the growth of *Eichhornia crassipes* Solms and *Pistia stratiotes* L. in water-culture. **Journal og Ecology**, **54**, 563-575.

CHEVOLOT, L.; MULLOY, B.; RATISKOL, J.; FOUCAULT, A.; COLIEC-JOUAULT, S. A disaccharide repeat unit is the major structure in fucoidans from two species of brown algae. **Carbohydr. Res.**, **330**, 529-535, 2001.

CHO, Y., QIU, Y.-L., KUHLMAN, P., AND PALMER, J.D. Explosive invasion of plant mitochondria by a group I intron. **Proc. Natl Acad. Sci. USA**, **95**, 14244-14249, 1998.

COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L. **Introdução a métodos cromatográficos**. 3.ed. São Paulo: UNICAMP, 1998.

CRONSQUIST, A. **The evolution and classification of flowering plants**. New York: Columbia University Press. 1988.

CRUZ, W. O.; DIETRICH, C. P. Antihemostatic effect of heparin counteracted by adenosine triphosphate. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.** **126**, 420-426, 1967.

DA SILVA, C. J. et al. Composição química das principais espécies de macrófitas aquáticas do Lago Recreio Pantanal Matogrossense (MT). **R. Bras. Zootec.**, **54** (4), 617-622, 1994.

DIEHL, S.; EKLOV, P. Effects of piscivore-mediated *habitat* use on resources, diet and growth of perch. **Ecology**, Berlin, 76, 1712-1726, 1995.

DIETRICH, C. P. A model of cell growth mediated by sulfated glycosaminoglycans. **Braz. J. Med. Biol. Res.** **17**, 5-15, 1984.

DIETRICH, C. P.; FARIAS, G. G. M.; ABREU, L. R. D.; LEITE, E. L.; SILVA, L. F.; NADER H. B. A new approach for characterization of polysaccharides from algae: Presence of four main acidic polysaccharides in three species of the class Phaeophyceae. **Plant Sci.**, **108**, 143-153, 1995.

DIETRICH, C. P.; PAIVA, J.F.; MORAES, C.T.; TAKAHASHI, H.K.; PORCIONATTO, M.A.; NADER H. B. Isolation and characterization of a heparin with high anticoagulant activity from *Anomalocardia brasiliana*. **Biochem. Biophys. Acta.**, **843**, 1- 7, 1985.

DODGSON, K. S.; PRICE, R. G. A note on the determination of the ester sulphate content of sulphated polysaccharides. **Biochem. J.**, **84**, 106-110, 1962.

DORE, CELINA MARIA PINTO GUERRA. **Estudo de β -glucanas extraídas dos fungos *Geastrum saccatum* e *Polyporus dermatopus*: características químicas e atividades biológicas.** Dissertação (Mestrado) Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, UFRN, Natal, 2006.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars, and related substances. **Anal. Chem.**, **28**, 350-356, 1956.

FABRIS, F; LUZZATTO, G; STEFANI, P. M.; GIROLAMI, B.; CELLA, G.; GIROLAMI, A. Heparin-induced thrombocytopenia. **Haematologica**, **85**, 72-81, 2000.

FABRIS, F; LUZZATTO, G; STEFANI, P. M.; GIROLAMI, B.; CELLA, G.; GIROLAMI, A. Heparin-induced thrombocytopenia. **Haematologica**, **85**, 72-81, 2000.

FARIAS, E. H. C. **Análise comparativa da atividade anticoagulante de frações de polissacarídeos sulfatados das algas marinhas: *Caulerpa prolifera* e *Codium isthmocladium*.** Monografia (Bacharelado) - graduação em Ciências Biológicas, UFRN, Natal, 2005.

FARIAS, E. H. C. **Homogalactanas sulfatadas da alga *Codium isthocladum* com atividade anticoagulante**. Dissertação de Mestrado em Bioquímica - Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Natal-RN, 2006.

FARIAS, W.R.L.; VALENTE, A.P.; PEREIRA, M.S.; MOURÃO, P.A.S. Structure and anticoagulant activity of sulfated galactans. Isolation of a unique sulfated galactan from the red algae *Botryocladia occidentalis* and comparison of its anticoagulant action with that of sulfated galactans from invertebrates. **J. Biol. Chem.**, **275**, 29299-29307, 2000.

GALLAGHER, J. T. Heparan sulfate: growth control with a restricted sequence menu. **J. Clin. Invest.**, **108**, 357-361, 2001

GODDARD, M.R.; BURT, A. Recurrent invasion and extinction of a selfish gene. **Proc. Natl Acad. Sci. USA**, **96**, 13880-13885, 2000.

HAROUN-BOUHEDJA, F.; MOSTAFA, E.; SINQUIN, C; BOISSON-VIDAL, C. Relation between sulfato groups and biological activities of fucans. **Thromb. Res.** **100**, 453-459, 2000.

HAYAKAWA, Y.; HAYASHI, T.; LEE, J.B.; SRISOMPORN, P.; MAEDA, M.; OZAWA, T.; SAKURAGAWA, N. Inhibition of thrombin by sulfated polysaccharides isolated from green algae. 2000. **Bioch. Bioph. Acta**, **1543**, 86-94.

HENDERSON, P.A.; HAMILTON, H.F. Standing crop and distribution of fish in drifting and attached floating meadow within and Upper Amazonian varzea lake. **J. Fish. Biol.**, London, **47**, 266-276. 1995.

HENRY-SILVA, G.G.; CAMARGO, AF.M. Chemical composition of floating aquatic macrophytes used to treat of aquaculture wastewater. **Plant Daninha**, **24(01)**, 21-28, 2006.

HENRY-SILVA, G.G.; CAMARGO, AF.M; PEZZATO, L.E. Apparent digestibility of aquatic macrophytes by Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and water quality in relation nutrients concentrations. **R. Bras. Zootec.**, **35 (03)**, 641-647, 2006.

IOZZO, R.V. Matrix proteoglycans: From molecular design to cellular function. **Annu. Rev. Biochem.**, **67**, 609-652, 1998.

IRGANG, B. E.; GASTAL JR., C. V. DE S. **Macrófitas aquáticas da planície costeira do RS**. UFRGS: Porto Alegre, 1996.

JACKSON, G.L.; WINTER, J.T.S.; TAYLOR, K.H.; BURRELL, J.C.; DEBOO, C. M.; GREENFIELD, R. J.; GROEBNER, T.; HODAPP, K.; HOLTROP, E. A. ; LAZARUS, L. L.; LAO, S. I.; LIPPMANN, T. H.; OSBORNE, T. W.; PETRIE, J.; PHILLIPS, R.; JAMES, D. P.; SCHISSEL, E. J.; STRAIT, A. D.; TURNBULL, W. P. Regime of very high confinement in the boronized DIII-D Tokamak. **Phys. Rev. Lett.**, **67** (22) , 3098-3101, 1991.

JUNQUEIRA, LUIZ CARLOS UCHÔA; JUNQUEIRA, LUIZA MARIA M. SALLES. **Técnicas básicas de citologia e histologia**. 1.ed. São Paulo: Santos, 1983.

KARIYA, Y.; WATABE, S.; KYOGASHIMA, M.; ISHIHARA, M.; ISHII, T. Structure of fucose branches in the glycosaminoglycan from the body wall of the sea cucumber *Stichopus japonicus*. **Carboh. Res.**, **297**, 273-279, 1997.

KIM, Y. S.; JO, Y. Y.; CHANG, I. M.; TOIDA, T.; PARK, Y. M.; LINHARDT, R. J. A new glycosaminoglycan from African giant snail *Achatina fulica*. **J. Biol. Chem.**, **271**, 11750-11755, 1996.

KLOAREG, B.; QUATRANO, R. S. Structure of cell wall of marine algae and ecophysiological function of matrix polysaccharides. **Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Ver.**, **26**, 259-315, 1988.

KOLSET S.O.; SALMIVIRTA M. Cell surface heparan sulfate proteoglycans and lipoprotein metabolism. **Cell. Mol. Life Sci.**, **56**, 856-870, 1999.

LAHAYE, M . Developments on gelling algal galactans, their structure and physico-chemistry. **J. Appl. Phycol.**, **13**, 173–184, 2001.

LANDER, A. D.; SELLECK, S. B. The elusive functions of proteoglycans: in vivo veritas. **J. Cell. Biol.**, **349**, 227-232, 2000.

LEE, J. B.; HAYASHI, K.; MAEDA, M.; HAYASHI, T. Antiherpetic activities of sulfatod polysaccharides from green algae. **Planta Med.**, **70**, 2004.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**. 2.ed. São Paulo: Sarvier, 1995.

LEITE, E. L.; MEDEIROS, M. G. L.; ROCHA, H. A. O.; FARIAS, G. G. M.; SILVA, L. F.; CHAVANTE, S. F.; DIETRICH, C. P.; NADER, H. B. Structure of a new fucan from the algae *Spatoglossum schröderi*. **Plant Sci.**, **132**, 215-228, 1998.

LUNA, L.G. **Manual of histologic staining methods of Armed Forces Institute of Pathology**. 3. ed. New York: McGraw-Hill, 1968.

MACÊDO, NÉA ANDRADE DE. **Manual de técnicas em histologia vegetal**. Feira de Santana: Universidade Estadual de Feira de Santana, 1997.

MARINHO-SORIANO, E.; FONSECA, P.C.; CARNEIRO, M.A.A.; MOREIRA, W.S.C. Seasonal variation in the chemical composition of two tropical seaweeds. **Bioresource Technology**, **97**, 2402-2406, 2006.

MATSUBARA, K. Recent advances in marine algal anticoagulants. **Curr Med Chem Cardiovasc Hematol Agents**, **2(1)**, 13-9, 2004.

MC CULLY, M.E. A note on the structure of the cell wall of the brown alga *Fucus*. **Can. J. Bot.**, **43**, 1001-1004, 1965.

MEDEIROS, G. F.; MENDES, A.; CASTRO, R. A. B.; BAÚ, E. C.; NADER, H. B.; DIETRICH, C. P. Distribution of sulfated glycosaminoglycans in the animal kingdom: widespread occurrence of heparin-like compounds in invertebrates. **Biochem. Biophys. Acta**, **1475**, 1-8, 2000.

MEYER, K. The chemistry and biology of mucopolysaccharides and glycoproteins. **Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.** **6**, 91-102, 1938.

MOURANDI-GIVERNAUD, A.; GIVERNAUD, T.; MORVAN, H.; COSSON, J. Annual variations of the biochemical composition of *Gelidium latifolium* (greville) Thuret et Bornet. **Hydrobiologia**, **260/261**, 607-612, 1993.

MOURÃO, P. A. S.; PEREIRA, M. P.; PAVÃO, M. S. G.; MULLOY, B.; TOLLEFSEN, D. M.; MOWINCKEL, M.; ABILDGAARD, U. Structure and anticoagulant activity of a fucosylated chondroitin sulfato form echinoderm. **J. Biol. Chem.**, **271**, 23973-23984, 1996.

NADER, H. B.; PINHAL, M. A. S.; BAÚ, E. C.; CASTRO, R. A. B.; MEDEIROS, G. F.; CHAVANTE, S. F.; LEITE, E. L.; TRINDADE, E. S.; SHINJO, S. K.; ROCHA, H. A. O.; TERSARIOL, I. L. S.; MENDES, A.; DIETRICH, C. P. Development of new heparin-like compounds and other antithrombotic drugs and their interaction with vascular endothelial cells. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, **34**, 699-709, 2001.

NADER, H. B.; TOMA, L.; PINHAL, M. A. S.; BUONASSISI, V.; COLBURN, P.; DIETRICH, C.P. Effect of heparin and dextran sulfato on the synthesis and structure of heparan sulfato from cultured endothelial cell. **Semin. Thromb. Hemost.**, **17**, 47-56, 1991.

NADER, H.B.; DIETRICH, C. P.; BUONASSISI, V.; COLBURN, P. - Heparin sequences in heparan sulfato chains of and endothelial cell proteoglycan. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, **84**, 3565-3569, 1987.

NEWTON, D.J.; SCOTT, J. E; WHITEMAN, P. The estimation of acid glycosaminoglycan: alcian blue complexes eluted from eletrophoretic strips. **Anal. Biochem.**, **62**, 268-273, 1974.

PAINTER, T.D. Anticoagulation. Current approach to heparin and warfarin therapy. **Postgrad Med.**, **74(3)**, 341-5, 348, 350, 1983.

PERCIVAL, E. G. V.; MAC DOWELL, R. H. Chemistry and enzymology of marine algal polysaccharides. London: **Academic Press**, 219, 1967.

PEREIRA, M.G., BENEVIDES, N.M., MELO, M.R., VALENTE, A.P., MELO, F.R., MOURAO P.A. Structure and anticoagulant activity of a sulfated galactan from the red alga, *Gelidium crinale*. Is there a specific structural requirement for the anticoagulant action? **Carbohydr Res.**, **340(12)**, 2015-23. 2005.

PINDER, L.C.V. Biology of Freshwater Chironomidae. **Ann. Rev. Entomol.** **31**:1-23, 1986.
PORCIONATTO, M. A.; NADER, H. B.; DIETRICH, C. P. Heparan sulfate and cell division. **Braz. J. Med. Biol. Res.** **32**, 539-544, 1999.

PROPHET, E. B.; MILLS, B.; ARRINGTON, J.B.; SOBIN, L.H. **Labotaroty methods in histtechnology**. Armed Forces Institute of Pathology. American Registry of Pathology. Washigton, D. C. 1992. 257p.

RAVEN, PETER H.; EVERT, RAY F.; EICHHORN, SUSAN E. **Biologia vegetal**. 6. ed. Rio de Janeiro: Koogan, 2001.

REYERS, I.; MUSSONI, L.; DONATI, M. B.; DE GAETANO. Venous thrombosis induced by ligation of inferior vena cava. **Thromb. Res.**, **18**, 669- 674, 1980.

RIBEIRO, A. C.; VIEIRA, P. R.; MOURÃO, P. A. S.; MULLOY, B. A sulfated α -L-fucan from sea cucumber. **Carbohydr. Res.**, **225**, 225-240, 1994.

ROCHA, H. A. O. **Extração e purificação de uma fucana da alga marinha *Spatoglossum schröderi***. Dissertação de Mestrado em Bioquímica - Universidade Federal de São Paulo. São Paulo-SP, 1998.

ROCHA, H.A.; LEITE, E.L.; MEDEIROS, V.P.; LOPES, C.C.; NASCIMENTO, F.D.; TERSARIOL, I.L.S.; SAMPAIO, L.O.; NADER, H.B. Natural sulfated polysaccharides as antithrombotic compounds. Structural characteristics and effects on the coagulation cascade. In **Carbohydrate Structure and Biological Function**. Kerala: Transworld Research Network, 2006.

ROCHA, H.A.O. **Caracterização de uma fucana da alga *Spatoglossum schröderi* e análise de suas atividades anti-adesiva, antimigratória, antiproliferativa e antitrombótica**. (Tese Doutorado-Universidade Federal de São Paulo-UNIFESP- Depto. de Bioquímica). 2002.

ROCHA, H.A.O.; BEZERRA, L.C.; ALBUQUERQUE, I.R.L.; COSTA, L.S.; GUERRA, C.M.; ABREU, L.D.; NADER, H.B.; LEITE, E.L. A xylogalactofucan from the brown seaweed *Spatoglossum schroederi* stimulates the synthesis of an antithrombotic heparan sulfate from endothelial. **Planta Med.**, **71(4)**, 379-81, 2005. (b)

ROCHA, H.A.O.; FRANCO, C.R.C.; TRINDADE, E.S.; CARVALHO, L.C.M.; VEIGA, S.S.; LEITE, E.L.; DIETRICH, C.P.; NADER, H.B. A fucan from the brown seaweed *Spatoglossum schroederi* inhibits chinese hamster ovary cell adhesion to several extracellular matrix proteins. **Braz. J. Med. Biol.**, **34**, 621- 6. 2001.

ROCHA, H.A.O.; MORAES, F.A.; TRINDADE, E.S.; FRANCO, C.R.C.; TORQUATO, R.J.S.; VEIGA, S.S.; VALENTE, A.P.; MOURÃO, P.A.; LEITE, E.L.; NADER, H.B.; DIETRICH, C.P. Structural and haemostatic activities of a sulfated galactofucan from the brown alga *Spatoglossum schroederi*. An ideal antithrombotic agent?. **J. Biol Chem.** 2005. (a)

ROE, J. H. The determination of sugar in blood and special fluids with anthrone reagent. **J. Biol. Chem.**, **212**, 335-343, 1955.

RUPEREZ, P.; AHRAZEM, O; LEAL, J. A. Potential antioxidant capacity of sulfated polysaccharides from the edible marine brown seaweed *Fucus vesiculosus*. **J. Agric. Food Chem.**, **50** (4), 840-845, 2002.

SÁNCHEZ-BOTERO, J.I.; ARAUJO-LIMA, C.A.R.M. As macrófitas aquáticas como berçário para a ictiofauna da várzea do rio Amazonas. **Acta Amazonica**, Manaus, 31 (3), 37-447, 2001.

SANDERSON, R. D. Heparan sulfato proteoglycan in invasion and metastasis. **Sem. Cell. Develop. Biol.**, **12**, 89-98, 2001.

SCHAEFFER, D. J.; KRYLOV, V. S. Anti-HIV activity of extracts and compounds from algae and cyanobacteria. **Ecotoxicol. Enviro. Safety** **45**, 208-227, 2000.

SHIBATA, H.; NAGAOKA, M.; TAKEUCHI, Y.; TAKAGI, I.; HASHIMOTO, S.; UEYAMAMA, S.; YOKOKURA, T. Anti-ulcer effect of fucoidan from brown seaweed *Cladosiphon okamuranus* Tokida. **Jpn. Pharmacol.**, **26**, 1211-1215, 1998.

SIDDHANTA, A.K., SHANMUGAM, M., MODY, K.H., GOSWAMI, A.M., RAMAVAT, B.K. Sulphated polysaccharides of *Codium dwarkense* Boergs. from the west coast of India: chemical composition and blood anticoagulant activity. **Int J Biol Macromol.**, **26**(2-3), 151-4. 1999.

SILVA, T.M.A.; ALVES, L.G.; QUEIROZ, K.C.S.; SANTOS, M.G.L.; MARQUES, C.T.; CHAVANTE, S.F.; ROCHA, H.A.O.; LEITE, E.L. Partial characterization and anticoagulant activity of a heterofucan from the brow seaweed *Padina gymnospora*. **Braz. J. Med. Biol. Res.** **18**, 523-533, 2005.

SOEDA, S.; KOZAKO T.; IWATA K.; SHIMENO H. Oversulfated fucoidan inhibits the basic fibroblast growth factor-induced tube formation by human umbilical vein endothelial cells: its possible mechanism of action. **Biochem. Biophys. Acta.**, **1497**, 127-134, 2000.

SPECTOR, J. Refinement of the coomassie blue method of protein quantification. A simple and linear spectrophotometric assay of 0.5 to 50µg of protein. **Anal. Biochem.**, **86**, 142-143, 1978.

STORTZ, C.A.; CERESO, A.S. Room temperature, low-field ^{13}C -n.m.r. spectra of degraded kappa/iota carrageenans. **Int. J. Bio. Macromol.**, **13** (2), 10-4, 1991.

SUGAHARA, K. & KITAGAWA, H. Recent advances in the study of the biosynthesis and functions of sulfated glycosaminoglycans. **Curr. Opin. Struct. Biol.**, **10**, 518-527, 2000.

TOMA, L.; DIETRICH, C. P.; NADER, H. B. Differences in the non-reducing ends of heparan sulfatos excreted by patients with mucopolysaccharidoses revealed by bacterial heparitinases: A new tool for structural studies and differential diagnosis of Sanfilippo's and Hunter's syndromes. **Laboratory Investigations** **75**, 771-781, 1996.

TREVELYAN, W. E.; PROCTER, D.P.; HARRISON, J. S. Detection of sugars on paper chromatograms. **Nature**, **166**, 444 - 445, 1950.

VAN DER HEIJDEN, R.; JACOBS, D.; SNOEIJER, W.; VERPOORTE, R. The Catharanthus alkaloids: pharmacognosy and biotechnology. **Curr. Med. Chem.**, **11**, 607-628, 2004.

VILELA-SILVA, E. S. A.; CASTRO, M. O.; VALENTE, A. P.; BIERMANN, H. C.; MOURÃO, P. A. S. Sulfated fucans from the egg jellies of the closely related sea urchins *Strongylocentrotus droebachiensis* and *Strongylocentrotus pallidus* ensure species-specific fertilization. **J. Biol. Chem.**, **277**, 379-387, 2002.

WEANER, J. E.; CLEMENTS, F. E. **Plant Ecology**. New York: Mc.Graw Hill, 1983.

WEITZ, J. New anticoagulant strategies. Current status and future potentials. **Drugs**, **48** (4), 485-497, 1994.

WETZEL, R. G. **Limnologia**. 2.ed. Lisboa: Saunders College Publishing, 1993.

YANG, JIANHOG; DU, YUMIN; HUANG, RONGHUA; WAN, YUNYANG; WEN, YAN. The structure-anticoagulant activity relationships of sulfated lacquer polysaccharide effect of carboxyl group and position of sulfation. **Biol. Macromolecules**, **36**, 09-15, 2005.

ZHANG, QUANBIN; LI, NING; LIU, XIGUANG; ZHAO, ZENGQIN; LI, ZHIEN; XU, ZUHONG. The structure of a sulfated galactan from *Porphyra haitanensis* and its in vivo antioxidant activity. **Carbohydr. Res.**, **339**, 105 - 111, 2004.

ZHANG, QUANBIN; QI, HUIMIN; ZHAO, TINGTING; DESLANDES, ERIC; ISMAELI, NINASAYAELI MBISE; MOLLOY, F.; CRITCHLEY, ALN T. Chemical characteristics of a polysaccharides from *Porphyra capensis* (Rhodophyta). **Carbohydr. Res.**, 01-04, 2005.

ZVYAGINTESEVA, T. N.; SHEVCHENKO, N. M.; NAZAROVA, I. V.; SCOBUN, A. S.; LUKYANOV, P. A.; ELYAKOVA L. A. Inhibition of complement activation by water-soluble polysaccharides of some far-eastern brown seaweeds. **Comp. Biochem. Physi.** 2000.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)