



# **Relação entre a localização intracelular de metabólitos secundários e suas múltiplas funções em macroalgas marinhas**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Morfológicas do Instituto de Ciências Biomédicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro como pré-requisito para obtenção do grau de Doutor em Ciências.

Orientadores: Dr. Gilberto Menezes Amado Filho e Dr. Marcos Farina de Souza

**Leonardo Tavares Salgado**

**2007**

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

Salgado, Leonardo Tavares

Relação entre a localização intracelular de metabólitos secundários e suas múltiplas funções em macroalgas marinhas / Leonardo Tavares Salgado. Rio de Janeiro, 2007.

XIV, 161 p.

Tese (Doutorado em Ciências Morfológicas)  
Universidade Federal do Rio de Janeiro,  
Instituto de Ciências Biomédicas.

Orientadores: Gilberto Menezes Amado Filho  
Marcos Farina de Souza

1. Compostos fenólicos. 2. Parede celular 3. Compostos halogenados 4. Corpos em cereja 5. Laurencia I.Título

Este trabalho foi realizado sob a orientação do Dr. Gilberto Menezes Amado Filho, do Programa Zona Costeira do Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, e do Dr. Marcos Farina de Souza, do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal do Rio de Janeiro, no período de junho de 2003 a maio de 2007. Contamos com o apoio financeiro da CAPES, CNPq, FAPERJ, JBRJ/MMA e PRONEX. Esta tese foi desenvolvida nos seguintes laboratórios:

- Laboratório de Biomineralização, ICB, UFRJ;
- Laboratório de Ultraestrutura Celular Hertha Meyer, IBCCF, UFRJ;
- Laboratório de Pinças Ópticas, ICB/COPEA, UFRJ;
- Laboratório de Cultivo de Algas, Inst. de Pesquisas JBRJ;
- Laboratório de Tecido Conjuntivo, IBQm, UFRJ;
- Laboratório de Ecofisiologia e Toxicologia de Cianobactérias, IBCCF, UFRJ;

A meu pai, pelo amor, apoio e incentivo constante. A minha mãe (*in memoriam*), pelos ensinamentos e pelo carinho e amor que dedicou a mim. A Miria, pelo companheirismo, amor e compreensão. Amo todos vocês!

## AGRADECIMENTOS

Nesta parte da tese, temos total liberdade para escrever. A felicidade de poder registrar no papel o carinho e a gratidão para as pessoas é incomensurável. É claro que também é um momento de grande responsabilidade, pois não se pode deixar ninguém de fora! Mas o importante, é que todos aqueles que me ajudaram de alguma forma neste período saibam que lhes sou muito grato pela contribuição nesta etapa tão importante da minha vida!

Ao meu pai, meu “orientador” predileto. Uma pessoa especial e um exemplo de vida pra mim! Pode ter certeza que nunca me faltou nada. Obrigado pelo apoio e pelas palavras incentivadoras e animadoras. Agradeço por todo seu amor, carinho e esforço em me fazer feliz e realizado!

A Miria, uma companheira compreensiva, amorosa e meiga que me faz muito feliz! Mas, além disso, também pelo exemplo de persistência e dedicação no trabalho, o qual foi me contagiando ao longo do tempo. Sem dúvida nenhuma amadureci muito depois que a encontrei. Minha querida, obrigado!

Gostaria de agradecer muito ao Dr. Gilberto Amado Filho. Seria injusto mencionar apenas o período do doutorado. Desde que me tornei seu aluno na iniciação científica, em 1998, Gilberto foi se transformando em um grande amigo. Além da amizade, foi capaz de ajudar muito na minha formação profissional. Se por um lado, eu considero que ainda me falta muito caminho para trilhar e muita coisa para aprender, por outro lado, sei que o tanto que evolui e melhorei durante este tempo, se deve muito ao apoio, a cobrança e ao incentivo que dedicou a mim!

Outro grande exemplo profissional para mim foi o meu também orientador, Dr. Marcos Farina. Um exemplo de profissional em que procuro me espelhar. Um exemplo de ética e determinação. Farina, sinceramente, me faltam palavras para agradecer toda a sua ajuda e orientação em todo meu caminho científico e, em especial, durante esta tese. Obrigado pela sua grande contribuição!

Ao Prof. Paulo Mourão, pela receptividade em seu laboratório, onde foram obtidos muitos resultados desta tese.

Ao Leonardo Cinelli, amigo das horas vagas, e um doutorando exemplar que me ajudou muito para que esta tese saísse do papel.

Ao Prof. Nathan Viana pela excelente ajuda com a pinça óptica e com a vídeo-microscopia. E nas horas vagas, também pela amizade e pelos bons momentos de prosa.

Ao Prof. Renato Crespo, pela ajuda com o estudo dos metabólitos secundários das algas vermelhas. Também pelas boas discussões e sugestões.

Ao Prof. Leonardo Andrade pela revisão da tese. Mas principalmente, porque me ajudou muito no início e continua me ajudando até hoje. Vivemos muitas coisas parecidas, mas sabemos que no fim as coisas acabam se acertando. Leo, você é um amigo muito especial!

A Prof. Mariana Sá Pereira e ao Fábio que me ajudaram no início da tese.

À Prof. Valéria Teixeira, pela presteza em me ajudar com a análise dos florotraninos.

Aos Profs. Márcio e Leonardo do Instituto de Microbiologia, que no início da tese me ajudaram muito com o plano 'A' e com a produção de anti-corpos.

Ao meu irmão Miguel, que sempre me incentivou e valorizou a minha escolha profissional! Também por todo o carinho e amizade! A minha cunhada Irene, pelo afeto e amizade. Ao meu sobrinho Thiago, pelas horas de alegria e pela sua ternura!

A minha irmã Betinha e ao meu cunhado Luiz. As minhas sobrinhas Isabela e Geovana. Ao Marcelo também (maior figura). Aos meus compadres Alexandre (também meu sobrinho) e Catarina, e a minha linda afilhada Alicia!

A minha família postiça, Edílson, Lúcia, Fernanda, Vinicius e Funf (hehehe). Obrigado pelo carinho de todos vocês!

Aos meus grandes amigos que também considero a minha família! Ao Hugo, meu camarada com quem sempre pude contar. Ao Gabriel (violinista de mão cheia), ao Fabiano (sem palavras), ao Tatu (amigo em todas as horas), a Júlia, ao Bernardo e a Érica (amiga emprestada da Miria e futura comadre).

A todo o pessoal do Laboratório de Biomineralização (inclusive os que já saíram). A Mair (grande coração), ao Rodrigo (ajuda fundamental), ao Valladão, ao Euler, ao Fernando (um grande batalhador), a Carol, a Raquel, a Paula (dentista maluquinha), ao Renato (um abraço pra você aí em cima), ao Edison, a Sueli, a Réia, ao Daniel e a Flávia.

A todo o pessoal do Jardim Botânico, Renata, Denise, Bia, Claudinha, Ritinha, Ricardo, Poly, Bianca, Wladimir, etc.

Aos meus ex-colegas de Departamento de Biologia Celular da UFF, pelo período em que fui professor de Bio Cel e que me ajudou muito a abrir meus horizontes e ampliar as minhas perspectivas. Aos meus ex-alunos, pela grata experiência de lhes dar aula e pelo aprendizado.

A Prof. Valéria do Laboratório de Ecotoxicologia de Cianobactérias do IBCCF, por disponibilizar o espectrofotômetro para que eu pudesse analisar meus compostos fenólicos.

A Prof. Vivian do IBCCF, pela disponibilidade em me ajudar e me aconselhar. E pelas excelentes sugestões a respeito do desenvolvimento desta tese.

A todos os amigos da Miria que acabaram tornando-se meus amigos também.

A todos os professores e alunos dos laboratórios Hertha Meyer, de Tecido Conjuntivo e de Radioisótopos. Em todos esses lugares, sempre que precisei fui ajudado com toda a boa vontade. Sou muito grato a todos.

Ao laboratório Hertha Meyer pelo uso das facilidades de Microscopia eletrônica.

A galera do extinto Departamento de Anatomia com quem sempre troquei idéias: Fábio, Bruno, Suzana, Luciana, Tânia, Tércia, Rossana, Dudu, Sheila, etc.

Ao alunos da pós-graduação e ao PCM pelo aprendizado no período em que fui representante discente da pós-graduação.

Agradeço a Deus por tudo isso.

## RESUMO

Neste trabalho são analisados aspectos da biologia celular de metabólitos secundários sintetizados por algas marinhas. Através de técnicas de estudo como microscopia de fluorescência, pinças óticas, microscopia eletrônica, videomicroscopia, cromatografia, RMN e EDXA são analisadas as interações entre compostos fenólicos e polissacarídeos de algas pardas e também a localização e o transporte intracelular de compostos halogenados na alga vermelha *Laurencia*. Demonstrou-se que os compostos fenólicos estabelecem ligações específicas com alginatos e que este processo é mediado pelas enzimas bromoperoxidases. A formação da parede celular, a acumulação de metais pesados e a absorção de radiação UV são eventos dependentes da interação entre estas moléculas. Em *Laurencia*, observou-se que os compostos halogenados encontram-se em organelas denominadas corpos em cereja e são exudados a partir de conexões tubulares para a periferia celular, e que a morte celular também pode estar relacionada ao processo de defesa química, visto que resulta na liberação de elevadas quantidades de metabólitos para a superfície do talo.

## ABSTRACT

In this work, it is analysed some aspects about cell biology of secondary metabolites synthesized by marine algae. Through techniques as fluorescence and electron microscopies, optical tweezers, video-microscopy, chromatography, NMR and EDXA it were analysed the interactions between phenolic compounds and polysaccharides from brown algae and also the intra-cellular localisation and distribution of halogenated compounds in the red alga *Laurencia*. It was showed that phenolic compounds establish specific linkages with alginates and that this process is mediated by bromoperoxidases enzymes. The cell walls formation, the heavy metals accumulation and the UV radiation absorption are events that depend on the interactions between these molecules. In *Laurencia*, it was observed that halogenated compounds are found inside the organelles named cherry bodies and are exuded from tubular connections to the cell periphery, and that cell death can be related to chemical defense process, since it results on the liberation of high quantities of metabolites to the thallus surface.

# ÍNDICE

## Introdução

1. Algas Marinhas	2
2. O metabolismo secundário	4
3. O metabolismo secundário em algas pardas	5
3.1. Interações entre os compostos fenólicos e os polissacarídeos	5
3.1.1. A absorção de metais pesados pelas algas pardas	6
3.1.2. A absorção da radiação solar ultravioleta em algas pardas	7
3.1.3. A mineralização do carbonato de cálcio em algas pardas	8
3.1.4. A formação da parede celular em algas pardas	10
3.1.4.1. A parede celular de algas pardas	10
3.1.4.2. Compostos fenólicos e alginatos	13
3.1.4.3. As haloperoxidases, os compostos fenólicos e os alginatos	14
3.2. Questionamentos sobre metabolismo secundário em algas pardas	15
4. O metabolismo secundário em algas vermelhas	17
4.1. Defesa química, herbivoria e epibiose	17
4.2. Localização subcelular dos compostos halogenados	18
4.3. Transporte intracelular dos compostos halogenados	20
4.4. Questionamentos sobre metabolismo secundário em algas vermelhas	21
5. Aplicações tecnológicas de metabólitos secundários	22
5.1. Compostos fenólicos	22
5.2. Compostos halogenados	22

## Objetivos

6. Geral	25
7. Específicos	26

## Materiais e Métodos

8. Coleta das algas	29
9. Experimentos com algas pardas	30
9.1. Microscopias óptica e eletrônica	30
9.1.1. Preparação do tecido de <i>P. gymnospora</i> para microscopias óptica e eletrônica	30
9.1.2. Microscopia óptica de fluorescência de <i>P. gymnospora</i>	31
9.1.2.1. Localização tecidual dos compostos fenólicos	31
9.1.2.2. Localização tecidual de monossacarídeos constituintes das fucanas	31
9.1.3. Microscopia eletrônica de transmissão de <i>P. gymnospora</i>	32
9.1.3.1. Localização subcelular de monossacarídeos constituintes das fucanas	32
9.1.3.2. Microanálise de raios-X (EDXA)	32
9.2. Isolamento e caracterização de moléculas	34
9.2.1. Compostos fenólicos de <i>P. gymnospora</i>	34
9.2.1.1. Protocolo de extração	34
9.2.1.2. Purificação e caracterização	34
9.2.2. Polissacarídeos de <i>P. gymnospora</i>	35
9.2.2.1. Protocolo de extração	35
9.2.2.2. Purificação das amostras	36
9.2.2.3. Caracterização das amostras	36

9.2.3. Alginato de <i>Fucus vesiculosus</i>	37
9.2.3.1. Purificação da amostra	37
9.2.3.2. Caracterização das amostras	37
9.3. Absorção de UV por compostos fenólicos	38
9.3.1. Cromatografia de separação por peso molecular	38
9.3.2. Ensaios de absorção de UV pelos compostos fenólicos	38
9.3.3. Influência do pH na capacidade de absorção de UV pelos compostos fenólicos	39
9.4. Mineralização e compostos fenólicos	40
9.5. Interações entre compostos fenólicos e alginatos	41
9.5.1. A enzima VBPO e a ligação entre compostos fenólicos e alginatos	41
9.5.1.1. Amostras analisadas	41
9.5.1.2. Formação de complexos de alto peso molecular compostos por FC e ALG	41
9.5.1.3. Medidas de viscosidade de soluções contendo alginato através da avaliação do movimento Browniano utilizando o microscópio de pinças ópticas	42
10. Experimentos com algas vermelhas	46
10.1. Microscopias óptica e eletrônica	46
10.1.1. Microscopia óptica	46
10.1.1.1. Caracterização estrutural	46
10.1.1.2. Microscopia óptica de fluorescência	46
10.1.1.3. Microscopia de pinças ópticas	47
10.1.2. Microscopia eletrônica	47
10.2. Isolamento dos corpos em cereja	47
10.3. Micro-análise de raios-X dos corpos em cereja	48
10.4. Vídeo-microscopia	48
10.5. Reconstrução tri-dimensional	49

## Resultados

11. Algas pardas	51
11.1. A absorção de metais pesados pelas algas pardas	51
11.1.1. Microscopia óptica de fluorescência	51
11.1.2. Microscopia eletrônica de transmissão	51
11.1.3. Microanálise de Raios-X	52
11.2. Caracterização de moléculas	52
11.2.1. Compostos fenólicos de <i>P. gymnospora</i>	52
11.2.2. Polissacarídeos de <i>P. gymnospora</i>	53
11.2.3. Polissacarídeos de <i>F. vesiculosus</i>	53
11.3. Absorção de UV por compostos fenólicos	54
11.3.1. Cromatografia de separação por peso molecular	54
11.3.2. Ensaios de absorção de UV pelos compostos fenólicos	54
11.3.3. Influência do pH na capacidade de absorção de UV pelos compostos fenólicos	55
11.4. Mineralização e compostos fenólicos	55
11.5. Interações entre compostos fenólicos e alginatos	56
11.5.1. A enzima VBPO e a ligação entre compostos fenólicos e alginatos	56
11.5.1.2. Formação de complexos de alto peso molecular compostos por CF e ALG	56
11.5.1.3. Medidas de viscosidade	57
12. Algas vermelhas	58
12.1. Microscopias óptica e eletrônica	58
12.1.1. Microscopia óptica	58

12.1.1.1. Caracterização estrutural	58
12.1.1.2. Microscopia óptica de fluorescência	58
12.1.1.3. Microscopia de pinças ópticas	59
12.1.2. Microscopia eletrônica	59
12.2. Isolamento dos corpos em cereja	60
12.3. Microanálise de raios-X dos corpos em cereja	60
12.4. Vídeo-microscopia	61
12.5. Reconstrução tri-dimensional	61
<b>Figuras</b>	<b>63</b>
<b>Discussão</b>	
13. Absorção de metais pesados pelas algas pardas	125
14. Absorção de radiação sola ultravioleta em algas pardas	127
15. A mineralização do carbonato de cálcio em algas pardas	129
16. A formação da parede celular em algas pardas	131
17. O metabolismo secundário em algas vermelhas	136
<b>Conclusões</b>	
18. O metabolismo secundário em algas pardas	142
19. O metabolismo secundário em algas vermelhas	144
<b>Referências bibliográficas</b>	<b>145</b>
<b>Produção científica</b>	<b>160</b>
20. Artigos publicados e manuscritos relacionados à tese	161

## LISTA DE ABREVIATURAS

$^{13}\text{C}$	isótopo natural do carbono (carbono 13)
$^1\text{H}$	próton
3-D	tridimensional
ALG	alginate
ALG-Fv	alginate de <i>Fucus vesiculosus</i>
ALG-Pg	alginate de <i>Padina gymnospora</i>
Apo	apocromática
BSA	albumina de soro bovino
C	carbono
Ca	cálcio
$\text{Ca}^{2+}$	íon cálcio
$\text{CaCl}_2$	cloreto de cálcio
$\text{CaCO}_3$	carbonato de cálcio
CC	corpo em cereja
CCD	dispositivo de carga acoplado
CCS	Centro de Ciências da Saúde
Cd	cádmio
$\text{CD}_3\text{OD}$	metanol perdeuterado
$\text{CDCl}_3$	clorofórmio deuterado
CF	substâncias fenólicas
Cl	cloro
cm	centímetros
$\text{CO}_3^{2-}$	carbonato
ConA	Concanavalina A
COPEA	Coordenação de Programas de Estudos Avançados da UFRJ
Cu	cobre
DEAE	dietilaminoetil
DIC	contraste interferencial diferencial
DMB	dimetilmetileno azul
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
EDXA	análise de raios-X de energia dispersiva
FITC	isotiocianato de fluoresceína
FPLC	cromatografia líquida de baixa pressão
GG	polímero de ácido gulurônico
$\text{H}_2\text{O}_2$	peróxido de hidrogênio
$\text{H}_2\text{SO}_4$	ácido sulfúrico
HCl	ácido clorídrico
Hg	mercúrio
IBCCF	Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho
ICB	Instituto de Ciências Biomédicas
IV	radiação infravermelha
K	potássio
KBr	brometo de potássio
KDa	mil dátons
kV	mil volts
LASER	amplificação da luz por emissão estimulada de radiação
Li	lítio
M	molar
MET	microscopia eletrônica de transmissão
mg	miligrama
MG	polímero de ácido manurônico e gulurônico

ml	mililitro
mm	milímetros
MM	polímero de ácido manurônico
N	núcleo
NA	número de abertura
Na	sódio
NaCl	cloreto de sódio
Ni	níquel
NIH	Instituto Nacional de Saúde Norte-Americano
nm	nanômetro
NMR	ressonância magnética nuclear
O	oxigênio
O <sub>3</sub>	ozônio atmosférico
°C	graus Celsius
OCT	temperatura ótima de congelamento
P	fósforo
PAR	radiação fotossinteticamente ativa
PBS	tampão fosfato salino
PC	parede celular
pH	potencial de protonação
Plan	planática
S	enxofre
SEC	cromatografia de filtração em gel
SEM	microscópio eletrônico de varredura
Si	silício
U	unidades
UEA	<i>Ulex europaeus</i>
USA	Estados Unidos da América
UV	radiação ultravioleta
UVA	radiação ultravioleta A
UVB	radiação ultravioleta B
UVC	radiação ultravioleta C
V <sub>0</sub>	volume inicial
VBPO	bromo-peroxidase dependente de vanádio
VIS	radiação visível
VO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	vanadato
V <sub>t</sub>	volume total
Zn	Zinco
μl	microlitros
μm	micrômetro

# INTRODUÇÃO

# 1. ALGAS MARINHAS

Alga é um termo genérico, desprovido de significado taxonômico, que inclui organismos que possuem clorofila 'a' e um talo não diferenciado em raiz, caule ou folhas, com hábito predominantemente aquático (Raven *et al.*, 2007). Estes organismos não são necessariamente semelhantes entre si e nem sempre possuem uma origem evolutiva próxima (Raven *et al.*, 2007). As macroalgas marinhas (figura A) são multicelulares e estão incluídas em três grupos principais: Chlorophyta (algas verdes), Rhodophyta (algas vermelhas) e Phaeophyta (algas pardas). As principais características das macroalgas são: 1) viverem fixas a algum tipo de substrato, como o rochoso, arenoso ou a outros organismos; 2) não possuírem tecidos vasculares como xilema e floema; 3) incorporarem nutrientes diretamente da água pelas paredes celulares, as quais apresentam compostos característicos dependendo do grupo. As macroalgas representam uma parte considerável da produção primária e da base da cadeia alimentar em regiões costeiras (Raven *et al.*, 2007).



Figura A: Imagens de macroalgas marinhas das divisões Phaeophyta (algas pardas), Chlorophyta (algas verdes) e Rhodophyta (algas vermelhas), respectivamente; a) *Padina gymnospora*; b) *Acetabularia sp.*; c) *Gracilaria sp.* Barras=1cm.

Em geral, as células de macroalgas marinhas apresentam como componentes estruturais básicos: núcleo, cloroplastos, vacúolo, peroxissomos, mitocôndrias, retículo endoplasmático (rugoso e liso) e aparelho de Golgi. Eventualmente, também podem ser observadas outras estruturas, tais como:

de armazenamento energético (como grãos de amido) e de armazenamento de metabólitos secundários (como fisóides).

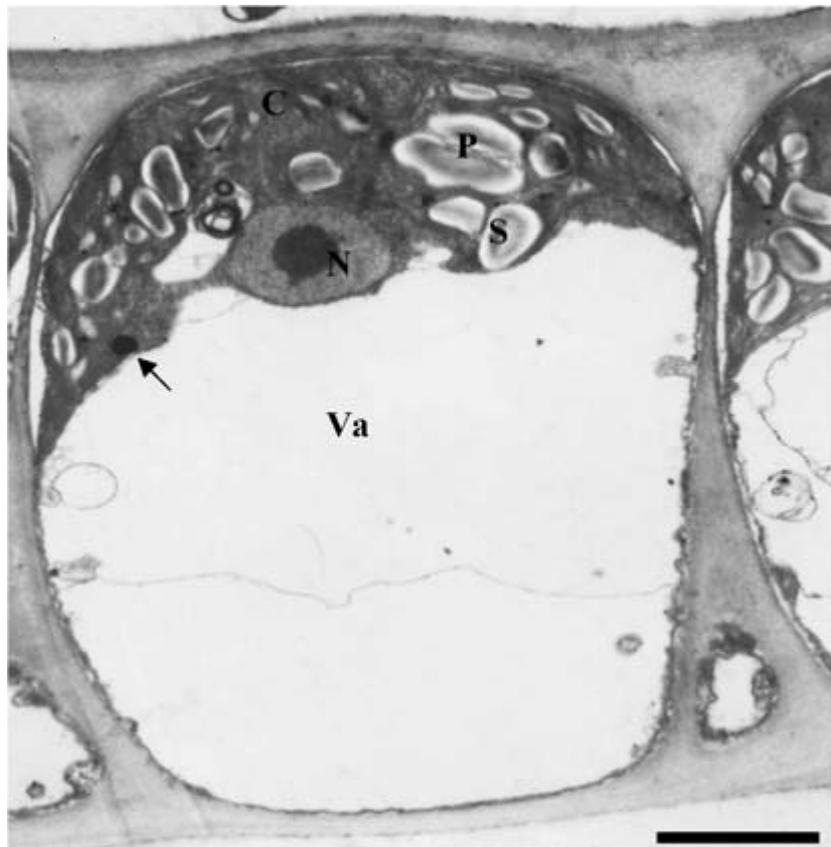


Figura B: Imagem de microscopia eletrônica de transmissão de uma célula da alga verde (Chlorophyta) *Enteromorpha flexuosa* em vista longitudinal. Barras=1 $\mu$ m.

## 2. O METABOLISMO SECUNDÁRIO

Metabólitos secundários são substâncias produzidas por vias derivadas do metabolismo primário e desempenham diversas funções, sendo que algumas são consideradas essenciais para a sobrevivência do organismo (Teixeira, 2002; Fenical, 1975). Contribuem para o sucesso da espécie no ambiente em que vivem ao mediar as interações ecológicas que trazem alguma vantagem ambiental seletiva aos organismos que os produzem (Teixeira, 2002; Fenical, 1975). Uma das principais funções do metabolismo secundário está relacionada à evolução e ao desenvolvimento de um sistema de defesa imunológica primordial. Este sistema é chamado de “defesa química” (Paul *et al.*, 2006a). Produtores de substâncias químicas biologicamente ativas são encontrados principalmente em invertebrados, tais como esponjas, ascídias, corais e moluscos, e dentre as algas, nas divisões Cyanophyta, Phaeophyta, Chlorophyta e Rhodophyta (Bhadury & Wright, 2004, Pereira, 2004; Teixeira, 2002). Por outro lado, alguns trabalhos têm sugerido que os metabólitos secundários produzidos por algas podem exercer alternativamente funções secundárias e primárias, estas últimas sendo essenciais para o próprio desenvolvimento do organismo que os sintetiza. Arnold & Targett (2003) sugerem que substâncias fenólicas de algas pardas, quando solúveis e internalizados dentro de vesículas dispersas no citoplasma, exercem funções relacionadas à defesa química e proteção contra radiação ultravioleta (UV), e que, posteriormente, estas mesmas substâncias são transportadas para a parede celular para exercer uma função primária, onde estas participam da construção e da composição desta estrutura celular.

Desta forma, podemos destacar dois principais mecanismos de ação dos metabólitos secundários: o primeiro está relacionado às funções celulares que eles desempenham, independente de fatores externos, sejam estes bióticos ou abióticos; o segundo mecanismo refere-se à atividade dessas moléculas em processos fisiológicos relacionados à interação do organismo com eventos bióticos ou abióticos.

### 3. O METABOLISMO SECUNDÁRIO EM ALGAS PARDAS

Os florotaninos, uma classe de substâncias fenólicas, são os principais metabólitos secundários sintetizados por algas pardas. Sua composição está baseada na modificação e/ou oligomerização de moléculas de 1,3,5-hidroxibenzeno (figura C), também chamado floroglucinol (Shoenwaelder, 2002). Encontram-se localizadas principalmente em organelas denominadas fisóides, organelas de aspecto elétron-denso em microscopia eletrônica de transmissão (Arnold & Targett, 2003; Shoenwaelder, 2002). Os fisóides são formados na região perinuclear, possivelmente no Aparelho de Golgi (Shoenwaelder & Clayton, 2000), o qual também está envolvido na síntese de polissacarídeos em algas pardas (Vreeland & Laetsch, 1988).

Os florotaninos participam de diversos processos biológicos, como a inibição de herbivoria, proteção contra infecções microbianas (bactérias e fungos), o bloqueio de poli-espermia, a proteção contra a radiação UV solar e a adesão de zigotos (Ragan & Glombitza, 1986; Hay & Fenical, 1988; Karez & Pereira, 1995; Tretyn et al., 1996; Shoenwaelder, 2002).

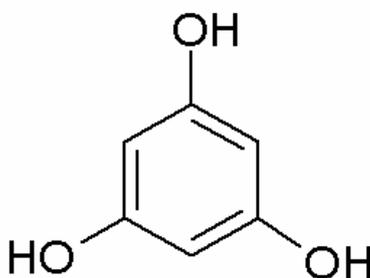


Figura C: A molécula do floroglucinol, ou, também, do 1,3,5-hidroxibenzeno.

#### 3.1. Interações entre as substâncias fenólicas e polissacarídeos

Alguns trabalhos recentes têm apontado que as substâncias fenólicas de algas pardas interagem de alguma forma com os polissacarídeos da parede celular (Shoenwaelder, 2002; Vreeland & Laetsch, 1988). Entretanto, pouco se sabe sobre essas interações, e muito menos sobre os efeitos destas interações nas funções de cada um desses grupos de moléculas (substâncias fenólicas e polissacarídeos). As substâncias fenólicas produzidas pelas algas pardas

têm sido classificadas como solúveis e insolúveis. As solúveis são aquelas que não estabeleceram interações com moléculas diferentes, enquanto que as substâncias fenólicas insolúveis são consideradas como aqueles que interagem de alguma forma com os polissacarídeos produzidos pela alga (Arnold & Targett, 2003).

### **3.1.1. A absorção de metais pesados pelas algas pardas**

Em estudos anteriores, diferentes macroalgas marinhas coletadas na baía de Sepetiba (uma área contaminada com metais pesados no Estado do Rio de Janeiro) foram analisadas por espectrofotometria de absorção atômica e os resultados obtidos indicaram que a alga parda *Padina gymnospora* apresentava as maiores concentrações de Zn e Cd entre todas as espécies testadas (Amado Filho *et al.*, 1999). A microscopia eletrônica analítica revelou que as paredes celulares de regiões medianas do talo da alga apresentaram grânulos elétron-densos compostos principalmente por Zn, em experimentos de laboratório e em algas do campo. De acordo com este resultado, foi proposto que o principal mecanismo da alga *P. gymnospora* para acumular elevadas concentrações de metais pesados está relacionado à precipitação dos metais pesados nas paredes celulares, diminuindo, desta forma, a disponibilidade dos metais para a absorção celular (Amado Filho *et al.*, 1996; 1999).

Foi sugerido que os elementos presentes na parede celular responsáveis por este processo são os polissacarídeos carregados negativamente (os alginatos e as fucanas sulfatadas), pois poderiam absorver e parcialmente excluir íons móveis, e conseqüentemente agir como trocadores de cátions e como barreira iônica, selecionando os elementos que iriam ser absorvidos pelas células da alga (Percival, 1979; Kloareg *et al.*, 1986; Mariani *et al.*, 1990). Andrade *et al.*, 2002 também revelaram a presença de numerosos grânulos cristalinos ao longo das paredes celulares formados, neste caso, principalmente por Cd ou Cd/Zn, os quais se co-localizaram com o enxofre e o oxigênio (Andrade *et al.*, 2002). Além disso, foi observada a co-localização dos grânulos de metais pesados dispostos na parede celular com moléculas sulfatadas da parede celular (Andrade *et al.*, 2002). Estes resultados sugeriram que moléculas sulfatadas, possivelmente as fucanas sulfatadas, desempenham um importante papel na

nucleação do Cd e do Zn. O micro-ambiente ácido formado por estes polissacarídeos mais os alginatos nas paredes celulares de *P. gymnospora* favorece a precipitação dos grânulos cristalinos, como um processo de biomineralização que, conseqüentemente, torna as algas mais tolerantes aos metais (Andrade *et al.*, 2002).

Alguns autores sugerem que a capacidade de acumulação de metais pesados em *Padina gymnospora* possa também estar relacionada às propriedades químicas dos fisóides (Karez & Pereira, 1995). Tretyn *et al.* (1996) relacionam a capacidade de acumulação de metais pesados dos fisóides não somente as cargas elétricas da matriz dos fisóides, mas também à presença de grupos fenólicos protonados e desprotonados. Entretanto, o polissacarídeo da parede celular alginato já foi encontrado nos fisóides através de técnicas imuno-citoquímicas por Vreeland & Laetsch (1988), não podendo ser descartada a possibilidade de que outras moléculas presentes nestas organelas, como polissacarídeos, possam estar participando do processo de captura de metais pesados dentro dos fisóides. A presença também das fucanas sulfatadas nos fisóides pode ser um fator determinante para comprovar esta hipótese, pois adicionará outras propriedades aos fisóides.

### **3.1.2. A absorção da radiação solar UV em algas pardas**

A luz solar que alcança a superfície da Terra é composta por um amplo espectro de radiações, o qual compreende principalmente a radiação UV, a fotossinteticamente ativa (PAR) e a infravermelha (IV) (Diffey, 2002). A radiação UV é subdividida em três diferentes regiões espectrais (A, B e C) as quais são normalmente definidas como: UVA (de 400 a 315 nm), UVB (de 315 a 280 nm), e UVC (de 280 a 100 nm) (Madronich *et al.*, 1998). A radiação UVA é fracamente absorvida pelo ozônio atmosférico (O<sub>3</sub>), enquanto que a radiação UVB é absorvida de forma eficiente, mas não completamente. Já a radiação UVC é totalmente absorvida pelo ozônio atmosférico (Madronich *et al.*, 1998).

As alterações na camada de ozônio podem ser responsáveis por um aumento significativo na entrada de radiações de baixo comprimento de onda (como a radiação UV) no ecossistema marinho (Häder *et al.*, 1998). Conseqüentemente, isto pode provocar um impacto

significativo no balanço dos ecossistemas devido à variedade de danos causados aos organismos marinhos, incluindo as algas, responsáveis pela produção primária neste ambiente.

Os organismos marinhos que vivem na zona eufótica possuem diferentes mecanismos responsáveis pela proteção contra a radiação UV (Franklin & Forster, 1997; Hanelt *et al.*, 1997). Um dos possíveis mecanismos está relacionado à síntese de compostos capazes de absorver a radiação UV. Em algas vermelhas, a presença de aminoácidos tipo micosporinas foi confirmada, enquanto que, para as algas pardas, a propriedade de absorção de UV tem sido relacionada às substâncias fenólicas (Schoenwaelder, 2002; Arroniz-Crespo *et al.*, 2005; Korbee *et al.*, 2005; Holzinger & Lütz, 2006). Em experimentos *in vivo*, já foi relatado que as concentrações teciduais de substâncias fenólicas elevam-se em consequência do aumento na intensidade de radiação UV (Henry & Alstyne, 2004; Abdala-Díaz *et al.*, 2006). Trabalhos sobre a estrutura celular demonstraram que a distribuição dos fisóides é importante para a proteção do material genético contra a radiação UV, pois proporcionam um “sombreamento” ao redor da região nuclear (Schoenwaelder, 2002; Holzinger & Lütz, 2006).

Como mencionado anteriormente, a presença de alginatos nos fisóides já foi confirmada, o que também indica algum grau de interação entre esses compostos (Vreeland & Laetsch, 1988). Entretanto, ainda não há nenhuma informação na literatura a respeito de uma possível propriedade de polissacarídeos modulando a absorção de radiação UV pelas substâncias fenólicas em algas pardas.

### **3.1.3. A mineralização do carbonato de cálcio em algas pardas**

Em animais vertebrados e invertebrados, plantas e procariotos, as funções dos biominerais podem ser diversas, como por exemplo: na recepção sonora, na percepção da gravidade, no armazenamento temporário de íons, na detoxificação de metais, na orientação no campo magnético terrestre, no mecanismo de defesa, entre outras (Farina & Amado Filho, 2007). Em relação às macroalgas, a principal função da mineralização é a defesa mecânica e está relacionada principalmente à mineralização do carbonato de cálcio. Portanto, assim como a

defesa química, a mineralização traz algumas vantagens seletivas para o organismo, como a proteção mecânica contra choques e defesa contra herbívoros (Farina & Amado Filho, 2007).

Dentre as algas pardas, as espécies do gênero *Padina* estão entre as poucas que apresentam a capacidade de mineralização de carbonato de cálcio ( $\text{CaCO}_3$ ) (Farina & Amado Filho, 2007). Este processo de mineralização ocorre na superfície do talo, aparentemente de modo biologicamente induzido e produz uma das fases cristalinas do carbonato de cálcio, a aragonita (Farina & Amado Filho, 2007). A calcificação é um processo extracelular, sendo assim a deposição de  $\text{CaCO}_3$  está relacionada principalmente a reações físico-químicas na água que levam a precipitação do mineral, com a influência do organismo nestas reações. Neste caso as paredes celulares desempenham papel fundamental na nucleação do  $\text{CaCO}_3$ . Polissacarídeos encontrados nas paredes celulares possuem grupos carboxílicos que têm grande afinidade por íons  $\text{Ca}^{2+}$ . Alguns desses constituintes servem como substrato epitaxial para a cristalização. Uma vez conseguida a nucleação, o papel do metabolismo na calcificação é o de prover as condições adequadas para a continuidade da precipitação, através do aumento da concentração ou da aporte dos íons  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{CO}_3^{2-}$  nos sítios de deposição de  $\text{CaCO}_3$  até que o produto de solubilidade desse mineral seja excedido.

Entretanto, há muito pouca informação a respeito deste processo e como ele ocorre. Como mencionado anteriormente, uma variedade de trabalhos tem demonstrado que polissacarídeos aniônicos, principalmente as fucanas sulfatadas e os alginatos, podem atuar como sítios de nucleação durante o processo de mineralização de metais pesados na parede celular (Andrade *et al.*, 2002; Amado Filho *et al.*, 1996). Surpreendentemente, a participação destes polissacarídeos na mineralização da aragonita é apenas sugerida, mas continua não determinada. Até o momento, apenas um único trabalho caracterizou a atividade do alginato (extraído) no processo de mineralização de  $\text{CaCO}_3$  *in vitro* (Pavez *et al.*, 2005). Neste trabalho, os alginatos foram depositados sobre uma superfície especial para a cristalização de  $\text{CaCO}_3$  e a influência destes polissacarídeos no processo de nucleação e na forma de cristais de  $\text{CaCO}_3$  foi determinada. Entretanto, os resultados obtidos ainda não são conclusivos para a compreensão do processo de mineralização *in vivo*.

Em um trabalho prévio de nosso grupo (Nassar *et al.*, 2002) que avaliou a influência do aporte de depósitos de minério de ferro numa região costeira do Espírito Santo sobre as concentrações de metais em algas, foi possível demonstrar que partículas de minério de ferro eram aprisionadas na camada mineralizada de carbonato de cálcio da superfície do talo de *Padina gymnospora* (figura D).

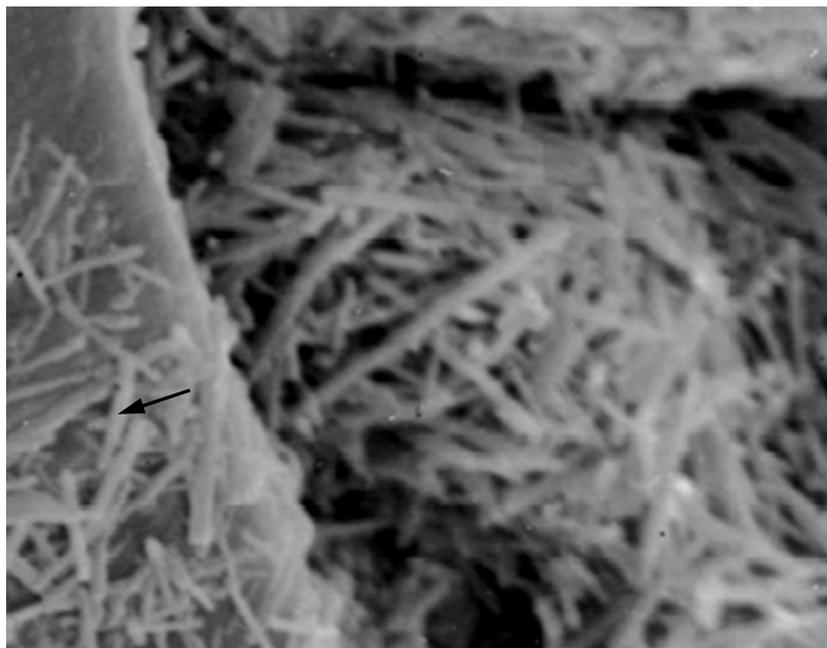


Figura D: Mineralização de carbonato de cálcio na parede celular de *P. gymnospora*; a seta aponta para  $\text{CaCl}_2$  crescido sobre uma partícula de minério de ferro (Nassar *et al.*, 2002).

### 3.1.4. A formação da parede celular em algas pardas

#### 3.1.4.1. A parede celular de algas pardas

A parede celular (figura E) está diretamente relacionada à integridade estrutural e química da planta e pode-se afirmar que esta estrutura possui propriedades ótimas para a manutenção celular. Nas paredes celulares das algas pardas, as fucanas sulfatadas e os alginatos formam uma matriz de caráter ácido imersa no esqueleto de celulose e que conferem à parede celular propriedades polianiónicas (Kloareg & Quatrano, 1988). A obtenção de informações relativas às propriedades físicas e bioquímicas da parede celular de algas pardas vem sendo

explorada, pois os compostos que as constituem apresentam ampla gama de aplicações biotecnológicas.

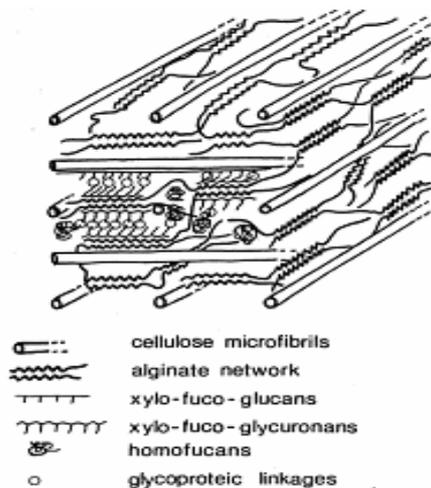


Figura E: Estrutura hipotética da parede celular de algas pardas (Kloareg & Quatrano, 1988).

As fucanas sulfatadas são açúcares ricos em fucose (figura F) e com elevado grau de sulfatação (Kloareg & Quatrano, 1988; Mabeu *et al.*, 1990; Patankar *et al.*, 1993; Dietrich *et al.*, 1995; Chizhov *et al.*, 1999; Chevolot *et al.*, 2000; Marais & Joseleu, 2001; Bilan *et al.*, 2002). As atividades biológicas deste composto estão relacionadas a características estruturais como peso molecular, composição, posição dos grupamentos sulfato, geometria molecular e tipo de ligação entre as unidades constituintes (Shanmungam & Mody, 2000). As fucanas sulfatadas estão entre os polissacarídeos não provenientes de mamíferos mais estudados, por exibirem atividades em sistemas biológicos de mamíferos, e podem ser divididas em três grupos principais nas algas pardas : as fucoidanas, as ascofilanas e as glucuronogalactofucanas.

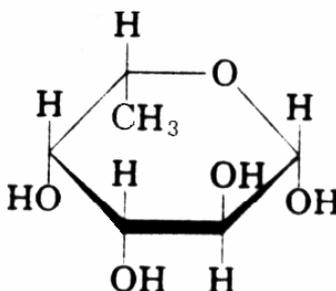


Figura F: A molécula de  $\alpha$ -L-fucose, o monossacarídeo majoritário das fucanas sulfatadas.

As fucoidanas são compostas por  $\alpha$ -1,2-4-sulfuril-L-fucose podendo haver ramificação ou sulfatação na hidroxila do C-3. Estas homofucanas altamente sulfatadas irão sempre conter pequenas proporções de D-xilose, D-galactose, D-manose e eventualmente a L-arabinose (Kloareg & Quatrano, 1988). Segundo Kloareg & Quatrano (1988), as ascofilanas têm como estrutura principal um polissacarídeo de D-xilose com resíduos urônicos (poli-urônico) ramificado com 3-O- $\beta$ -D-xilosil-L-fucose-4-sulfato. Glucuronogalactofucanas são cadeias lineares de D-galactose ramificadas no C-5 com resíduos de L-fucosil-3-sulfato (Medcalf *et al.*, 1978).

Os alginatos são formados por blocos copoliméricos de ácidos poli- $\beta$ -D-manurônico (MM), poli- $\beta$ -D-gulurônicos (GG) e a combinação de ambos (MG); selecionam cátions através de eletroseletividade e formam fortes complexos com cálcio e outros cátions divalentes (Kloareg & Quatrano, 1988). As propriedades físicas dos alginatos dependem não só das concentrações relativas dos blocos MM, MG ou GG (figura G), mas também da disposição destes blocos na estrutura do alginato.

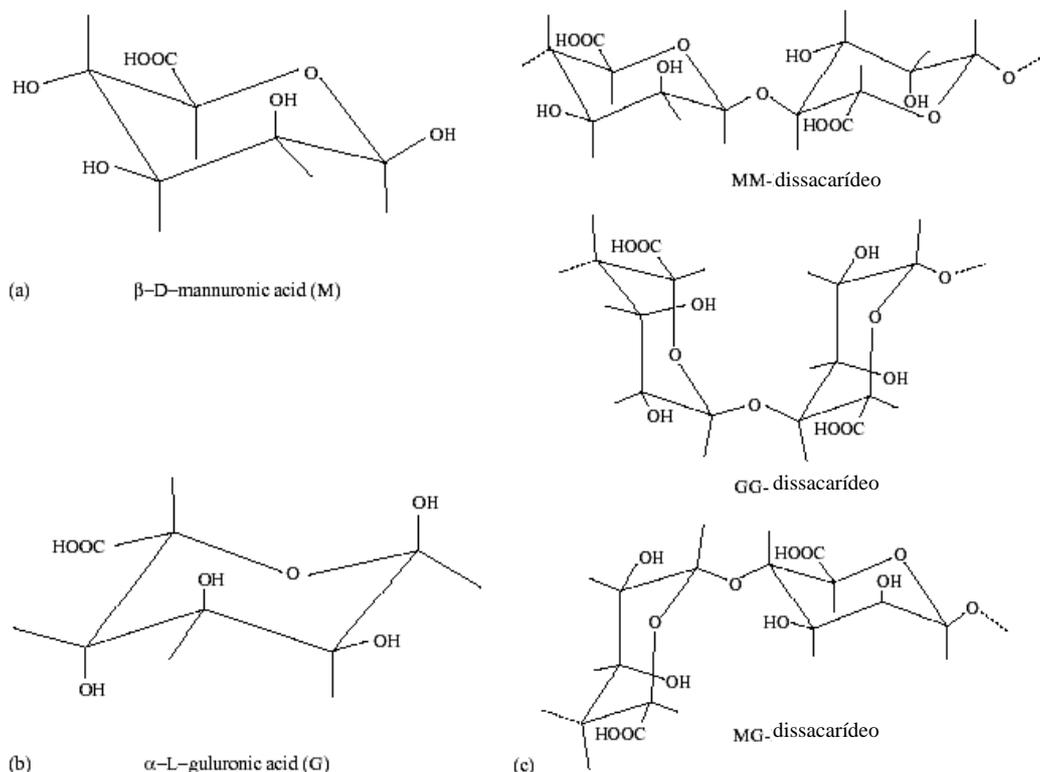


Figura G: Estrutura molecular do alginato; a) resíduo manurônico: M; b) resíduo gulurônico: G; c) cadeias polissacarídicas do alginato: três possibilidades de ligação entre os resíduos (Kloareg & Quatrano, 1988).

#### 3.1.4.2. Substâncias fenólicas e alginatos

Os alginatos de sódio solúveis podem ligar cátions divalentes ou polivalentes formando alginatos insolúveis que se arranjam em estado gel. O alginato tem sido utilizado para a fabricação de micro-cápsulas para carrear fármacos, células, proteínas e enzimas (Orive *et al.*, 2002). Trabalhos desenvolvidos recentemente utilizaram alginatos como matéria-prima principal na elaboração de arcabouços para o crescimento de células humanas para enxerto em processos de engenharia tecidual, na reparação de tecido cartilaginoso e hepático, e em processos cancerígenos para a reposição de tecido perdido (Chung *et al.*, 2002; Marijnissen *et al.*, 2002).

Orive *et al.* (2002) analisaram a biocompatibilidade de diferentes tipos de alginatos empregados como microcápsulas para imobilização de células, e verificaram que a imunogenicidade desse polissacarídeo varia conforme o grau de pureza. O alginato denominado M-alginato (menos puro) foi o que apresentou maior resposta imune quando injetado em camundongos, enquanto que o *Gpur*<sup>®</sup> alginato (mais puro) foi o que apresentou menor resposta imune. Os autores concluíram que essa diferença se deu em função da eliminação de muitas impurezas presentes no M-alginato. O teor de substâncias fenólicas, conteúdos protéicos e endotoxinas decresceram 63%, 68,5% e 91,4%, respectivamente, no *Gpur* em relação ao M-alginato.

Como pôde ser observado no trabalho de Orive *et al.* (2002), a imunogenicidade do alginato puro é muito baixa, sendo esta uma característica importante que justifica sua utilização na clínica. Por outro lado, o baixo grau de pureza das frações de polissacarídeos extraídos das algas pode ser devido à dinâmica destes compostos dentro da célula, a qual ainda não está completamente determinada.

Alguns trabalhos recentes têm sugerido que substâncias fenólicas são freqüentemente encontradas em extratos brutos de polissacarídeos por terem elevada afinidade por carboidratos (Reviere, 1989). Diversos autores têm reportado que interações das substâncias fenólicas com os alginatos podem interferir em propriedades químicas destes polissacarídeos (Moen *et al.*, 1997a, 1997b; Tam *et al.*, 2006). Os dados disponíveis até o momento têm sugerido que as substâncias fenólicas diminuem a capacidade dos alginatos de formarem géis (Moen *et al.*, 1997a, 1997b; Tam

*et al.*, 2006). Porém, não se conhece o tipo de interação que ocorre entre estas moléculas. Assim, não se sabe se, para que ocorra essa queda nos valores de viscosidade do alginato, é necessário que as moléculas estejam ligadas umas as outras ou se a simples presença das substâncias fenólicas nas frações de polissacarídeos já seria o fator determinante. Assim, obter informações a respeito dessas interações é fundamental para a melhor compreensão deste processo, bem como também na geração de conhecimento fundamental sobre a constituição da parede celular das algas pardas e, logo, para avaliar o papel dos compostos fenólicos nesta região da célula.

#### 3.1.4.3. As haloperoxidases, as substâncias fenólicas e os alginatos

Até o momento, poucos trabalhos propuseram que as substâncias fenólicas e os alginatos possam estabelecer ligações entre si. Além disso, não foram apresentados resultados experimentais que confirmem essa hipótese. Alguns autores (Orive *et al.*, 2002; Koivikko *et al.*, 2005; Tam *et al.*, 2006) sugerem que estas possíveis ligações são inespecíficas e que ocorrem após o processo de extração como uma consequência da contaminação do extrato de alginato por substâncias fenólicas. Outros crêem que essas ligações são fundamentais para a formação da parede celular e que são catalisadas pela atividade de enzimas específicas (figura H) (Vreeland *et al.*, 1998a; Shoenwaelder, 2002; Arnold & Targett, 2003).

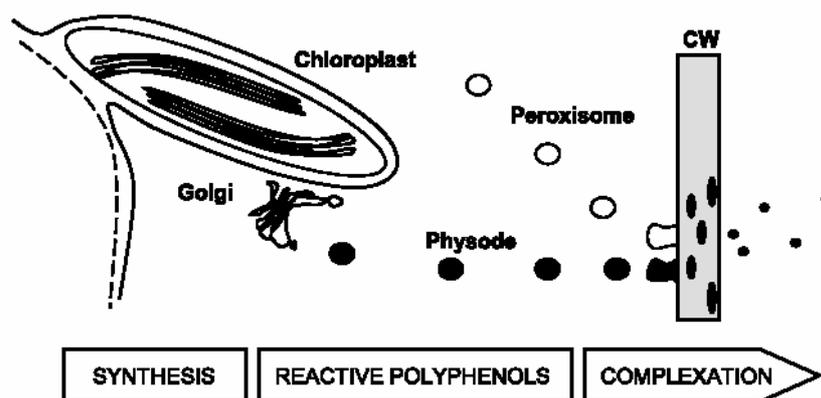


Figura H: Modelo proposto da biossíntese das substâncias fenólicas ilustrando a transição destes compostos da forma reativa para a defesa química (nos fisóides) para a condição de componentes oxidados da parede celular de algas pardas.

De acordo com a primeira hipótese, modificações não reguladas na estrutura química das substâncias fenólicas solúveis, como a oxidação da molécula causada pelo processo natural de

degradação, forneceriam as condições necessárias para promover a ligação entre os compostos fenólicos e os alginatos (Koivikko *et al.*, 2005). A segunda hipótese propõe que o mecanismo de ligação entre substâncias fenólicas e alginatos seja mediado por enzimas haloperoxidases específicas, as bromoperoxidases dependentes de vanádio (VBPO) (Vreeland *et al.*, 1998a; Shoenwaelder, 2002; Arnold & Targett, 2003). Estas enzimas já foram encontradas em diversas espécies de algas vermelhas e pardas (Rush *et al.*, 1995; Almeida *et al.*, 1998; Shimonishi *et al.*, 1998; Vreeland *et al.*, 1998b; Weyand *et al.*, 1999; Berglin *et al.*, 2003; Colin *et al.*, 2004). Em algas pardas, foi demonstrado que elas atuam especificamente na oligomerização das substâncias fenólicas (Berglin *et al.*, 2003). Porém, até o momento ainda não foi comprovada experimentalmente qualquer atividade relacionada ao processo de ligação entre substâncias fenólicas e os alginatos.

### **3.2. Questionamentos sobre metabolismo secundário em algas pardas**

Considerando os dados existentes na literatura sobre os temas apresentados anteriormente, diversas dúvidas permanecem a respeito das funções das substâncias fenólicas em algas pardas.

Inicialmente, pode-se citar que os processos de absorção de metais pesados por algas pardas ainda não foram completamente esclarecidos. Quais seriam as moléculas responsáveis por este processo de absorção nos fisóides, as substâncias fenólicas ou os polissacarídeos presentes nestas organelas? As fucanas sulfatadas são, de fato, moléculas responsáveis pela ligação de metais pelas paredes celulares? Caso sejam, poderiam estar presentes nos fisóides e, assim, serem moléculas atuantes no processo de absorção de metais por essas organelas?

Como dito anteriormente, já foi comprovada a presença de alginatos em fisóides e já foi sugerido que as substâncias fenólicas possam interagir com estes polissacarídeos na parede celular. Assim, é possível que os alginatos influenciem nas propriedades das substâncias fenólicas de absorverem radiação UV? Caso influenciem, quais seriam as conseqüências desta interação na capacidade de absorção de UV?

O processo de biomineralização em algas pardas ainda é pouco conhecido. A propriedade dos alginatos de modificarem o padrão de crescimento de cristais de carbonato de cálcio já é conhecida. Porém, qual a participação de outras componentes estruturais da parede celular? As fucanas sulfatadas apresentariam alguma atividade específica? E quanto às substâncias fenólicas? Sabe-se que podem ser encontrados na parede celular de algas pardas, apesar de não se saber como interagem com os polissacarídeos constituintes desta estrutura. Então, será que participam do processo de biomineralização de carbonato de cálcio?

Por último, resta esclarecer se as substâncias fenólicas atuam no processo de formação da parede celular. Estes metabólitos podem de fato se ligar aos alginatos? Estas possíveis ligações ocorrem *in vivo* ou *in vitro* (durante o processo de extração de polissacarídeos)? Caso estas ligações ocorram *in vivo*, como são mediadas? Pelas enzimas bromoperoxidasas dependentes de vanádio?

## 4. O METABOLISMO SECUNDÁRIO EM ALGAS VERMELHAS

Em algas vermelhas, alguns dos metabólitos secundários produzidos podem ser denominados compostos halogenados. Estes compostos apresentam grande variação estrutural, mas são caracterizados pela presença de átomos de bromo ou cloro ou iodo em sua estrutura molecular (figura 1) (Teixeira, 2002). Os compostos halogenados têm sido amplamente estudados por apresentarem propriedades essenciais nos processos de defesa contra herbivoria, epibiose e infecções por microorganismos (Paul *et al.*, 2006c).

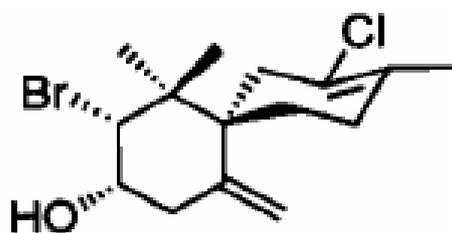


Figura 1: Estrutura molecular do elatol; um exemplo de metabólito secundário presente em uma Rhodophyta (*Laurencia obtusa*).

### 4.1. Defesa química, herbivoria e epibiose

No ambiente marinho, diversas interações ecológicas são mediadas por metabólitos secundários, que funcionam inibindo competidores (De Nys *et al.*, 1991; Dworjanyn *et al.*, 1999), protegendo os organismos contra patógenos e predadores, inibindo o crescimento da epibiota sobre os organismos que os produzem (Fenical, 1975; Dworjanyn *et al.*, 1999), ou ainda exercendo alguma função na reprodução das espécies (Hay *et al.*, 1988).

A maioria das evidências a respeito da mediação química em interações ecológicas envolvendo macroalgas marinhas vem de estudos sobre defesa química utilizando metabólitos secundários contra herbívoros, como peixes, ouriços do mar, gastrópodes e anfípodos (Paul *et al.*, 2001; Pereira *et al.*, 2003; Amsler & Fairhead, 2006). De fato, a herbivoria é conhecida por apresentar forte impacto nas populações e comunidades de macroalgas em uma ampla variedade

de habitas marinhos de todo o mundo (John *et al.*, 1992), e pode ser um agente seletivo potencial para a evolução da defesa química nas macroalgas (Vallim *et al.*, 2005).

Além de inibir a herbivoria, os metabólitos secundários de macroalgas marinhas também são conhecidos como inibidores de organismos epibiontes, incluindo bactérias (Sieburth & Conover, 1965; Al-Ogily & Knight-Jones, 1977), larvas de *Mytilus edulis* (Katsuoka *et al.*, 1990), epífitas (Phillips & Towers, 1982; De Nys *et al.*, 1991), larvas do briozoário *Bugula neritina* (Schmitt *et al.*, 1995), larvas de *Balanus amphitrite* (Willemsen, 1994) e por ter uma ampla gama de propriedades anti-epibiontes contra diversos organismos incrustantes (Da Gama *et al.*, 2002). Contudo, contrários aos da herbivoria, os efeitos da epibiose em algas marinhas são menos estudados, apesar de terem influência em processos importantes como captação de luz e assimilação de nutrientes pela planta, determinando em muitos casos a abundância, a distribuição, a produtividade e a reprodução das populações (Orth & Montfrans 1984). Adicionalmente, os epibiontes podem atrair consumidores que não necessariamente iriam se alimentar da planta hospedeira (Bernstein & Jung, 1979; Karez *et al.*, 2000; Pereira *et al.*, 2004). Portanto, a influência da epibiose em algas marinhas pode ser determinante para selecionar a produção de substâncias defensivas em macroalgas (Nylund *et al.*, 2005).

## **4.2. Localização sub-celular dos compostos halogenados**

Em geral, os metabólitos secundários são armazenados em regiões especiais normalmente localizadas em células superficiais ou próximas da camada superficial celular, sendo potencialmente transportados para superfície do talo (Young & West 1979; Steinberg & De Nys, 2002; Paul *et al.*, 2006a, 2006b). Uma dessas regiões sugeridas é a célula glandular ou célula secretora (Marshall *et al.*, 2003). Um trabalho recente realizado com a espécie *Asparagopsis armata* revelou que baixas concentrações de bromo na água do mar podem modificar significativamente o desenvolvimento normal das células glandulares (Paul *et al.*, 2006b). A microscopia óptica de fluorescência foi usada para indicar esta estrutura como principal sítio de armazenamento de compostos halogenados em *Asparagopsis armata*, devido à propriedade auto-

fluorescente desses metabólitos quando irradiados com luz UV (Paul *et al.*, 2006c). Estas técnicas mencionadas e também a microanálise de raios-X possibilitaram a obtenção de fortes evidências para propor as células glandulares como estruturas de armazenamento de compostos halogenados em outras espécies de algas vermelhas, em *Antithamnion defectum* (Young & West, 1979), no estágio *Falkenbergia* de *Asparagopsis* (Marshall *et al.*, 2003), em *Delisea pulchra* (Dworjanyn *et al.*, 1999) e no gênero *Trilliella* (Wolk, 1968).

As células glandulares não são as únicas estruturas relacionadas com o armazenamento de compostos halogenados. Surpreendentemente, as algas do gênero *Laurencia*, as maiores produtoras de metabólitos secundários, ainda não haviam sido bem caracterizadas a nível celular. Em um dos poucos trabalhos já publicados sobre a biologia celular desta espécie, Young *et al.* (1980) sugerem, através de poucas evidências, que as organelas denominadas *corps en cerise* (corpos em cereja) têm como função armazenar os compostos halogenados. Em geral, os corpos em cereja estão presentes em espécies de *Laurencia* que produzem compostos halogenados (Young *et al.* 1980). Esta organela está presente em todas as células corticais e dos tricoblastos, em número variando de 1 a 4 por célula (Young *et al.* 1980). Um dos primeiros estudos a respeito dos corpos em cereja foi desenvolvido à quase 60 anos atrás e descreveu estas organelas como estruturas reniformes, como depressões oblíquas, composto por uma substância bi-refringente que varia do homogêneo para granulado (Feldmann & Feldmann, 1950). Quase duas décadas depois, a ultra-estrutura dos corpos em cereja foi descrita (Bodard, 1968) sendo sugerido que eles estão localizados no centro de um vacúolo e que são limitados por uma membrana, similar a da membrana citoplasmática. A organização dos corpos em cereja foi descrita como um alvéolo, similar a uma colméia (Bodard, 1968). Entretanto, uma caracterização detalhada da natureza química dos corpos em cereja continua inexistente.

A identificação e a localização de substâncias químicas presentes em um organismo pode fornecer dados importantes sobre as interações ecológicas entre espécies. Por exemplo, a presença de um metabólito apenas no interior do talo de uma alga é um indício de que este tenha a função de inibir a ação de herbívoros. Mas se o mesmo for encontrado em maiores concentrações na superfície do talo pode ser que sua função principal seja impedir o crescimento

de organismos epibiontes sobre a superfície desta alga ou exercer uma atividade alelopática. Por outro lado, se não houver diferenças em sua concentração de um determinado metabólito entre as regiões cortical e medular do talo, este talvez esteja exercendo duas ou três funções simultaneamente (Dworjanyn *et al.*, 1999).

### **4.3. Transporte intracelular dos compostos halogenados**

Se, por um lado, a determinação das estruturas de armazenamento de metabólitos secundários é fundamental para a compreensão do processo de inibição da herbivoria, a elucidação dos mecanismos de transferência e transporte destes metabólitos para a parte externa da parede celular é essencial para compreender os processos de inibição da epibiose. É importante ressaltar que até a realização deste trabalho, nada se conhecia sobre os mecanismos de transferência de compostos halogenados em qualquer espécie de alga vermelha, nem mesmo a partir dos corpos em cereja.

Em *Asparagopsis armata*, Paul *et al.* (2006c) descreveram uma estrutura conectiva, aparentemente membranosa, entre as células glandulares e a parede das células corticais e também observaram a presença de “algum” material nesta estrutura. Sugeriram então, mesmo com poucas evidências, que esta possível conexão poderia ser responsável pela liberação dos metabólitos armazenados nas células glandulares para a superfície do talo da alga. Entretanto, os dados apresentados não puderam comprovar que este “material” estivesse de fato sendo transferido de uma região para outra da célula, pois não foi demonstrado nenhum processo dinâmico de transporte ao longo das estruturas conectivas.

Em relação ao gênero *Laurencia*, Godin (1970) estudou a ultraestrutura de um fino trato citoplasmático, chamado pedicelo, e sugeriu que este aparato conecta os corpos em cereja as paredes das células corticais fornecendo suporte mecânico. Entretanto, também não foi apresentada nenhuma evidência para correlacionar este aparato ao transporte de compostos halogenados e, conseqüentemente, muitas dúvidas a respeito do transporte dos compostos halogenados em *Laurencia* permaneceram não respondidas.

#### 4.4. Questionamentos sobre metabolismo secundário em algas vermelhas

Atualmente, muitos aspectos celulares sobre o metabolismo secundário em algas vermelhas ainda não foram esclarecidos. Abaixo, estão listadas algumas perguntas principais a respeito destes aspectos.

- 1) Onde os compostos halogenados são sintetizados no gênero *Laurencia*?
- 2) Estes metabólitos são, de fato, armazenados em alguma organela específica, como nos corpos em cereja?
- 3) Como os corpos em cereja se relacionam com o resto da célula cortical?
- 4) Qual a distribuição destes metabólitos nas células corticais?
- 5) Como os metabólitos secundários são transportados para a superfície do talo da alga?
- 6) Há poucos dados sobre morte celular em algas vermelhas. Assim, como a morte celular ocorreria nestas células corticais e como poderia influenciar no mecanismo de liberação de metabólitos secundários para a superfície do talo da alga?

## 5. APLICAÇÕES TECNOLÓGICAS DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

### 5.1. Metabólitos secundários de algas pardas

As substâncias fenólicas de algas pardas têm sido amplamente estudadas devido a seus efeitos biológicos tais como, atividades anti-viral, bactericida e anti-tumoral. Recentemente, Cirne-Santos *et al.* (2006) confirmaram que o diterpeno dolabelano purificado da alga parda *Dictyota paffii* inibe a replicação do HIV-1 em culturas primárias de células humanas e sugeriram a utilização deste composto na terapia do HIV. Já foi demonstrada também a atividade bactericida de florotaninos extraídos da alga parda *Ecklonia kurome*. Outros trabalhos vêm propondo que uma dieta rica em macroalgas pode reduzir o risco de câncer intestinal devido às propriedades antioxidantes e anti-proliferativas de substâncias fenólicas presentes nessas algas (Yuan & Walsh, 2006).

### 5.2. Compostos halogenados

Organismos que colonizam superfícies marinhas submersas, como larvas de crustáceos, moluscos e algas, utilizam diversos tipos de “colas” biológicas que permitem a adesão temporária ou permanente do organismo ao substrato. Este processo é denominado bioincrustação. As conseqüências econômicas desse processo são graves. Apenas para exemplificar, a marinha de guerra americana gasta cerca de US\$ 1 bilhão anuais com seus navios devido aos problemas causados pela bioincrustação (Callow & Callow, 2002). Dentre esses problemas, podemos destacar a diminuição da velocidade e o aumento do consumo de combustível devido à diminuição do hidrodinamismo da embarcação, bem como, os gastos com a remoção dos organismos incrustados nos cascos (figura J) e com a recuperação de cascos danificados por estes organismos (Callow & Callow, 2002). Recentemente, têm sido buscadas novas possibilidades de materiais que possam compor as tintas anti-incrustantes. Atualmente, essas tintas são compostas principalmente por cobre e zinco, sendo que, anteriormente, eram confeccionados com uma substância ainda mais tóxica, os TBT's (compostos organoestânicos).



Figura J: Casco de um submarino incrustado por *Enteromorpha* (foto de John Lewis, DSTO, Aeronautical & Marine Research Laboratory, Austrália).

A propriedade anti-epibiose de certos metabólitos pode apresentar um caráter tecnológico, uma vez que metabólitos com tal propriedade (anti-incrustante) poderão integrar-se na busca de biocidas naturais para o combate a bioincrustação. Dentre os biocidas potenciais destacam-se os metabólitos secundários extraídos de algas marinhas. Os metabólitos secundários extraídos de algas marinhas pardas também têm sido estudados em relação a sua possível propriedade anti-epibiótica (Lau & Qian, 1997; 2000). Entretanto, o grupo das algas vermelhas é considerado, dentre os grupos de macroalgas, o maior produtor de metabólitos secundários, cuja principal característica é a síntese de substâncias halogenadas de grande variedade estrutural, desde cetonas de baixo peso molecular e componentes aromáticos até complexos terpenos e produtos originados de ácidos graxos. É a única divisão de algas a incorporar os três halogênios (cloro, iodo, e principalmente o bromo) à moléculas orgânicas, e tem o gênero *Laurencia* como o mais rico na produção destes metabólitos (Fenical, 1975; Pereira, 2004; Teixeira, 2002).

## OBJETIVOS

## **6. GERAL**

- Determinar a distribuição sub-celular de metabólitos secundários (substâncias fenólicas e halogenados) produzidos por macroalgas marinhas (pardas e vermelhas) e estudar a relação desta distribuição com as funções celulares e ecológicas destes metabólitos.

## 7. ESPECÍFICOS

- Avaliar a participação de substâncias fenólicas e polissacarídeos na absorção de metais pesados pela alga parda *Padina gymnospora*;
- Caracterizar os polissacarídeos aniônicos (fucanas sulfatadas e alginatos) e substâncias fenólicas da alga parda *P. gymnospora*;
- Verificar a influência das fucanas sulfatadas, dos alginatos e das substâncias fenólicas no processo de mineralização de cristais de carbonato de cálcio através de ensaios *in vitro*;
- Verificar se as substâncias fenólicas e os alginatos podem estabelecer ligações entre si, bem como determinar a natureza destas ligações e se ocorrem *in vitro* e *in vivo*;
- Estudar a influência dos alginatos na propriedade de absorção de radiação UV *in vitro* pelas substâncias fenólicas de algas pardas;
- Determinar a influência das substâncias fenólicas nas propriedades de auto-arranjo dos alginatos e, conseqüentemente, a influência destes metabólitos nos valores de viscosidade deste polissacarídeo;
- Determinar o mecanismo molecular envolvido no processo de ligação entre substâncias fenólicas e alginatos;
- Contribuir para a determinação do papel de polissacarídeos e substâncias fenólicas de algas pardas na estrutura e formação da parede celular.

- Determinar os locais de síntese, armazenamento e transporte de compostos halogenados na alga vermelha *Laurencia obtusa* relacionando-os com os mecanismos de defesa química;
- Determinar a localização sub-celular dos compostos halogenados em células corticais de *L. obtusa*;
- Isolar as organelas denominadas corpos em cereja presentes na macroalga vermelha *Laurencia obtusa*, bem como caracterizar a sua ultraestrutura e determinar a composição química elementar;
- Identificar e caracterizar as estruturas de ligação dos corpos em cereja com a periferia celular em células corticais de *L. obtusa*;
- Identificar o mecanismo de exocitose de compostos halogenados em células corticais de *L. obtusa*;
- Relacionar os processos de morte celular em *L. obtusa* com possíveis mecanismos de exudação de compostos halogenados pela alga;

## MATERIAIS E MÉTODOS

## 8. COLETA DAS ALGAS

Indivíduos adultos de *Padina gymnospora* com aproximadamente 5 cm de comprimento foram coletadas na região do infra-litoral na Baía da Ribeira (Angra dos Reis, RJ, Brasil). As algas foram preservadas em água do mar em compartimento isolante térmico até serem levadas ao laboratório, limpas e selecionadas para os experimentos. Para os experimentos de localização de metais pesados, as algas foram coletadas na Baía de Sepetiba (Rio de Janeiro, RJ, Brasil) em uma área contaminada por rejeitos de zinco e cádmio.

As amostras de *Laurencia obtusa* (Hudson) Lamouroux foram coletadas na Praia Rasa (Búzios, Rio de Janeiro, Brasil). Após a coleta, as algas coletadas foram mantidas vivas e trazidas para o laboratório em água do mar resfriada dentro de caixas térmicas.

## 9. EXPERIMENTOS COM ALGAS PARDAS

### 9.1. Microscopias óptica e eletrônica

A seguir, serão apresentados os protocolos referentes aos experimentos visando localizar sub-celularmente os polissacarídeos e compostos fenólicos na alga parda *Padina gymnospora*.

#### 9.1.1. Preparação do tecido de *P. gymnospora* para microscopias óptica e eletrônica

Indivíduos adultos foram fixados com 4% de formaldeído diluído em tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,3 durante duas horas a temperatura ambiente. Após este período, o tecido foi lavado com a mesma solução tampão, crio-protegido com sacarose 10% a 4 °C durante a noite, embebido em meio OCT (sigla em inglês para “*optimal-cutting-temperature*”), e congelado por imersão em nitrogênio líquido. Cortes semifinos (15 µm) foram obtidos em um criostato (Reichert-Jung Cryocut 1800) a -22 °C com facas de vidro e coletadas em lâminas silanizadas.

Para microscopia eletrônica de transmissão, as amostras de *P. gymnospora* foram fixadas em solução de formaldeído 4% e glutaraldeído 1% diluídos em tampão cacodilato de sódio 0,1 M pH 7,3 durante duas horas a temperatura ambiente. Visando a caracterização ultra-estrutural, parte das amostras foi pós-fixada com tetróxido de ósmio 1%, desidratada em concentrações crescentes de acetona, infiltradas em resina SPURR (resina epóxi de baixa viscosidade) e os blocos obtidos polimerizados a 60 °C. A outra parte das amostras, não pós-fixadas com tetróxido de ósmio, foi utilizada para a realização da citoquímica localização de monossacarídeos e para a análise da composição elementar da amostra através da utilização da micro-análise de raios-X, também chamada análise de raios-X por energia dispersiva (EDXA).

Para a citoquímica, as amostras foram desidratadas a 4 °C em concentrações crescentes de metanol (até 95 %) e infiltradas em resina LRGold a -20 °C. O processo de polimerização foi realizado a -20°C sob irradiação UV durante dois dias. Os cortes ultra-finos (50nm) foram obtidos em ultra-micrótomo (Reichert) com navalhas de diamante e coletados em grades de níquel recobertas com filme de formvar (300 mesh, Ted Pella Inc.). Para a realização do EDXA, as algas

fixadas foram desidratadas em concentrações crescentes de acetona e infiltradas em resina SPURR. Os cortes ultra-finos (80nm) foram coletados em grades de nylon (300 mesh, Ted Pella Inc.).

### **9.1.2. Microscopia óptica de fluorescência de *P. gymnospora***

#### **9.1.2.1. Localização tecidual das substâncias fenólicas**

A microscopia óptica de fluorescência foi utilizada com o objetivo de obter imagens de auto-fluorescência como indicativo da provável localização das substâncias fenólicas. Estas imagens digitais foram obtidas utilizando comprimento de onda de excitação de ~ 488 nm a partir de uma lâmpada de vapor de Hg. As imagens foram obtidas utilizando os microscópios ópticos Nikon Eclipse TE 300 (COPEA-UFRJ).

#### **9.1.2.2. Localização tecidual de monossacarídeos constituintes das fucanas sulfatadas**

Alguns cortes foram expostos a vapor de ósmio 1% durante 30 minutos para eliminar a auto-fluorescência das células para a melhor visualização dos componentes marcados (Krishnamurthy, 1999). Posteriormente, as lâminas foram lavadas em tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,3. Foi utilizada a lectinas *Ulex europaeus* (UEA), específica to  $\alpha$ -L-fucose, conjugada a isotiocianato de fluoresceína (FITC-Sigma Co.<sup>®</sup>). Os cortes semi-finos foram pré-tratados com 50 mm de cloreto de amônio durante 15 minutos, tampão fosfato salino 0,1 M pH 7,3 (PBS) e albumina de soro bovino (1% e 3% - diluída em PBS) durante 30 minutos para cada concentração. As amostras foram incubadas com UEA durante duas horas à temperatura ambiente e, posteriormente, lavadas com PBS/BSA, PBS e água destilada durante 30 minutos. Experimentos controle foram realizados para verificar a especificidade da marcação, nos quais as lectinas puras (1mg/mL) foram incubadas durante 30 minutos previamente a incubação com as lectinas conjugadas a FITC. As imagens foram obtidas utilizando o microscópio óptico Nikon Eclipse TE 300.

### **9.1.3. Microscopia eletrônica de transmissão de *P. gymnospora***

#### 9.1.3.1. Localização sub-celular de monossacarídeos das fucanas sulfatadas

As grades com cortes ultra-finos foram pré-tratadas com 50 mM de cloreto de amônio durante 15 minutos, tampão fosfato salino 0,1 M pH 7,3 (PBS) e albumina de soro bovino (1% e 3% - diluída em PBS) durante 30 minutos para cada concentração. As amostras foram incubadas durante duas horas à temperatura ambiente com as lectinas UEA e Concanavalina A (ConA), específica para resíduos terminais de  $\alpha$ -D-manosil e  $\alpha$ -D-glicosil, ambas conjugadas a partículas de 10 e 20 nm de ouro coloidal. Posteriormente, foram lavadas com PBS/BSA, PBS e água destilada durante 30 minutos. O experimento controle foi realizado para verificar a especificidade da marcação, nos quais as lectinas puras (1mg/mL) foram incubadas durante 30 minutos previamente a incubação com as lectinas conjugadas a FITC. As imagens foram obtidas utilizando o microscópio eletrônico de transmissão JEOL 1200 EX (IBCCF-UFRJ).

#### 9.1.3.2. Microanálise de raios-X (EDXA)

A microscopia eletrônica analítica, principalmente a análise de raios-X por energia dispersiva (EDXA, sigla em inglês para *energy dispersive X-ray analysis*), tem sido amplamente utilizada para a localização de metais a nível sub-celular em algas marinhas (Silverberg, 1975; Lignell *et al.*, 1982; Amado Filho *et al.*, 1996; Tretyn *et al.*, 1996, Correa *et al.*, 1999; Stengel & Dring, 2000; Andrade *et al.*, 2002) e, conseqüentemente, pode auxiliar na identificação e compreensão dos mecanismos fisiológicos de tolerância/resistência aos metais.

A microanálise de raios-X identifica os elementos presentes na amostra por picos de emissão de raios-X característicos. Os raios-X são gerados quando um elétron do feixe incidente ejeta um elétron de uma camada mais interna do átomo, gerando uma vacância, que será ocupada por um elétron de uma camada mais externa, retornando o átomo ao seu estado fundamental de energia. Nesta transição, o átomo emite raios-X cuja energia corresponde à diferença de energia entre as camadas em questão. Os fótons gerados no microscópio são

capturados por um detector de raios-X (cristal de Si-Li), transformados em pulsos elétricos proporcionais a suas energias, os quais são alocados através de um “analisador multicanal” em picos do espectro de raios-X.



Figura K: Microscópio eletrônico de transmissão micro-analítico JEOL 1200 EX equipado com EDXA.

As análises apresentadas neste trabalho foram realizadas no microscópio eletrônico de transmissão JEOL 1200 EX (Figura K – imagem de um microscópio do mesmo modelo utilizado neste trabalho), o qual foi utilizado na voltagem de 80 kV, em aumentos próximos de 10.000X; foi escolhida a menor abertura da lente condensadora e o menor diâmetro do feixe de elétrons (60 nm de diâmetro). O goniômetro foi inclinado em 30 graus e a abertura da lente objetiva foi retirada durante as análises. O porta-espécime original de cobre foi trocado por um de grafite para minimizar picos de raios-X indesejáveis. A aquisição dos espectros foi realizada utilizando um

período de tempo para contagem de 300 segundos e um valor máximo de fótons não detectados equivalente a 20 % do total de fótons que chegaram ao detector.

## **9.2. Isolamento e caracterização de moléculas**

A seguir, serão apresentados os protocolos referentes aos experimentos para a extração, purificação e caracterização dos compostos fenólicos e polissacarídeos de algas pardas.

### **9.2.1. Substâncias fenólicas de *P. gymnospora***

#### 9.2.1.1. Protocolo de extração

A extração das substâncias fenólicas solúveis foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Koivikko *et al.* (2005). Para a extração, 50 g de massa fresca das algas foram mantidas em 2 litros de solução de acetona a 70 % (diluída em água) sob constante agitação por 12 horas a temperatura ambiente e em frasco escuro. O material foi centrifugado (5,000 x g por 10 minutos, a temperatura ambiente), e o extrato obtido (sobrenadante) foi concentrado em aparelho rota-vapor. Logo após, o resíduo foi dissolvido em água destilada, centrifugado (5,000 x g por 10 minutos, a temperatura ambiente) e liofilizado.

#### 9.2.1.2. Purificação e caracterização

As substâncias fenólicas extraídas foram diluídas em água destilada e parcialmente purificados utilizando uma coluna C-18 (Sep-Pak C-18 Cartridge, Water Associates, Millipore®), a qual foi pré-ativada com etanol e lavada com água destilada antes da purificação. As substâncias fenólicas adsorvidas a coluna foram eluídas com um gradiente de etanol crescente (aumento gradual de 5%), evaporados, dissolvidos em água destilada e liofilizados. Durante o processo de isolamento, houve a preocupação para que as substâncias fenólicas fossem protegidas contra degradação luminosa. Inicialmente, foi realizada a varredura dos comprimentos de onda absorvidos pelas substâncias fenólicas utilizando um espectrofotômetro UV-mini 1240 UV-VIS Shimadzu, o qual revelou que o comprimento de onda mais absorvido corresponde a aproximadamente 210 nm.

A caracterização das substâncias fenólicas isolados foi realizada determinando o peso molecular médio, bem como determinando a estrutura molecular principal destes metabólitos. O peso molecular foi determinado utilizando duas colunas de separação por peso molecular através da cromatografia de filtração em gel (SEC – sigla em inglês para “*size exclusion chromatography*”). Utilizou-se a coluna Sepharose CL4B (usada em bancada) e a coluna Superose 6 (usada acoplada a um sistema HPLC Shimadzu – Tóquio-Japão), ambas da “Amersham Pharmacia Biotech”. As colunas foram equilibradas com tampão acetato de sódio 100 mM EDTA 20 mM e NaCl 250 mM pH 6,0. O fluxo da coluna Sepharose CL4B foi de 8 mL/hora, enquanto que o da Superose 6 foi de 15mL/hora.

Para verificar a distribuição das frações ao longo do gradiente, foram retiradas pequenas alíquotas de material para a detecção de açúcares totais através da reação de fenol-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (absorvância a 480 nm), para detecção de ácidos urônicos através da reação do carbazol (absorvância a 525 nm), para detecção de moléculas sulfatadas através da reação de metacromasia com o DMB (absorvância a 525 nm) e para a detecção de substâncias fenólicas através da leitura das amostras em absorvância de 210 nm.

A estrutura molecular principal das substâncias fenólicas foi determinada utilizando a espectroscopia de ressonância magnética nuclear (NMR). Espectros de <sup>1</sup>H foram obtidos a 300 MHz, enquanto que e os espectros de <sup>13</sup>C foram obtidos a 75 MHz (diluídos em CDCl<sub>3</sub> e CD<sub>3</sub>OD) utilizando tetrametilsilano como padrão interno.

### **9.2.2. Polissacarídeos de *P. gymnospora***

Esta etapa teve como objetivos extrair polissacarídeos de *P. gymnospora* e, principalmente, extrair uma fração de alginato “aderida” as substâncias fenólicas para, posteriormente, determinar a origem destes metabólitos e demonstrar se são produtos de contaminação ou se estão efetivamente ligados aos alginatos.

#### **9.2.2.1. Protocolo de extração**

Os polissacarídeos foram extraídos a partir de 10 g de biomassa de algas secas utilizando digestão com papaína (1 g), a qual foi solubilizada em água destilada morna (60° C).

Posteriormente, os polissacarídeos extraídos foram precipitados com etanol (75 %), centrifugados e liofilizados. O pó liofilizado foi dissolvido numa solução de  $\text{CaCl}_2$  (4 M) para precipitar os alginatos. A amostra foi centrifugada (4,000 x g por 20 minutos, a temperatura ambiente) e a fração solúvel foi separado da precipitada. As duas frações foram dializadas em EDTA 10 % e em água destilada cada uma por 72 horas, finalmente, e liofilizadas.

#### 9.2.2.2. Purificação das amostras

A amostra liofilizada do material não precipitado foi diluída em tampão acetato de sódio 50 mM EDTA 5 mM pH 8,0 e aderida em resina DEAE-celulose (troca iônica). Posteriormente a resina foi lavada com a mesma solução tampão por três vezes e, finalmente, os polissacarídeos foram eluídos com tampão acetato de sódio 50 mM EDTA 5 mM pH 8,0 adicionado de NaCl (3,0 M). As frações de polissacarídeos obtidas foram dializadas e liofilizadas para serem purificadas em coluna mono-Q (troca iônica) acoplada a FPLC (HR 5/5) (Amersham Pharmacia Biotech) equilibrada com tampão Tris-HCl 20 mM, EDTA 5 mM pH 8,0. O material foi solubilizado em tampão Tris/HCl 20 mM/EDTA 5 mM pH 8,0 e aplicado na coluna. A eluição da coluna foi feita através de um gradiente linear de NaCl 0-3 M com o mesmo tampão. O fluxo da coluna foi de 0,45 mL/min.

Para verificar a distribuição das frações ao longo do gradiente, foram retiradas pequenas alíquotas de material para a detecção de açúcares totais através da reação de fenol- $\text{H}_2\text{SO}_4$ , para detecção de ácidos urônicos através da reação do carbazol, para detecção de moléculas sulfatadas através da reação de metacromasia com o DMB e para a detecção de substâncias fenólicas através da leitura das amostras em absorvância de 210 nm. O material foi agrupado em três frações principais. A primeira originada a partir dos tubos que compuseram o pico 1, a segunda composta por tubos que compuseram o pico 2 e a terceira composta por tubos do pico 3. As frações obtidas foram dializadas em água destilada por 72 horas e liofilizadas.

#### 9.2.2.3. Caracterização das amostras

Polissacarídeos purificados de *P. gymnospora* (~15  $\mu\text{g}$ ) foram aplicados em um gel contendo 0,5 % de agarose, o qual foi corrido por 1 hora à 110 V em 1,3-diaminopropano/acetato 0,05 M (pH 9,0). Os polissacarídeos no gel foram fixados com 0,1 % de brometo de N-cetil-N N N-

trimetil amônio. Após 12 horas, o gel foi seco e corado em 0,1 % de azul de toluidina em uma solução de ácido acético/etanol/água (0,1:5:5, v/v). A composição monossacarídica das amostras isoladas foi estimada por cromatografia em papel corrida em 1-butanol/piridina/água (3:2:1, v/v) durante 48 horas após hidrólise ácida dos polissacarídeos. O peso molecular das amostras foi determinado através de SEC utilizando as colunas Sepharose CL4B e Superose 6 (de acordo com o protocolo descrito anteriormente).

### **9.2.3. Alginato de *Fucus vesiculosus***

#### 9.2.3.1. Purificação da amostra

Uma fração parcialmente purificada de alginato extraído de *Fucus vesiculosus* foi obtida da empresa Sigma-Aldrich (ref. A2158) para a realização de experimentos de interação com substâncias fenólicas isolados. O alginato foi previamente purificado utilizando uma coluna de troca iônica elaborada com a resina DEAE-celulose. A amostra liofilizada do alginato foi diluída em tampão acetato de sódio 100 mM EDTA 20 mM pH 6,0 e aderida à resina. Posteriormente a coluna foi lavada com a mesma solução tampão e, finalmente, os polissacarídeos foram eluídos utilizando-se um gradiente linear de NaCl (de 0 a 3 M) diluído em tampão acetato. As frações obtidas foram dializadas em água destilada por 72 horas e liofilizadas. Posteriormente, uma fração de alto peso molecular foi obtida a partir do alginato purificado através da SEC utilizando as colunas Sepharose CL4B e Superose 6 (de acordo com o protocolo descrito anteriormente). A fração obtida foi dializada em água destilada por 72 horas e liofilizada.

Para verificar a distribuição das frações ao longo dos gradientes, foram retiradas pequenas alíquotas de material para a detecção de açúcares totais através da reação de fenol- $H_2SO_4$ , para detecção de ácidos urônicos através da reação do carbazol, para detecção de moléculas sulfatadas através da reação de metacromasia com o DMB e para a detecção de substâncias fenólicas.

#### 9.2.3.2. Caracterização das amostras

A composição monossacarídica das amostras isoladas foi estimada por cromatografia em papel corrida em 1-butanol/piridina/água (3:2:1, v/v) durante 48 horas após hidrólise ácida dos

polissacarídeos. O peso molecular das amostras foi determinado através de SEC utilizando as colunas Sepharose CL4B e Superose 6 (de acordo com o protocolo descrito anteriormente).

### **9.3. Absorção de UV por substâncias fenólicas**

Os experimentos listados a seguir são referentes à utilização das substâncias fenólicas e alginatos em ensaios *in vitro* visando à determinação da influência dos alginatos na capacidade de absorção de radiação UV pelas substâncias fenólicas de algas pardas.

#### **9.3.1. Cromatografia de separação por peso molecular**

Antes mesmo de avaliar a influência dos alginatos na capacidade de absorção de UV das substâncias fenólicas *in vivo*, é importante saber como estas substâncias interagem entre si. E se, de fato, podem estabelecer ligações. As substâncias fenólicas e os alginatos são conhecidos como moléculas de baixo e alto peso molecular, respectivamente. A possível formação de complexos de alto peso molecular contendo estes dois compostos seria uma evidência direta da existência de ligações entre eles. Desta forma, foram realizadas SEC nas colunas Sepharose CL4B e Superose 6 para investigar se essas duas moléculas podem estabelecer ligações entre si. A co-eluição das substâncias fenólicas e dos alginatos confirmaria este processo de ligação.

As substâncias analisadas foram o alginato isolado da alga *Padina gymnospora*, o alginato purificado da alga *Fucus vesiculosus* e as substâncias fenólicas purificadas também de *P. gymnospora*. A amostra de alginato *P. gymnospora* foi analisada isoladamente, pois análises iniciais indicavam a presença de substâncias fenólicas nesta fração. O alginato de *Fucus vesiculosus* e as substâncias fenólicas de *Fucus vesiculosus* foram analisados puros e, também misturados (v/v : 1/1), visando verificar as interações estabelecidas entre estes compostos *in vitro*.

#### **9.3.2. Ensaios de absorção de UV pelas substâncias fenólicas**

A capacidade de absorção de UV pelas substâncias fenólicas diluídos em soluções de água destilada ou água destilada com a adição do alginato de *F. vesiculosus* foi verificada ao

longo do tempo. Também foi verificada a capacidade de absorção de UV das substâncias fenólicas extraídos concomitantemente com o alginato de *P. gymnospora*. Os valores da análise de absorção foram obtidos medindo a absorvância das soluções preparadas a 210 nm (pico de máxima absorção dos compostos fenólicos) utilizando um espectrofotômetro UV-mini 1240 UV-VIS Shimadzu. Os ensaios foram realizados em câmaras escuras a baixa temperatura (~4°C) com 1 mL de cada solução. Os valores de absorvância foram medidos a cada 24 horas desde o início até completarem 72 de experimento em andamento (tempos: T0, T24, T48 e T72) As soluções analisadas foram (em cinco replicatas): 1) alginato purificado de *F. vesiculosus* (a 100 µg/ml); 2) alginato isolado de *P. gymnospora* aderido a substâncias fenólicas (a 100 µg/ml); 3) substâncias fenólicas purificadas (a 25 µg/ml); e 4) alginato purificado de *F. vesiculosus* misturado a substâncias fenólicas purificadas de *P. gymnospora* (v:v, 1:1, cada um a 25 µg/ml).

### **9.3.3. Influência do pH na capacidade de absorção de UV pelas substâncias fenólicas**

Considerando que a presença do alginato em soluções pode modificar o pH do meio devido à propriedade polianiónica deste polissacarídeo, fez-se necessário verificar a influência dos alginatos nos valores de pH nas soluções onde foram misturados com as substâncias fenólicas.

Os alginatos foram diluídos em água destilada e também em soluções de substâncias fenólicas e sua capacidade de modificar o pH foi então verificada. As medidas de pH foram realizados com um pHmetro pré-calibrado Analion PM 608 e as soluções analisadas foram (cinco replicatas): 1) água destilada; 2) alginato purificado de *F. vesiculosus*; 3) substâncias fenólicas purificadas de *P. gymnospora*; e 4) alginato purificado de *F. vesiculosus* misturado a substâncias fenólicas purificadas de *P. gymnospora* (v:v, 1:1). Todas as substâncias analisadas foram diluídas em água destilada e analisadas em seis diferentes concentrações: 100, 75, 50, 25, 10 e 5 µg/ml.

## **9.4. Mineralização e substâncias fenólicas**

Os ensaios de cristalização foram realizados de acordo com o método descrito por Fernandez *et al.* (2004). Os recipientes utilizados para o ensaio de mineralização foram

micropontes de poliestireno (Hampon Res., Laguna Niguel, CA). Os ensaios consistiram na construção de uma câmara com uma placa de Petri de 85 mm de diâmetro com um orifício central de 18 mm de diâmetro na sua base, região a qual foi colada a um cilindro plástico (30 mm de diâmetro e 40 mm de altura). A base da placa de Petri foi subdividida em 16 raios para garantir a organização eqüidistante das micropontes de poliestireno (figura L). A precipitação do carbonato de cálcio resulta da difusão do vapor de dióxido de carbono na solução tamponada de cloreto de cálcio.

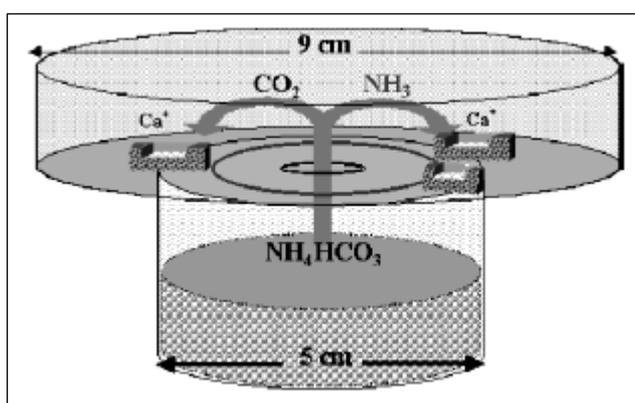


Figura L: Esquema da câmara para os ensaios de cristalização (extraído de Fernandez *et al.*, 2004).

As micropontes foram preenchidas com 35  $\mu\text{L}$  de solução de cloreto de cálcio 200 mM diluída em tampão Tris 200mM pH 8,5. O cilindro plástico foi preenchido com 3 mL de carbonato de amônio 25 mM. Os ensaios experimentais com substâncias fenólicas, alginatos e fucanas sulfatadas foram realizados em quatro diferentes diluições para cada composto (40, 20, 10 e 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Os experimentos controle foram realizados utilizando apenas a solução de cloreto de cálcio pura. Os experimentos foram realizados a 20 °C durante 24 horas.

Ao término do experimento, as micropontes foram lavadas com água destilada, secas ao ar a temperatura ambiente, coladas com fita dupla face de carbono a suportes de varredura de alumínio (“stubs”) e metalizadas com ouro. O material foi observado em um microscópio eletrônico de varredura JEOL SEM 5310 (IBCCF-UFRJ).

## 9.5. Interações entre substâncias fenólicas e alginatos

Os experimentos listados abaixo foram desenvolvidos visando à determinação dos processos de interação entre as substâncias fenólicas de *P. gymnospora* e os alginatos de *P. gymnospora* e de *F. vesiculosus*. Desta forma, procurou-se simular *in vitro* o possível processo de ligação entre as substâncias fenólicas e os alginatos. Como objetivo principal, procurou-se determinar se a enzima bromoperoxidase dependente de vanádio (VBPO) atua neste possível processo de ligação.

### 9.5.1. A enzima VBPO e a ligação entre substâncias fenólicas e alginatos

#### 9.5.1.1. Amostras analisadas

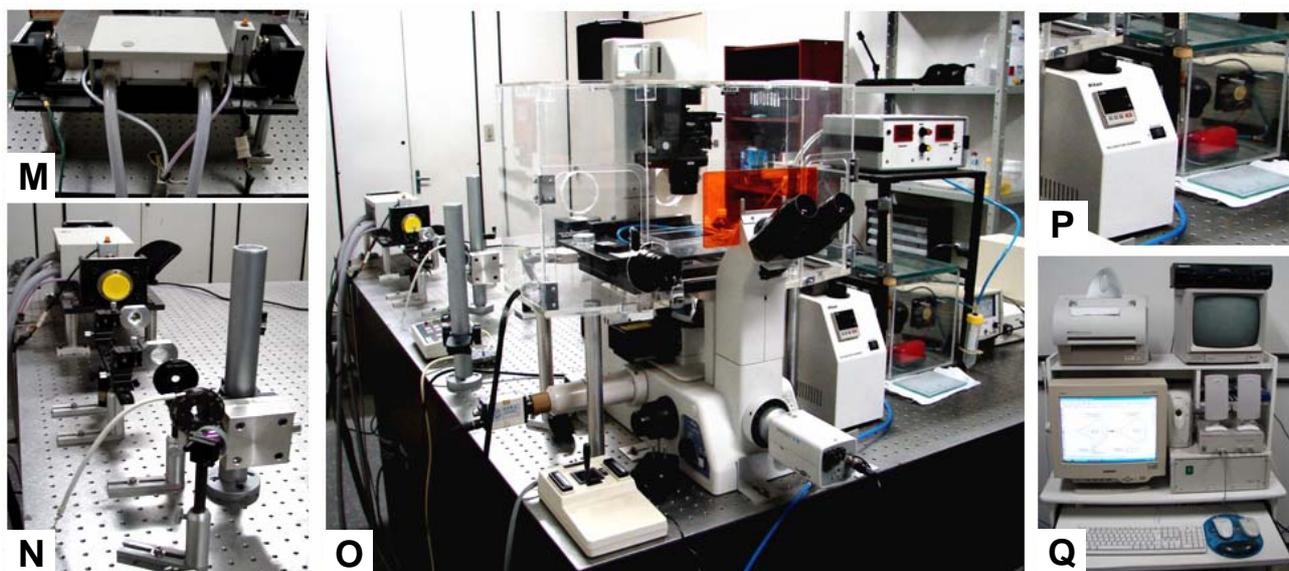
A enzima VBPO (Fluka, cód. 17965) utilizada neste experimento foi extraída e purificada da alga vermelha *Corallina officinalis*. As concentrações apropriadas das enzimas e dos substratos (KBr, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, VO<sub>4</sub><sup>3-</sup>), a temperatura e o pH das soluções de incubação foram determinados de acordo com o trabalho de Rush *et al.* (1995). Os ensaios de ligação foram realizados em soluções de tampão acetato de sódio 100 mM (pH 6,4), EDTA 20 mM, NaCl 250 mM, KBr 8 mM, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 100 μM e VO<sub>4</sub><sup>3-</sup> 1 mM, utilizando 10 U/ml de VBPO, 1 mg/ml de substâncias fenólicas (CF), 1,5 mg/ml de alginato purificado de *F. vesiculosus* (ALG-Fv) e 1 mg/ml de albumina de soro bovino (BSA). Nove diferentes soluções de incubação foram mantidas a temperatura de 30 °C durante 24 horas: 1) CF + ALG-Fv + VBPO; 2) CF + VBPO; 3) ALG-Fv + VBPO; 4) VBPO; 5) CF + ALG-Fv + BSA; 6) CF + BSA; 7) ALG-Fv + BSA; 8) BSA; e 9) CF + ALG-Fv. Os produtos formados foram analisados por SEC utilizando uma coluna Superose 6.

#### 9.5.1.2. Formação de complexos de alto peso molecular compostos por FC e ALG

Após a incubação com a VBPO foram realizadas SEC com a coluna Superose 6 para investigar se essas duas moléculas formariam ligações entre si formando complexos de alto peso molecular. A co-eluição dos compostos fenólicos e dos alginatos pode confirmar este processo de ligação.

9.5.1.3. Medidas de viscosidade de soluções contendo alginato através da avaliação do movimento Browniano utilizando o microscópio de pinças ópticas

O Laboratório de Pinças Ópticas da COPEA-UFRJ, situado no ICB/CCS, utiliza um feixe de laser de Neodymium-Yag de alta potência (até cerca de 4 Watts), com comprimento de onda na faixa do infra-vermelho (1064 nm) acoplado a um microscópio óptico Nikon Eclipse TE 300 (figuras L-P).



Figuras L-P: Microscópio de pinça óptica da COPEA. M) Fonte LASER de Neodymium-Yag; N) Caminho óptico do laser em direção ao microscópio; O) O microscópio óptico Nikon Eclipse TE 300 conjugado ao sistema de pinças ópticas montados sobre uma mesa flutuadora Newport anti-vibração; P) Sistema de controle de temperatura; Q) Central de aquisição e processamento de imagens.

A microscopia de pinça óptica baseia-se na utilização de um microscópio com a conformação usual ou invertido, acoplado a uma fonte radiação laser cuja radiação segue pelo eixo óptico do sistema e é focalizado pela lente objetiva sobre um ponto desejado da amostra. O gradiente de intensidade de radiação em torno da região de foco gera forças atrativas sobre objetos próximos, com índices de refração maiores do que o do líquido circundante. Assim, é possível capturar pequenas estruturas com o laser, e medir, por exemplo, a força necessária para deslocar uma dada célula, ou uma organela dentro da célula, medir a viscosidade de uma solução, determinar propriedades mecânicas de agregados macromoleculares como o módulo de elasticidade, entre outras.

Base teórica – o movimento Browniano de esferas de poliestireno ( $1.52 \pm 0.05 \mu\text{m}$  de raio) foi usado para medir a viscosidade de meios onde estas esferas foram imersas (Viana *et al.*; 2006, 2007). Uma solução contendo esferas de poliestireno (10 % v/v; Sigma-Aldrich) foi diluída em cada uma das soluções descritas anteriormente (oriundas do experimento de ligação de compostos fenólicos com alginatos) em uma concentração de  $10^{-4}$  % (v/v). Como suporte para as soluções com esferas, foi utilizada uma lâmina de vidro larga (24 x 50 mm) como um anel de borracha de 1 cm de diâmetro interno e 0,3 cm de altura, o qual foi fixado à superfície do vidro com graxa de silicone formando um poço. A solução foi colocada na região delimitada pelo anel de borracha e uma lamínula (24x24 mm) foi colocada sobre o anel para evitar a evaporação. As amostras foram observadas em um microscópio Nikon Eclipse TE300 adaptado para receber um LASER de Nd-YAG (comprimento de onda de 1064 nm) entrando por sua porta de epi-fluorescência. A utilização de uma lente objetiva de elevado número de abertura numérica (Plan Apo 100x; NA 1.4) tornou possível à criação de uma armadilha óptica próxima à região de foco da lente objetiva (Ashkin & Dziedzic, 1987) permitindo a manipulação de pequenos objetos dielétricos (na ordem de  $\mu\text{m}$  de diâmetro). Todo o sistema (microscópio, fonte LASER, e espelhos para orientação do laser) foi montado numa mesa Newport (Newport RS 2000TM) que minimiza os efeitos das vibrações ambientais. As imagens digitalizadas foram obtidas com uma câmera CCD conectada a um sistema Argus-20 (Hamamatsu, Japan) e a um capturador de quadros (“frame grabber”) LG3-16 PCI CCIR Scion. As imagens obtidas foram processadas e analisadas utilizando o programa gratuito ImageJ (NIH – USA).

O desvio quadrático médio da variação da posição do centro de massa  $\delta\rho$  em um intervalo de tempo  $t$  é dado por:

$$(1) \quad \langle (\delta\rho)^2 \rangle = 4Dt,$$

onde

$$D = \frac{k_B T}{\beta},$$

(2)

e  $k\beta T$  é a energia térmica ( $4,14 \times 10^{-21}$  Joules);  $\beta$ , o coeficiente de fricção de Stokes, o qual é uma função do raio da esfera  $a$ , a altura  $h$  (distância entre o centro da esfera de poliestireno e a superfície de lâmina de vidro) e a viscosidade do fluido  $\eta$ . O coeficiente de fricção  $\beta$  é dado pela Lei de Faxen (Feitosa & Mesquita, 1991):

$$(3) \quad \beta = 6\pi\eta a \left[ 1 - \frac{9}{16} \left( \frac{a}{h} \right) + \frac{1}{8} \left( \frac{a}{h} \right)^3 - \frac{45}{256} \left( \frac{a}{h} \right)^4 - \frac{1}{16} \left( \frac{a}{h} \right)^5 \right]^{-1}.$$

Para um valor fixo de  $h$ ,  $\langle (\delta\rho)^2 \rangle$  é calculado utilizando as imagens digitalizadas (1000 quadros; cerca de 30 quadros por segundo) da esfera observada através do microscópio. A partir do ajuste linear dos valores de  $\langle (\delta\rho)^2 \rangle$  medidos em função do tempo  $t$ , utilizando a equação '1', o coeficiente de difusão  $D$  é obtido. Este valor permitiu a determinação do coeficiente de fricção de Stokes  $\beta$  através da utilização da equação 2. A altura da esfera foi modificada experimentalmente, e as mesmas etapas de cálculo foram repetidas. A partir do ajuste dos valores de  $\beta$  em função da altura da esfera  $h$  utilizando a equação 3, foi obtido o valor de viscosidade da amostra  $\eta$  com um erro padrão de 5 a 10%. A calibração do sistema foi realizada pela medida da viscosidade da água destilada.

A partir do exposto, com o objetivo de verificar a influência dos compostos fenólicos na viscosidade dos alginatos, as seguintes amostras (5 mg/ml de alginato em cada amostra) diluídas em água destilada foram analisadas: 1) alginato de *P. gymnospora*; 2) substâncias fenólicas + alginato de *F. vesiculosus* + VBPO; 3) substâncias fenólicas + alginato de *F. vesiculosus*; 4) substâncias fenólicas; e 5) alginato de *F. vesiculosus*. A amostra "3" foi analisada em cinco

diferentes concentrações (0.25, 2.5, 5, 10 e 50 mg/ml) para testar um possível fenômeno de dose dependência influenciando a viscosidade do alginato.

## 10. EXPERIMENTOS COM ALGAS VERMELHAS

Em seguida, encontram-se listados os métodos que utilizados para caracterizar os corpos em cereja, bem como o processo de síntese, armazenamento e transporte de metabólitos secundários nas células corticais de *Laurencia obtusa*.

### 10.1. Microscopias óptica e eletrônica

#### 10.1.1. Microscopia óptica

##### 10.1.1.1. Caracterização estrutural

Amostras de algas foram fixadas em solução de formaldeído 4% e glutaraldeído 5% diluídos em tampão cacodilato de sódio 0,1 M pH 7,3 preparado com água do mar. Posteriormente, as amostras foram pós-fixadas em solução de tetróxido de ósmio 1% durante 2 horas à temperatura ambiente. As algas foram desidratadas em series crescentes de acetona (até 100%) e embebidas em resina Spurr à temperatura ambiente. O processo de polimerização foi realizado a 70 °C. Os blocos obtidos foram cortados em ultramicrotomo (Reichert) para a obtenção de seções finas (aproximadamente 1 µm de espessura). A caracterização morfológica das células corticais foi realizada utilizando um microscópio óptico Zeiss Axioplan 2 (IBCCF-UFRJ) ajustado para observação no modo de contraste diferencial interferencial (DIC). Também foram observadas células vivas ao microscópio óptico. As imagens obtidas foram digitalizadas com uma câmera CCD Color View XS.

##### 10.1.1.2. Microscopia óptica de fluorescência

A microscopia óptica de epi-fluorescência foi realizada com o objetivo de obter imagens a partir da auto-fluorescência das amostras que indicassem a localização dos metabólitos halogenados. Amostras fixadas de *L. obtusa* embebidas em resina Spurr foram seccionadas em um ultramicrotomo (Reichert) para a obtenção de seções finas (aproximadamente 1 µm de espessura). As imagens de auto-fluorescência foram obtidas utilizando comprimento de onda de

excitação de ~ 488 nm e utilizando o microscópio Zeiss Axioplan 2 (IBCCF-UFRJ). As imagens obtidas foram digitalizadas com uma câmera CCD Color View XS.

#### 10.1.1.3. Microscopia de pinças ópticas

A microscopia de pinças ópticas foi utilizada para manipular os corpos em cereja em células vivas e observar como esta organela é suportada estruturalmente no espaço intra-celular. Fragmentos de tecido vivo foram analisados no microscópio Nikon Eclipse TE300 como descrito no item 9.5.1.3. O experimento foi realizado a temperatura de 20 °C. As amostras foram observadas em campo claro com uma lente objetiva Plan Apo, 100X, NA 1.4. As imagens digitalizadas foram obtidas com uma câmera CCD conectada a um sistema Argus-20 (Hamamatsu, Japan) e a um capturador de quadros ("frame grabber") LG3-16 PCI CCIR Scion. As imagens obtidas foram processadas e analisadas utilizando o programa ImageJ *freeware* (NIH – USA).

#### **10.1.2. Microscopia eletrônica**

Para a caracterização ultra-estrutural, cortes ultrafinos (70 nm) foram obtidos utilizando um ultramicrotomo (Reichert) a partir das amostras fixadas e infiltradas em resina epóxi SPURR. Os cortes foram recolhidos em grades de cobre de 300 mesh. As grades foram observadas contrastadas com acetato de uranila 5% por 40 minutos e citrato de chumbo 2% por 3 minutos e posteriormente observadas no microscópio eletrônico de transmissão JEOL 1200 EX (IBCCF-UFRJ) operado a 80 kV.

#### **10.2. Isolamento dos *corpos em cereja***

Os corpos em cereja de *L. obtusa* foram isolados utilizando o sistema de micromanipulação Narishige IM 300 montado a um microscópio invertido Nikon Eclipse TS100 (Laboratório de Biologia Molecular do Desenvolvimento - Prof. Helena Araújo/ICB-UFRJ) Micropipetas de vidro (ponta de ~ 10 µm de diâmetro) acopladas a um sistema de controle de pressão manual foram utilizadas para aspirar os corpos em cereja a partir de células vivas. As

micropipetas de vidro confeccionadas utilizando um *cooler* a partir de capilares Stoelting 50615. O conteúdo aspirado foi solubilizado em solução tampão fosfato salino 0,1M pH 7,3 NaCl 0,9 % e transferida para uma grade de microscopia eletrônica (níquel de 300 *mesh* recoberta com filme de formvar e filme fino de carbono). Após 5 minutos, a grade foi lavada com água destilada e a água restante removida com papel de filtro.

### **10.3. Micro-análise de raios-X dos corpos em cereja**

A microanálise de raios-X (EDXA) foi realizada nos corpos em cereja para verificar a presença do bromo dentro dos corpos em cereja. As grades foram analisadas em um microscópio eletrônico de transmissão JEOL 2000 EX TEM equipado com o sistema analítico Noran-Voyager (COPPE, UFRJ), onde também foram obtidas imagens das organelas isoladas. O controle foi feito realizando a microanálise de raios-X em regiões da mesma grade, não ocupadas pelos corpos em cereja. A configuração típica para a aquisição dos espectros foi: aceleração de voltagem, 100 kV; tempo de aquisição, 100 s; *deadtime*, 10 %; e largura do feixe de elétrons, cerca de 50 nm (diâmetro).

### **10.4. Vídeo-microscopia**

A análise por vídeo-microscopia foi utilizada para registrar a relação dinâmica dos *corpos em cereja* como toda a célula. Fragmentos de tecido vivo foram analisados em um microscópio Nikon Eclipse TE300 (COPEA-UFRJ). A amostra foi mantida em temperatura constante (20 °C) e observada nos modos campo claro e DIC através de uma lente objetiva Plan Apo, 100X, NA 1.4. As imagens foram digitalizadas, processadas e analisadas utilizando o programa ImageJ *freeware* (NIH – USA).

### **10.5. Reconstrução tri-dimensional**

Cortes seriados de células corticais de *L. obtusa* foram utilizados para realizar a reconstrução tri-dimensional das estruturas membranosas associadas aos *corpos em cereja*.

Seqüências de cortes ultra-finos (70 nm) foram coletadas em grades de cobre (Single Slot Oval Hole – VECO, número de referência 2015-Cu) recobertas com formvar, as quais foram observadas no microscópio eletrônico de transmissão JEOL 1200 EX. A série de micrografias obtidas foi impressa numa magnificação final de 100.000 x. As estruturas analisadas foram circum-escritas em cada micrografia com cores distintas e cada plano foi traçado separadamente utilizando uma mesa gráfica (Numonics 2205). Um programa de reconstrução 3-D e de morfometria foi utilizado (Young *et al.*, 1987). Este programa fornece o perímetro e a área dos perfis digitalizados, e este dado foi utilizado para calcular o volume das estruturas celulares. Os dados dos arquivos resultantes consistiram em contornos traçados representando as secções dos objetos de interesse com seus volumes. Os arquivos foram transferidos para uma estação de trabalho Silicon Graphics e as superfícies entre os planos foram geradas utilizando o programa SYNU (Synthetic Universe). Na estação de trabalho, as imagens obtidas foram renderizadas e, posteriormente, foram gravadas. O experimento foi realizado de acordo com Rocha *et al.* (2006).

## RESULTADOS

## 11. ALGAS PARDAS

### 11.1. A absorção de metais pesados pelas algas pardas

#### 11.1.1. Microscopia óptica de fluorescência

Os crio-cortes de indivíduos jovens de *P. gymnospora* (figuras 1a-d) tratados com UEA e conjugados a FITC apresentaram uma intensa marcação nas paredes de células corticais e medulares (figuras 1a-d). Nas paredes, as regiões preferencialmente marcadas foram aquelas mais próximas a membrana plasmática e, também, na camada mais externa de paredes periclinais de células corticais (figuras 1c-d). A fluorescência também foi observada dentro das células em regiões periféricas ao núcleo correspondendo aos fisóides (figuras 1a-d). Os experimentos controle não apresentaram fluorescência significativa.

Nos cortes não tratados com vapor de tetróxido de ósmio e não incubados com as lectinas conjugadas a FITC, a fluorescência (auto-fluorescência das substâncias fenólicas) foi majoritariamente observada a partir dos fisóides. Entretanto, também foi possível observar uma fraca auto-fluorescência, porém específica, nas paredes de células apicais e corticais (figura 2).

A utilização de *Concanavalina A* não resultou em marcações significativas por microscopia óptica de fluorescência, sendo desconsiderada a necessidade da demonstração desses resultados.

#### 11.1.2. Microscopia eletrônica de transmissão

A utilização das lectinas conjugadas a partículas de ouro coloidal permitiu a visualização mais acurada dos monossacarídeos nas paredes celulares (figuras 3a-b). O padrão da distribuição de fucose ao longo das paredes celulares foi observado utilizando a microscopia eletrônica de transmissão. A marcação foi preferencialmente observada nas camadas externas das paredes e nas regiões próximas a membrana plasmática (figuras 3a-b).

Também foi observada uma intensa marcação de  $\alpha$ -L-fucose nos fisóides (figura 4a). Outras organelas como o núcleo e os cloroplastos não apresentaram uma marcação significativa. A marcação da lectina Concanavalina A foi bem menos intensa do que a marcação para  $\alpha$ -L-fucose. Nas paredes celulares não foi observado qualquer padrão de marcação, a qual foi classificada como pouco freqüente e dispersa. Nos fisóides, a marcação de resíduos terminais de  $\alpha$ -D-manosil e  $\alpha$ -D-glicosil foi fraca (figura 4b), mas com o mesmo padrão da marcação de  $\alpha$ -L-fucose. O experimento controle (lectinas puras) confirmou a especificidade da marcação devido à ausência de partículas nas estruturas celulares.

### 11.1.3. Microanálise de Raios-X

As análises das paredes celulares e fisóides, por EDXA, revelaram a presença do elemento zinco nas algas provenientes do local contaminado por metais, a baía de Sepetiba (figuras 5a-b). Os elementos C, O, Na, Si, S, Cl, K e Ca também foram detectados nessas organelas. O pico de cobre no espectro foi proveniente da composição da coluna do microscópio eletrônico.

## 11.2. Caracterização de moléculas

### 11.2.1. Substâncias fenólicas de *P. gymnospora*

As substâncias fenólicas extraídas de *P. gymnospora* foram eluídas a partir da coluna C-18 com concentrações de etanol de 25-30 %. O espectro de absorção de UV das substâncias fenólicas revelou que absorvem principalmente a 210 nm (figura 6). Em SEC, as substâncias fenólicas foram eluídas sempre próximo ao  $V_t$  (figuras 7a-b) das colunas utilizadas (Superose 6 e Sepharose CL4B) sendo seu peso molecular estimado em ~10 KDa. Não foram detectados resíduos de ácidos urônicos nas frações obtidas a partir da SEC (figura 7a). A partir da comparação com dados já reportados na literatura (Gerwick & Fenical, 1982; Tringali & Piattelli, 1982; Blackman *et al.*, 1988), a análise dos espectros de NMR de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  revelaram que os

principais componentes das substâncias fenólicas isoladas de *P. gymnospora* são uma mistura complexa de derivados de C-acilfloroglucinóis (figura 8).

### **11.2.2. Polissacarídeos de *P. gymnospora***

O fracionamento dos polissacarídeos totais de *P. gymnospora* utilizando a coluna mono-Q resultou em três diferentes frações (figura 9). A fração eluída em menor concentração de NaCl apresentou reação positiva para a dosagem de ácidos urônicos (como indicado pela reação de carbazol) e não apresentou propriedade metacromática para a reação com o DMB, sendo um indicativo que contém alginato, mas não contém grupos sulfatados. A fração eluída em maior concentração de NaCl apresentou uma intensa metacromasia e uma fraca reação para a dosagem de ácidos urônicos. Desta forma, foi considerado que esta fração poderia conter fucanas sulfatadas. A eletroforese em gel de agarose destes polissacarídeos (figura 10) indicou a pureza destes dois polissacarídeos. A análise do gel de eletroforese revelou também que a fração 3 é a mais impura devido à tendência da banda ao arraste. Nesta terceira fração pôde ser detectada a presença tanto de ácidos urônicos quanto de moléculas sulfatadas. Os monossacarídeos presentes nestas três amostras detectados por cromatografia em papel foram ácidos urônicos na fração 1, altas concentrações de fucose e menores de galactose na fração 2 e ácidos urônicos, fucose e galactose na fração 3. A análise por SEC da fração 1 (denominada alginato de *P. gymnospora* ou ALG-Pg) com as colunas Superose 6 e Sepharose CL4B revelou que esta fração apresenta um elevado peso molecular (~ 5000 KDa, figuras 11a-b). Curiosamente, através da leitura da absorvância das amostras a 210 nm, foram detectadas concentrações significativas de substâncias fenólicas nesta fração mesmo após o término dos processos de purificação (figuras 11a-b).

### **11.2.3. Polissacarídeos de *F. vesiculosus***

Uma caracterização inicial do alginato extraído de *F. vesiculosus* (Sigma-Aldrich) por cromatografia de filtração em gel revelou que este polissacarídeo não estava puro e os principais contaminantes foram as fucanas sulfatadas. Logo, uma parte da fração com menos fucanas

sulfatadas foi dializada e liofilizada e re-analisada com a mesma coluna. Em ambas as colunas (Superose 6 e Sepharose CL4B), o peso molecular do alginato purificado foi de aproximadamente 5000 KDa (figuras 12a-b). A determinação da composição monossacarídica revelou que esta fração apresentava altos níveis de ácidos urônicos e baixíssimos níveis de fucose. A medida da absorvância a 210 nm mostrou que os níveis de substâncias fenólicas nesta amostra era insignificante (figura 6).

### **11.3. Absorção de UV por substâncias fenólicas**

#### **11.3.1. Cromatografia de separação por peso molecular**

A análise da fração ALG-Pg revelou que as substâncias fenólicas encontradas nesta amostra apresentaram um perfil de eluição totalmente coincidente com o do ácido urônico (figuras 11a-b). É importante lembrar que, quando puros, as substâncias fenólicas apresentam baixo peso molecular (ver figuras 7a-b). Desta forma, confirmou-se que as substâncias fenólicas e os alginatos estão fortemente ligados um ao outro devido à observação de um complexo de alto peso molecular (figuras 11a-b).

#### **11.3.2. Ensaios de absorção de UV pelas substâncias fenólicas**

Inicialmente, é importante destacar que independente do grau de interação estabelecido com os alginatos de diferentes origens (de *P. gymnospora* ou de *F. vesiculosus*) ou se analisados puros, as substâncias fenólicas não apresentaram deslocamento do pico máximo de absorção (210 nm) (figura 6).

Foi possível verificar que a capacidade das substâncias fenólicas puras de absorverem a radiação UV decresceu significativamente ao longo do tempo (figura 13). Depois de 72 horas, a absorvância a 210 nm caiu aproximadamente 14 %. Curiosamente, a propriedade de absorção de UV das substâncias fenólicas constituintes do complexo de alto peso molecular isolado de *P. gymnospora* (ligados aos alginatos) foi fortemente modificada (figura 13). Nessa fração, a

absorção de radiação UV decresceu aproximadamente 7%, revelando que a ligação com os alginatos pode contribuir para preservar a propriedade de absorção de UV das substâncias fenólicas. Surpreendentemente, a adição do alginato purificado de *F. vesiculosus* às soluções de substâncias fenólicas provocou maiores quedas na capacidade de absorção de radiação UV ao longo do tempo (figura 13). Após 72 horas, a capacidade das substâncias fenólicas presentes nesta solução de absorverem o comprimento de onda de 210 nm caiu 18 %.

### **11.3.3. Influência do pH na capacidade de absorção de UV pelas substâncias fenólicas**

Foi observado que as substâncias fenólicas de *P. gymnospora* diluídos em água destilada apresentavam propriedade acidificantes devido ao seu potencial redutor e que, até concentrações baixas concentrações, como 10 µg/mL, podem modificar significativamente o pH da solução (figura 14). Por outro lado, foi registrado potencial alcalinizante para o alginato purificado de *F. vesiculosus* (figura 14), e quando misturado às substâncias fenólicas, poderia atuar como um tampão para a solução (figura 14).

Em ensaios de absorção de UV com substâncias fenólicas puras onde o pH das soluções foi modificado (valores de 5, 6, 7, 8 e 9) observou-se que a capacidade das substâncias fenólicas de absorverem a radiação UV (210 nm) decresceu menos nas soluções ácidas do que nas básicas.

## **11.4. Mineralização e substâncias fenólicas**

Os experimentos controle para o crescimento de cristais de carbonato de cálcio *in vitro* produziram cristais de calcita (figuras 15a-b). Nos experimentos onde foram acrescentados as substâncias fenólicas, as fucanas sulfatadas e os alginatos, também foram formados cristais de calcita (figuras 15c-f). Os cristais de calcita crescidos em soluções de alginato e fucanas sulfatadas apresentaram aspecto arredondado, inúmeras novas faces cristalinas em lugar dos vértices e arestas originais (figuras 15c-d). Por outro lado, cristais de calcita crescidos na presença de substâncias fenólicas apresentaram formato diferenciado, onde o crescimento de

algumas faces cristalinas foi inibido especificamente (figuras 15e-f). Também foi possível observar diversos cristais geminados quando as substâncias fenólicas foram adicionados nas soluções para a cristalização *in vitro* (figura 15).

## 11.5. Interações entre substâncias fenólicas e alginatos

### 11.5.1. A enzima VBPO e a ligação entre substâncias fenólicas e alginatos

#### 11.5.1.2. Formação de complexos de alto peso molecular constituídos por CF e ALG

A cromatografia de separação por peso molecular (SEC) do alginato isolado de *P. gymnospora* revelou, como dito anteriormente, que as substâncias fenólicas co-eluíram com o alginato, próximo do  $V_0$  da coluna e coincidente com o pico de ácidos urônicos (figuras 11a-b). Este resultado confirmou que as substâncias fenólicas presentes nesta fração estão associadas aos alginatos, e que este complexo não foi dissociado durante os procedimentos de extração e purificação. Em contraste com este resultado, o alginato purificado de *F. vesiculosus* não continha substâncias fenólicas associadas (figuras 12a-b). Logo, a preparação de uma fração purificada de alginato purificado de *F. vesiculosus* é apropriada para a realização de testes *in vitro* visando mimetizar e avaliar as interações dos compostos fenólicos com o alginato. Numa tentativa inicial de detectar a possível formação de complexos de substâncias fenólicas com alginatos, foram incubadas estas duas moléculas a 30 °C por 12 horas e, então, analisadas por SEC (figura 16). Nenhuma evidência da formação de complexos moleculares foi obtida desde que as substâncias fenólicas e os alginatos continuaram a serem eluídos separadamente (figura 16). Entretanto, quando a enzima VBPO foi adicionada à mistura de incubação com substâncias fenólicas e alginatos, e os produtos analisados por SEC, foi possível detectar claramente a formação de complexos de alginatos e substâncias fenólicas, os quais foram revelados pela co-eluição das duas moléculas próximas ao  $V_0$  da coluna (figura 17). Em experimentos controle, quando BSA substituiu a VBPO, obteve-se uma cromatografia similar a da observada na figura 16 onde não houve formação de complexos de alto peso molecular. Quando o alginato foi incubado apenas

com a enzima, também não foi possível observar qualquer material sendo co-eluído com os alginatos (figura 18).

#### 11.5.1.3. Medidas de viscosidade

Soluções de substâncias fenólicas analisados com a pinça óptica apresentaram valores médios de viscosidade de  $1,0 \pm 0,1$  cPoise, enquanto que o alginato de *F. vesiculosus* apresentou valores médios de viscosidade de  $6,7 \pm 0,5$  cPoise (tabela 1). A adição de substâncias fenólicas as soluções de alginato de *F. vesiculosus* não provocou queda significativa ( $p > 0,05$ ) nos valores de viscosidade (tabela 1). A amostra de alginato isolado de *P. gymnospora* apresentou valores de viscosidade próximos a 1 cPoise (tabela 1), os quais foram similares aos de substâncias fenólicas e significativamente diferentes dos obtidos a partir da análise do alginato de *F. vesiculosus* ( $p < 0,05$ ).

Quando a solução de alginato de *F. vesiculosus* foi misturada às substâncias fenólicas na presença da enzima VBPO, a viscosidade caiu significativamente ( $p < 0,05$ , ver figura 19 e tabela 1) comparativamente aos valores obtidos da análise do alginato de *F. vesiculosus* misturado com às substâncias fenólicas e sem a adição de VBPO (figura 19 e tabela 1).

## 12. ALGAS VERMELHAS

### 12.1. Microscopias óptica e eletrônica

#### 12.1.1. Microscopia óptica

##### 12.1.1.1. Caracterização estrutural

A presença dos corpos em cereja é restrita as células corticais e aos tricoblastos (figuras 20a-b). Foram encontrados em número variando de 1 a 2 (eventualmente 3) por célula (figuras 20a-b). Imagens de amostras vivas obtidas de células corticais e dos tricoblastos observadas em visão superficial revelaram a presença de conexões tipo-membranares emergindo dos corpos em cereja em direção a periferia da célula (figuras 20b-d).

##### 12.1.1.2. Microscopia óptica de fluorescência

As imagens de DIC e de fluorescência das células corticais foram obtidas somente após o procedimento de fixação das amostras, revelando que a auto-fluorescência observada pode ter sido gerada como consequência de modificações na estrutura dos compostos halogenados, as quais foram causadas possivelmente pelos fixadores utilizados (glutaraldeído ou tetróxido de ósmio). No modo DIC (figura 21a), podem ser visualizados os corpos em cereja, vesículas distribuídas ao longo do espaço intracelular e os cloroplastos na periferia da célula. Através da análise das imagens de DIC pode ser observado que os corpos em cereja apresentam-se delimitados por duas membranas (figura 21a). Quando a imagem de auto-fluorescência (figura 21b) é sobreposta a imagem de DIC, podem ser observadas regiões de auto-fluorescência correspondentes à parte central dos corpos em cereja e as vesículas distribuídas ao longo do citoplasma (figura 21c). Adicionalmente, também pôde ser observada a auto-fluorescência em regiões específicas e pontuais dentro dos cloroplastos (figura 21c). Em células vivas, as imagens de auto-fluorescência não foram suficientes para indicar a localização provável dos compostos halogenados.

### 12.1.1.3. Microscopia de pinças ópticas

Os resultados da microscopia de pinças ópticas indicaram que os corpos em cereja encontram-se estruturalmente fixados a periferia da célula por um único ponto de ligação. Apesar do movimento do feixe de LASER ter sido realizado em duas diferentes direções (ao longo dos eixos x e y), os corpos em cereja puderam ser movidos apenas em uma única direção, acompanhando o eixo y (figuras 22a-b). Este movimento foi observado como uma rotação angular do corpo em cereja emergindo de um ponto específico da sua membrana externa (ver asterisco nas figuras 22a-b). Para evidenciar o movimento do corpo em cereja, a movimentação angular desta organela provocada pela ação do LASER foi medida. Uma linha continua foi traçada em paralelo com a base da figura em direção a um ponto específico dentro da célula (linha 'a'). Outra linha representou o diâmetro do corpo em cereja e foi traçada em direção a um ponto específico da organela (linha 'b'). Este ponto foi utilizado como referência para evidenciar o deslocamento do corpo em cereja causado pela pinça óptica. Após a manipulação com o feixe LASER, este ponto específico foi deslocado em consequência e uma nova linha foi traçada em direção a este ponto (denominada linha 'b'). O movimento da organela foi determinado através da medida da diferença de ângulos formados entre as linhas 'a' e 'b' ('b' ou 'b'). O ângulo formado entre as linhas 'a' e 'b' ( $\alpha$ ) foi de  $\sim 13^\circ$ , enquanto que o ângulo medido entre as linhas 'a' e 'b' ( $\beta$ ) foi de  $\sim 19^\circ$ , indicando um movimento angular causado pelo laser de  $\sim 6^\circ$ . Adicionalmente, foi observado que as conexões tipo-membranares previamente mencionadas também foram deslocadas, acompanhando o movimento do corpo em cereja (ver cabeças de seta nas figuras 22a-b).

### **12.1.2. Microscopia eletrônica**

A ultraestrutura celular foi bem preservada e diversas estruturas foram bem visualizadas, como o núcleo, os cloroplastos (figura 23a) e os corpos em cereja puderam ser visualizados (figuras 23a-b). Os resultados obtidos indicaram que, de fato, os corpos em cereja encontram-se localizados na região central da célula e que estão aparentemente circunscritos por um único compartimento vacuolar (figura 23a). O conteúdo dos corpos em cereja aparece homogêneo e

elétron-denso (figura 23b). Imagens magnificadas dos *corpos em cereja* confirmaram que duas membranas delimitam o conteúdo dos corpos em cereja (figura 23b). Pequenas vesículas elétrondensas foram observadas no espaço compreendido pelas duas membranas mencionadas (figura 23b). Vesículas similares foram observadas distribuídas ao longo do citoplasma (figura 23a) e associadas às paredes celulares (figuras 23a-d), bem como inclusões dentro dos cloroplastos (figuras 26a-c). Uma análise fina revelou que estas vesículas associadas às paredes celulares estão provavelmente relacionadas a um processo de exocitose de algum composto em direção a superfície do talo da alga, devido à observação de um processo de liberação de agregados nanométricos a partir do seu conteúdo interno (figura 23d).

## 12.2. Isolamento dos corpos em cereja

A micromanipulação foi adequada para o isolamento de um número suficiente de corpos em cereja para a caracterização morfológica e para a caracterização da composição da organela por EDXA. Os corpos em cereja foram mantidos bem preservados e apresentaram conteúdo homogêneo sob visualização no microscópio eletrônico de transmissão, sem a presença de corpos vesiculares ou domínios internos de membrana na sua estrutura interna (figura 24a).

## 12.3. Microanálise de raios-X dos corpos em cereja

O espectro de EDXA do extrato do elatol de *L. obtusa* revelou a presença do bromo na sua composição elementar (figura 24b) devido à observação de picos de emissão característicos ( $K\alpha=11.90$  e  $K\beta=13.38$  keV). Desta forma, evidenciou-se a sensibilidade do método para a detecção do bromo nas células de *L. obtusa*. Quando o EDXA foi realizado nos corpos em cereja isolados, foram detectados os mesmo picos de emissão do bromo detectados no elatol extraído, confirmando a presença do bromo nessa estrutura (figura 24c). Os elementos Na ( $K\alpha=1.04$  keV), P ( $K\alpha=1.74$  keV), S ( $K\alpha=2.31$  keV), Cl ( $K\alpha=2.62$  keV), K ( $K\alpha=3.31$  keV) e Ca ( $K\alpha=3.69$  keV) também foram detectados (figura 24c). Os picos de níquel ( $K\alpha=7.47$  keV) e de cobre ( $K\alpha=8.04$  e

$K\beta=8.91$  keV) observados foram originados da grade e da coluna do microscópio, respectivamente (fig. 24c).

#### **12.4. Vídeo-microscopia**

A observação de amostras vivas de *L. obtusa* através da captura de imagens seqüências por vídeo-microscopia (10 quadros por minuto) revelou a ocorrência de dois processos celulares; o transporte vesicular a partir dos corpos em cereja para as paredes celulares e a degradação de corpos em cereja relacionada à morte celular. Foi registrado que o transporte de vesículas entre os corpos em cereja e a periferia da célula ocorre ao longo de conexões tipo-membranares e parece ocorrer em uma única direção, dos corpos em cereja para a parede celular (ver setas nas figuras 25a-f).

Diferentes mecanismos de degradação dos corpos em cereja foram identificados. No primeiro, foi observado em células corticais um evento aparentemente não-sincrônico de morte celular, no qual o conteúdo destas células tornou-se gradualmente danificado. Foi observado também a fragmentação dos corpos em cereja produzindo vários agregados de pequenas vesículas (figuras 26a-c). No segundo processo, um movimento rápido e simultâneo dos corpos em cereja ao longo da célula foi registrado, o qual durou aproximadamente 300 segundos (figuras 27a-f). Estes corpos em cereja não apresentaram o processo de fragmentação como no processo mencionado anteriormente. Os corpos movimentaram-se em direção à periferia do vacúolo e em seguida, de maneira sincrônica, liberaram seus conteúdos causando a retração e o rompimento da membrana do vacúolo (figuras 27a-f). Por fim, o processo de morte celular foi completado quando foram observadas alterações no aspecto do citoplasma e grandes alterações na morfologia dos cloroplastos, indicando a perda da integridade destas organelas (figura 27f).

#### **12.5. Reconstrução tri-dimensional**

A realização de cortes seriados analisados na microscopia eletrônica de transmissão confirmou a existência de conexões membranas entre os corpos em cereja e a periferia da célula

(figuras 28a-c). A reconstrução tri-dimensional revelou que uma estrutura tubular membranosa conecta a membrana externa do corpo em cereja a membrana vacuolar adjacente ao citoplasma periférico (figuras 28d-e). Foi possível observar uma vesícula dentro da conexão tubular membranosa, indicando que estaria sendo transportada em direção ao citoplasma periférico (ver setas nas figuras 28d-e).

## FIGURAS

Figura 1: Localização de  $\alpha$ -L-fucose em cortes longitudinais da alga parda *Padina gymnospora*. a) Imagem de microscopia óptica de contraste diferencial interferencial (DIC) de um criocorte transversal (barra=60  $\mu$ m); b) Imagem de microscopia óptica de fluorescência do mesmo criocorte observado na figura A revelando a marcação intensa da lectina *Ulex europaeus* contra a  $\alpha$ -L-fucose; c) Detalhe da imagem mostrando as paredes celulares (cabeças de setas), fisóides (P), e a região nuclear (N) (barra=30  $\mu$ m); d) Mesma região observada na figura C observada por microscopia óptica de fluorescência revelando a intensa marcação da  $\alpha$ -L-fucose nas paredes celulares e na região perinuclear, possivelmente nos fisóides.

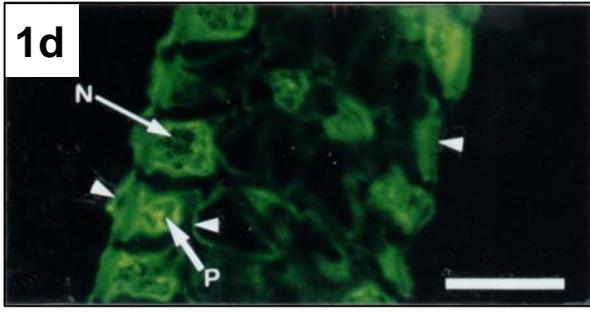
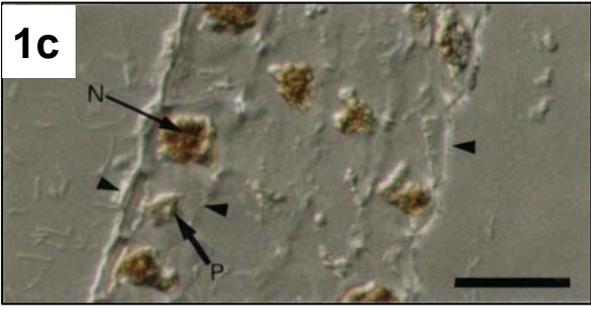


Figura 2: Imagem de microscopia óptica de fluorescência revelando a emissão da auto-fluorescência tipicamente observada em um corte longitudinal de um indivíduo jovem da alga parda *P. gymnospora*. Notar a intensa emissão nas paredes celulares das células apicais (setas) (barra=40  $\mu\text{m}$ ).

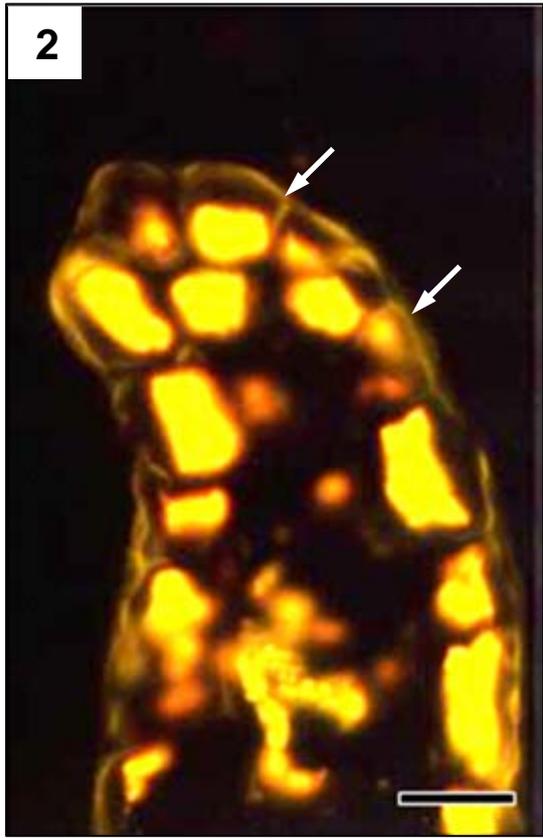


Figura 3: Marcação da  $\alpha$ -L-fucose na alga parda *P. gymnospora* observada através da microscopia eletrônica de transmissão (MET). Em 'a' e 'b' é possível observar uma intensa marcação das paredes celulares com a lectina *Ulex europaeus* conjugada às partículas de ouro coloidal (10 nm). A marcação é especialmente acentuada nas camadas externas da parede celular (setas) e na região próxima a membrana citoplasmática (cabeças de seta) (barras=100 nm).

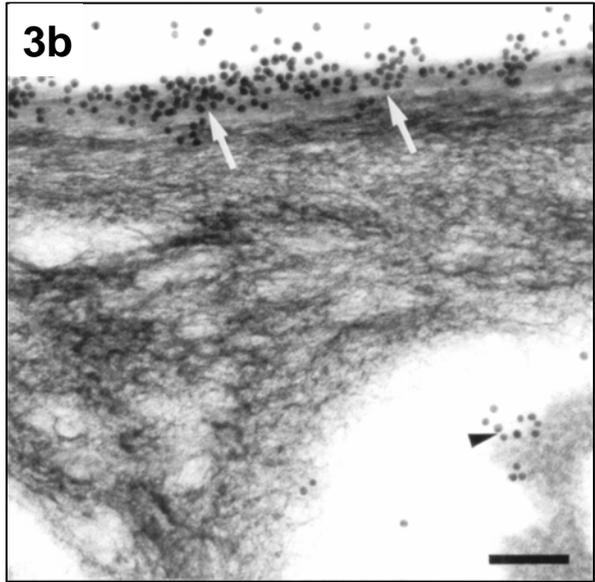
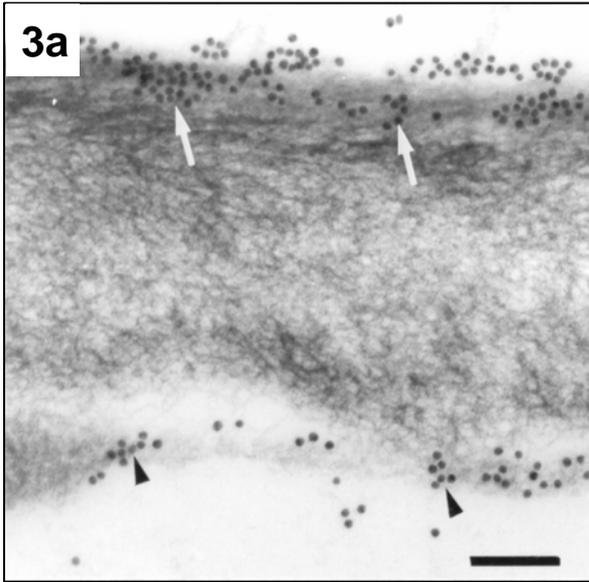


Figura 4: Marcação das lectinas *Ulex europaeus* e Concanavalina A na alga parda *P. gymnospora* na região dos fisóides observada através da microscopia eletrônica de transmissão (MET). A) Marcação intensa de  $\alpha$ -L-fucose; b) Na marcação com a lectina Concanavalina A, pode-se observar uma marcação fraca e dispersa (barras = 200 nm).

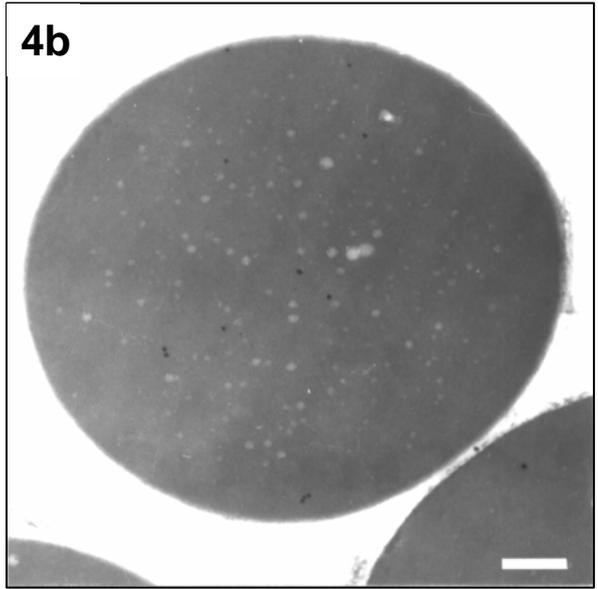
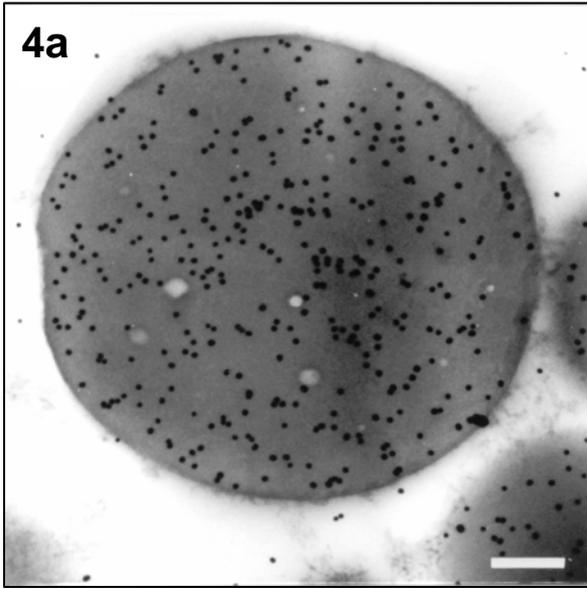
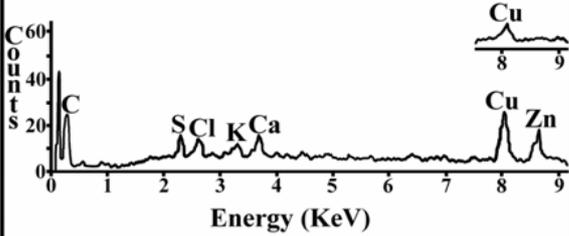


Figura 5: Espectros de EDXA da alga parda *P. gymnospora*. a) Espectro de um fisóide da alga coletada em um ambiente contaminado por metais pesados (Baía de Sepetiba). O espectro mostra a presença de C ( $K\alpha=0.27$  keV), Cl ( $K\alpha=2.62$  keV), K ( $K\alpha=3.31$  keV), S ( $K\alpha=2.30$  keV), Ca ( $K\alpha=3.69$  keV) and Zn ( $K\alpha=8.63$  keV). O inserte corresponde ao controle, mostrando que o Zn não foi detectado em amostras de locais não contaminadas. b) Espectro da parede celular mostrando a detecção do Zn em uma amostra de local contaminado e a ausência no Zn em plantas do local controle (inserte). O espectro mostra a presença de C ( $K\alpha=0.27$  keV), O ( $K\alpha=0.52$  keV), Na ( $K\alpha=1.04$  keV), Si ( $K\alpha=1.74$  keV), S ( $K\alpha=2.30$  keV), Ca ( $K\alpha=3.69$  keV and  $K\beta=4.01$  keV) and Zn ( $K\alpha=8.63$  keV). A detecção do Cu ( $K\alpha=8.04$  keV) é devida à presença deste elemento na composição da coluna do microscópio.

5a



5b

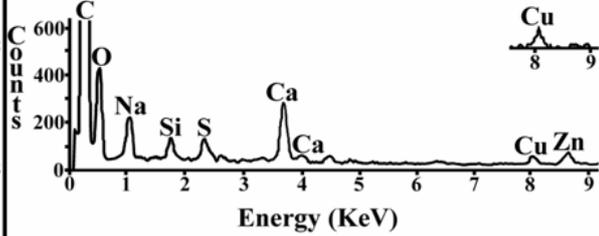
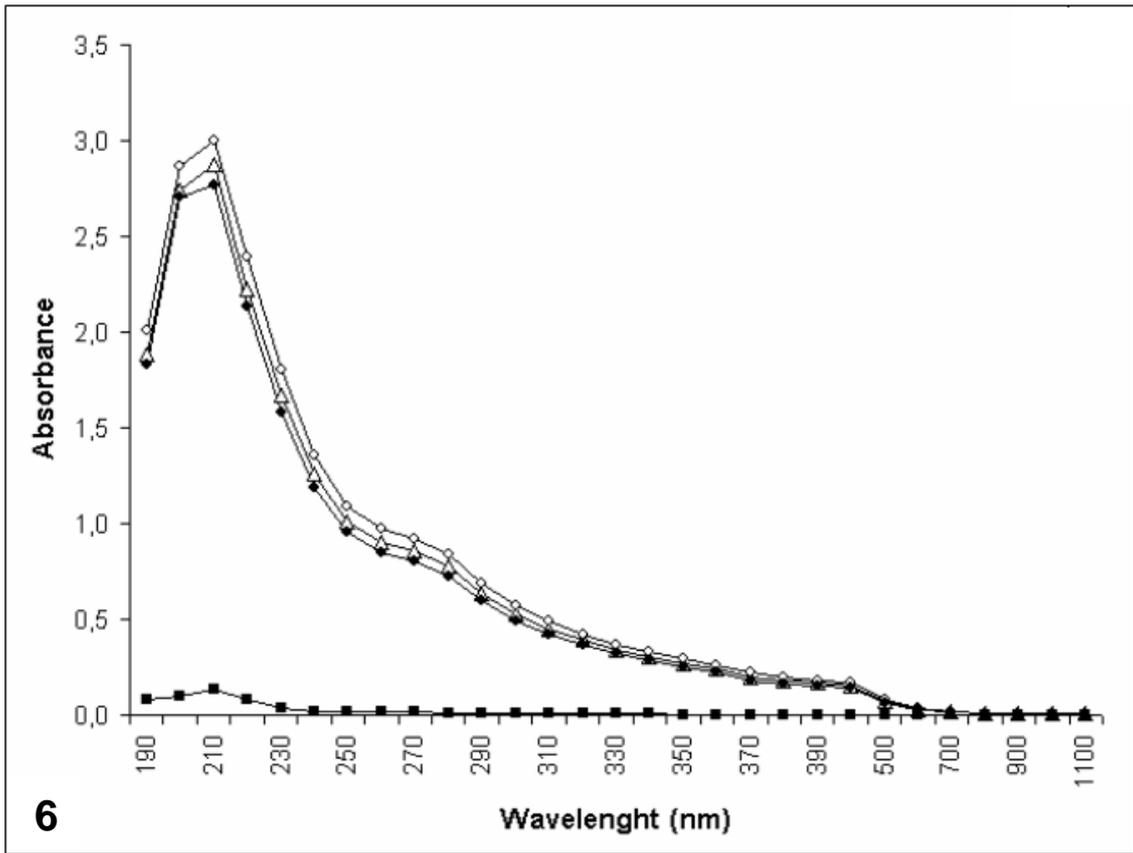


Figura 6: Espectro de absorção UV-VIS-IV obtido a partir da análise de alginatos e compostos fenólicos. Pode ser observado que o espectro de compostos fenólicos purificados de *P. gymnospora* (●) é muito similar aos daquele obtido a partir da análise do alginato isolado de *P. gymnospora* associado a compostos fenólicos (△), e similar também à fração de alginatos purificados de *F. vesiculosus* misturada a compostos fenólicos (○). Os alginatos purificados de *F. vesiculosus* quando analisados puros (■) não apresentaram absorção significativa das radiações UV-VIS-IV.



**6**

Figura 7: Cromatografias de separação por peso molecular de compostos fenólicos isolados de *P. gymnospora*. Em 'a' e 'b' é possível observar duas cromatografias utilizando as colunas Sepharose CL4B e Superose 6 onde as setas indicam, em ambas, o  $V_0 = 5000$  kDa e o  $V_t = 5$  kDa das colunas, respectivamente. As frações foram checadas para a detecção de ácidos urônicos ( $\square$ ) e compostos fenólicos ( $\bullet$  ou linha contínua). Note que em ambos os cromatogramas a eluição ocorreu próxima ao  $V_0$  das colunas, revelando o baixo peso molecular dos compostos fenólicos.

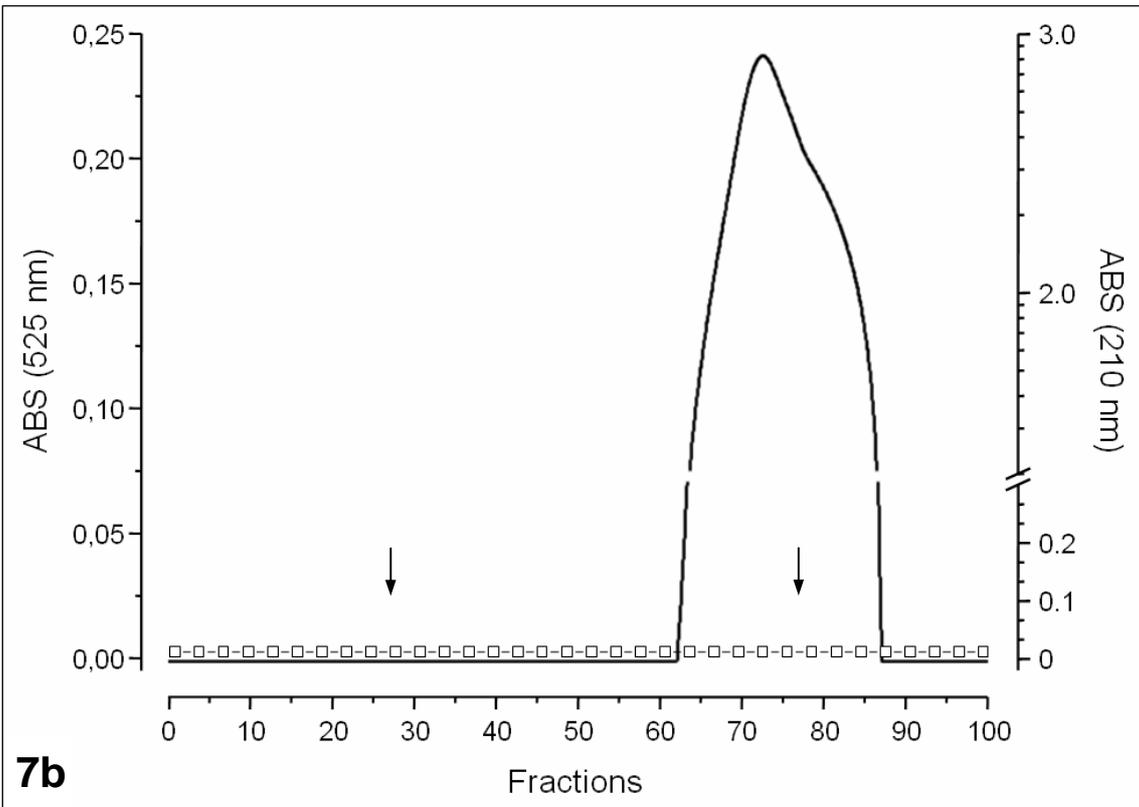
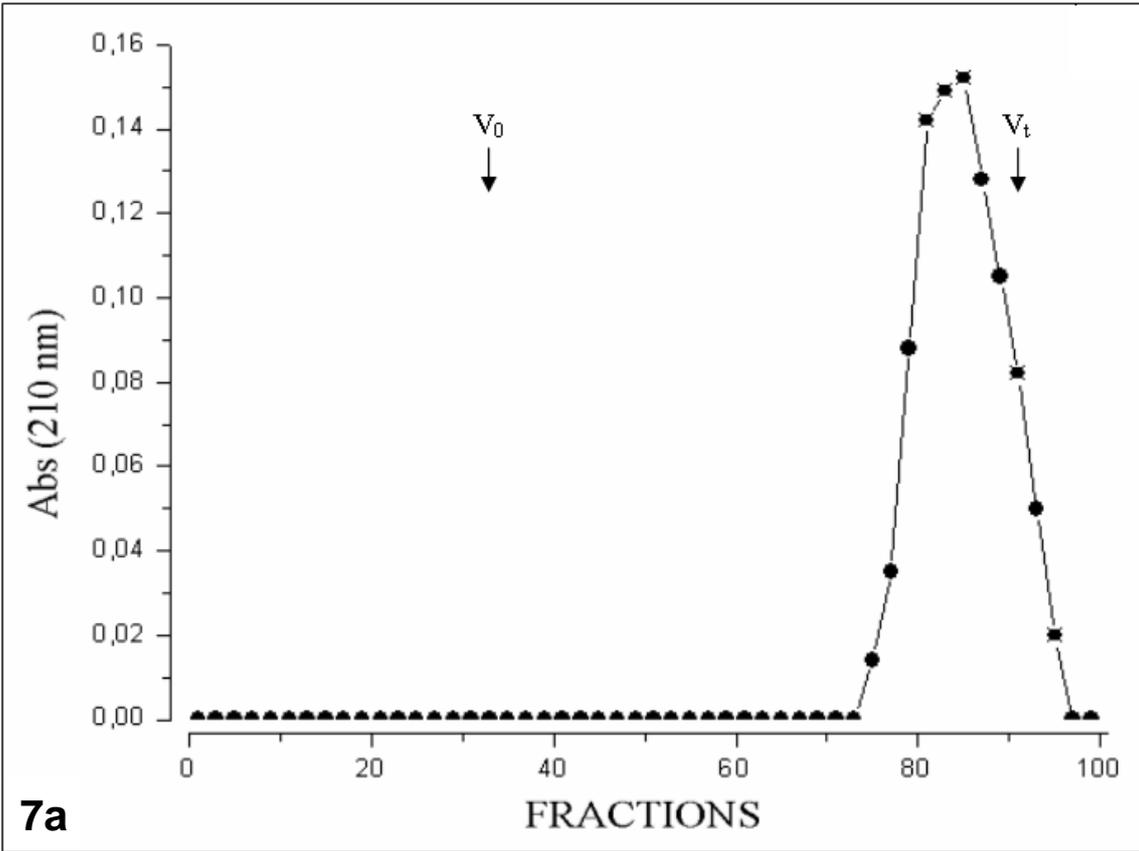


Figura 8: a) Espectro de  $^1\text{H}$  de ressonância magnética nuclear de substâncias fenólicas purificadas de *Padina gymnospora*. Picos identificados nos espectros: 0.92 (3H, t, J =7.0) -  $\text{CH}_3$  terminal da cadeia lateral; 1.29 (22H, m) -  $\text{CH}_2$  da cadeia lateral; 1.66 (2H, m) -  $\text{CH}_2$  da cadeia lateral; 2.05 (2H,m) -  $\text{CH}_2$  da cadeia lateral; 3.24 (2H, t, = 7.0) -  $\text{CH}_2$  próximos à carbonila; 5.92 (1H,d, J = 1.5 Hz) - H aromático; 6.02 (1H, d, J = 1.5 Hz). - H aromático. b) Estrutura molecular do 2-(1'-Oxo-hexandecil)-1,3,5-trihidroxibenzeno, molécula derivada do floroglucinol que constitui majoritariamente as substâncias fenólicas isoladas de *P. gymnospora* observada nos espectros de  $^1\text{H}$  NMR.



Figura 9: Cromatografia de troca iônica dos polissacarídeos totais extraídos de *Padina gymnospora* realizada em uma coluna Mono-Q (Pharmacia®) acoplada a um FPLC (Amersham Pharmacia Biotech®). As frações foram checadas para fenol-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (absorvância a 480 nm) para detectar os açúcares totais (■), por reação de carbazol (absorvância a 525 nm) para detectar ácidos urônicos (□). A concentração do NaCl variou de 0 a 3 molar (---). Frações isoladas: 1) alginato (denominada ALG-Pg), 2) fucanas sulfatadas, 3) fração impura.

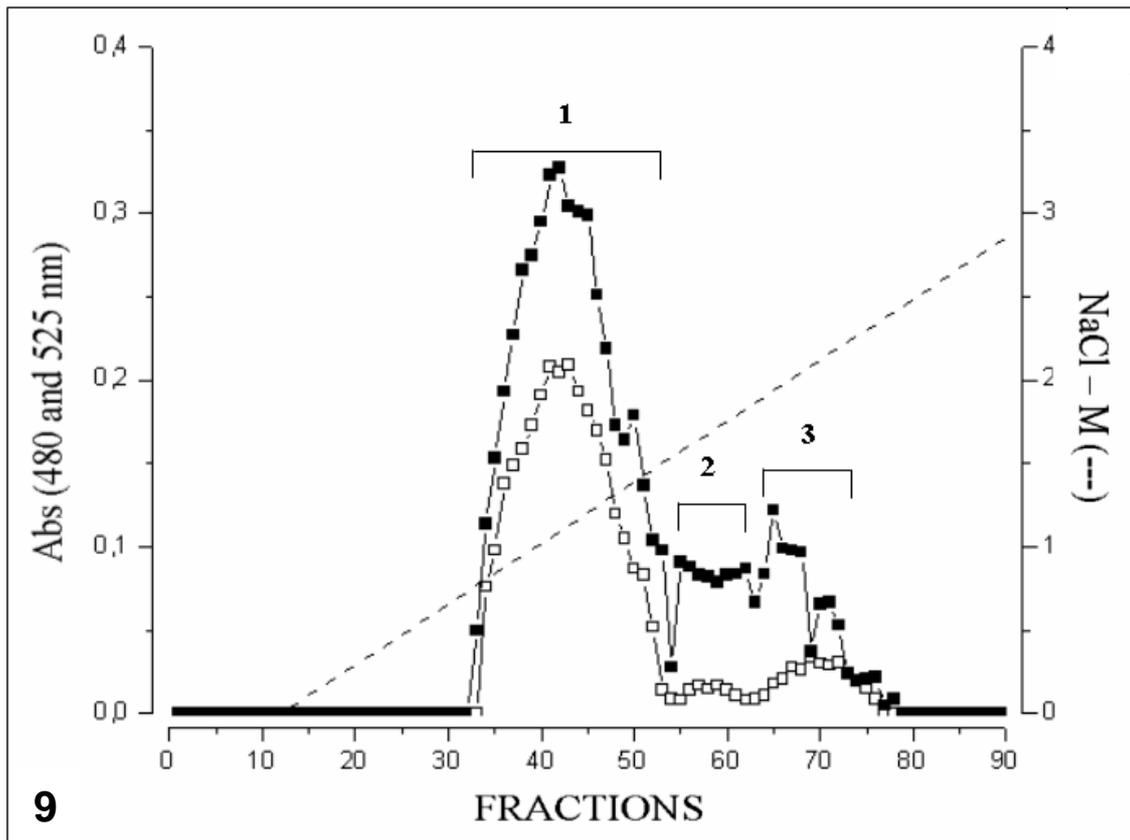


Figura 10: Eletroforese em gel de agarose de polissacarídeos extraídos de *P. gymnospora*. São mostrados os polissacarídeos totais (T), o ALG-Pg (1), as fucanas sulfatadas (2) e a fração impura (3).

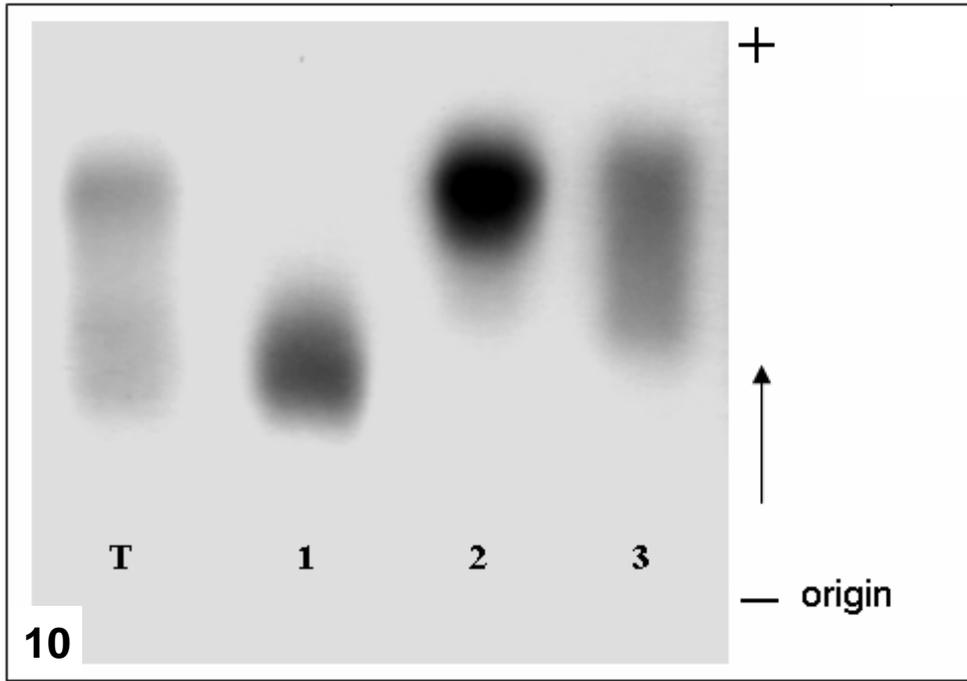


Figura 11: Cromatografias de separação por peso molecular do alginato isolados de *P. gymnospora*. Em 'a' e 'b' é possível observar que as setas indicam, o  $V_0 = 5000$  kDa e o  $V_t = 5$  kDa das colunas, respectivamente. As frações foram checadas para a detecção de ácidos urônicos ( $\square$ ) e compostos fenólicos ( $\bullet$  ou linha contínua). Notar que em ambos os cromatogramas a eluição das substâncias fenólicas ocorreu simultaneamente a eluição do alginato.

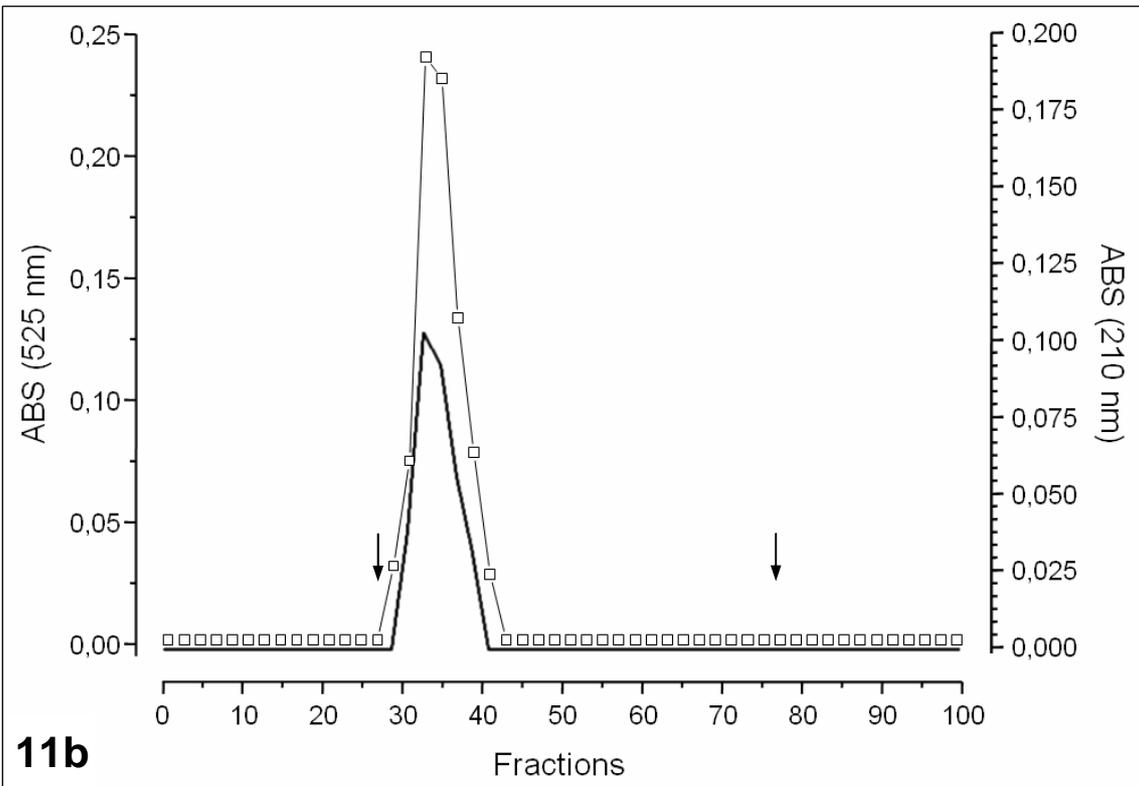
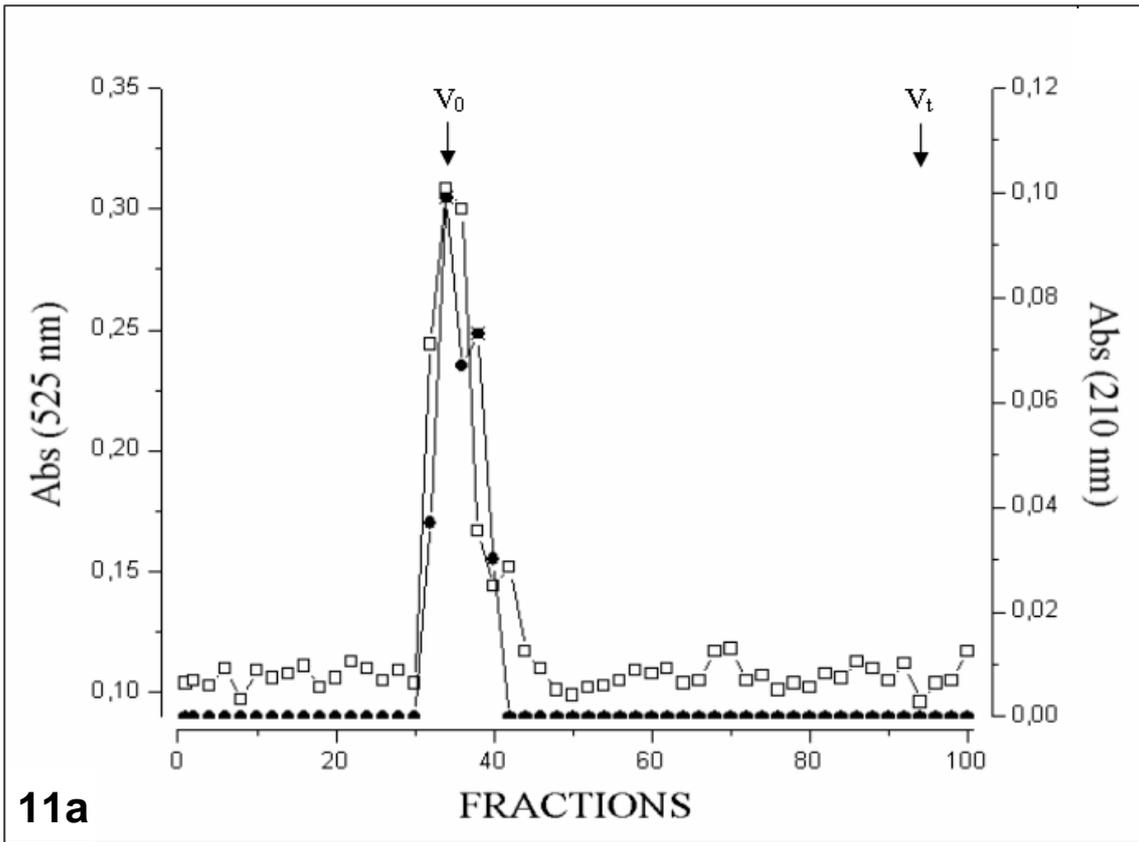


Figura 12: Cromatografias de separação por peso molecular do alginato isolados de *F. vesiculosus*. Em 'a' e 'b' é possível observar que as setas indicam, em ambas, o  $V_0 = 5000$  kDa e o  $V_t = 5$  kDa das colunas, respectivamente. As frações foram checadas para a detecção de ácidos urônicos ( $\square$ ) e compostos fenólicos ( $\bullet$  ou linha contínua).

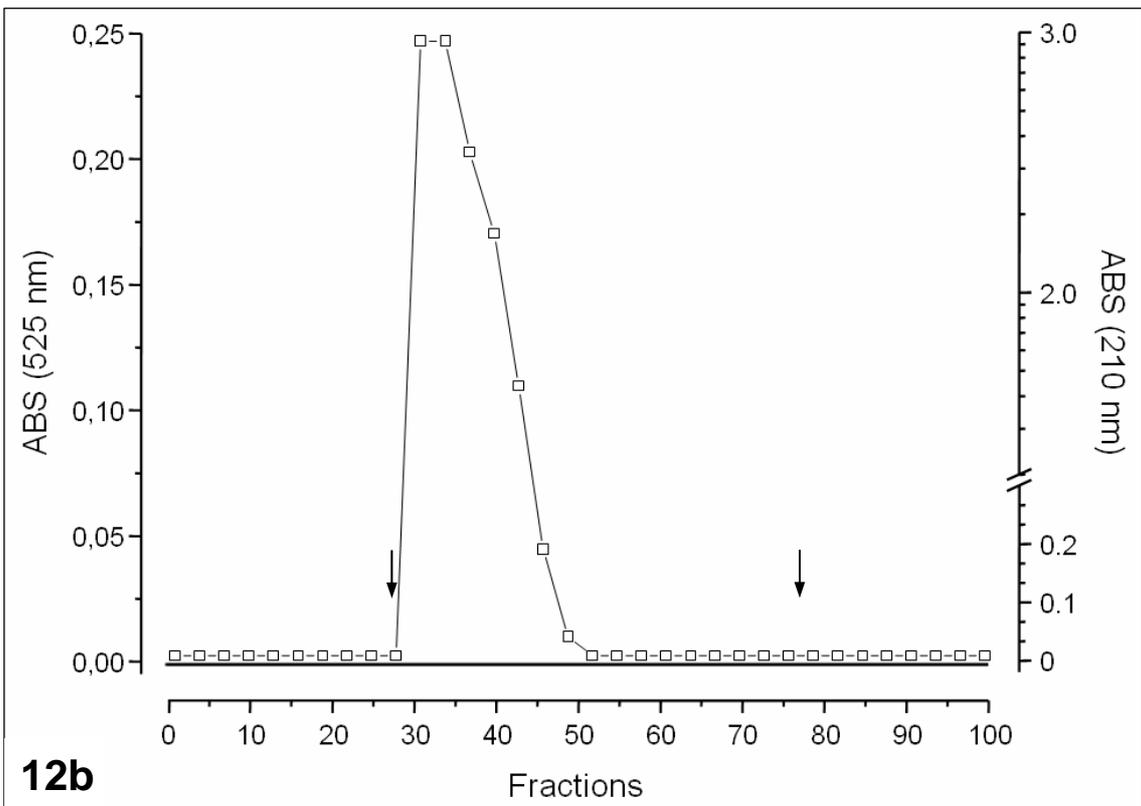
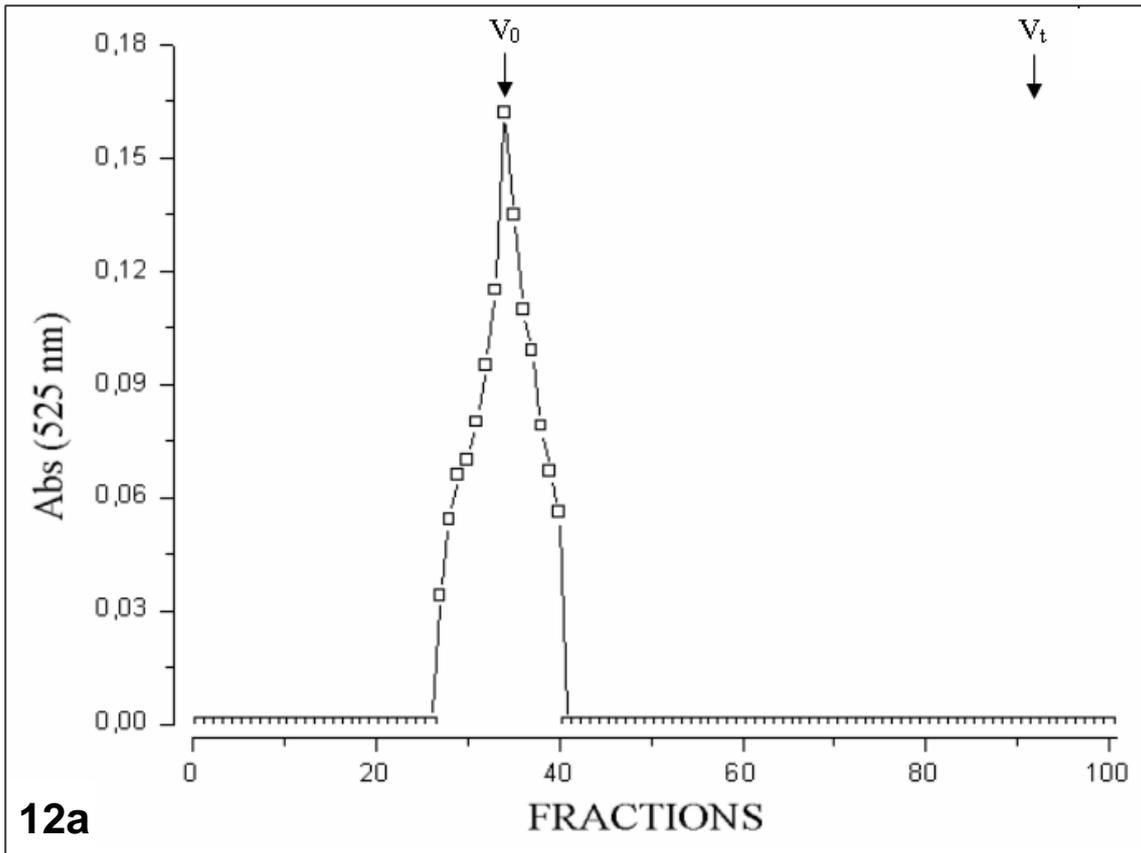


Figura 13: Histogramas mostrando a variação na capacidade de absorção de radiação UV em função do tempo (0 horas-T<sub>0</sub>; 24 horas-T<sub>24</sub>; 48 horas-T<sub>48</sub>; 72 horas-T<sub>72</sub>). Barras: compostos fenólicos ligados ao alginato de *P. gymnospora* (Phen, Alg +Pad), compostos fenólicos misturados com o alginato de *F. vesiculosus* (Alg Sigma, Phen), compostos fenólicos isolados de *P. gymnospora* (Phen), e alginatos purificados de *F. vesiculosus* (Alg Sigma).

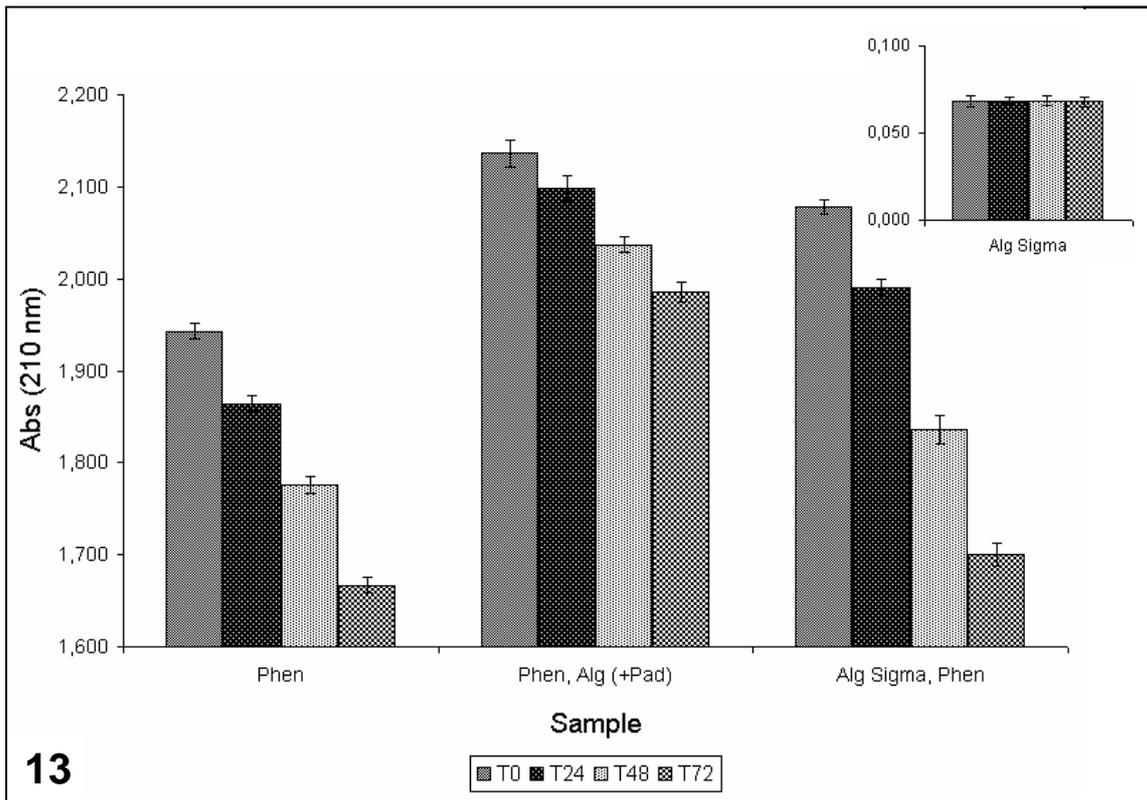


Figura 14: Gráfico de variação do pH em função das concentrações de alginato e compostos fenólicos. Alginato purificados de *F. vesiculosus* (■); compostos fenólicos misturados com o alginato de *F. vesiculosus* (○); compostos fenólicos isolados de *P. gymnospora* (●). Linhas: Alginato purificados de *F. vesiculosus* (— —); compostos fenólicos misturados com o alginato de *F. vesiculosus* (- - - -); compostos fenólicos isolados de *P. gymnospora* (—).

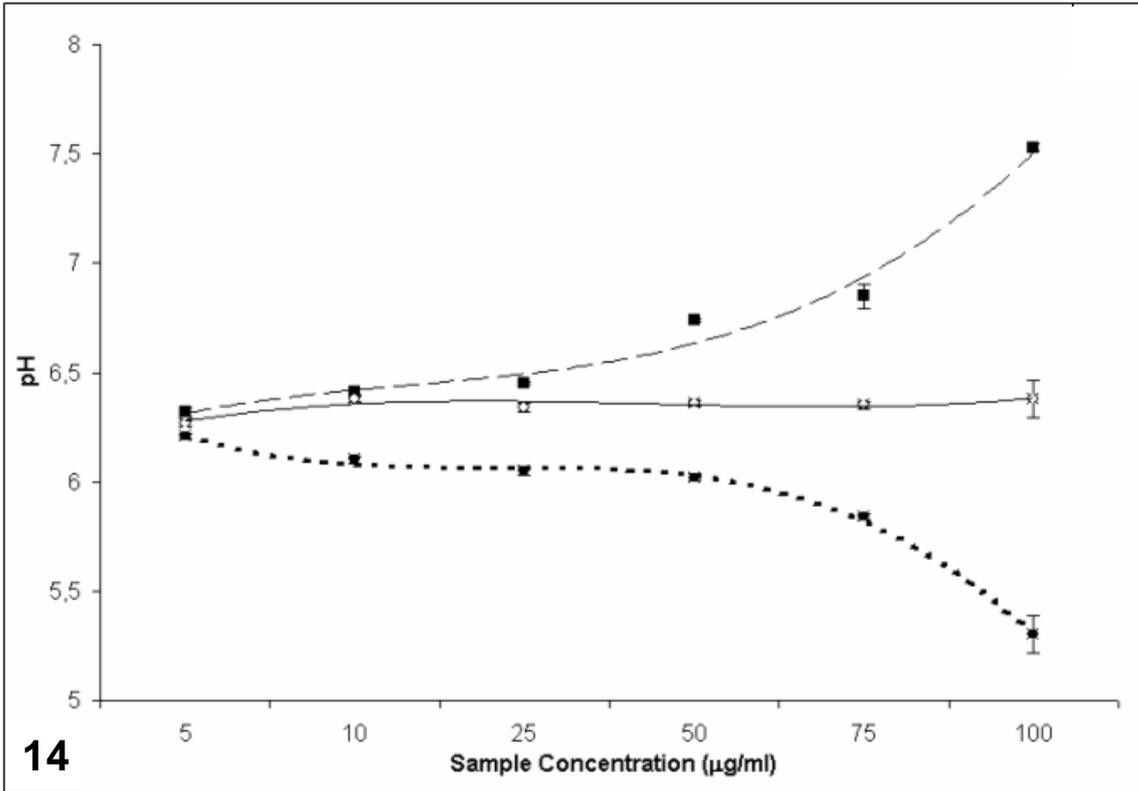


Figura 15: Imagens de microscopia eletrônica de varredura de cristais de calcita crescidos *in vitro*. a-b) Imagens de cristais de calcita típicos representando o experimento controle; c) Imagens de cristais de calcita crescidos *in vitro* na presença de alginatos isolados da alga parda *P. gymnospora*; d) Cristais de calcita formados na presença das fucanas sulfatadas purificadas de *P. gymnospora*; e) Imagem de baixo aumento de microscopia eletrônica de varredura mostrando vários cristais de carbonato de cálcio (de calcita) formados na presença de compostos fenólicos de *P. gymnospora*; f) Imagem de um dos cristais mostrados na figura 'e' crescidos na presença dos compostos fenólicos.

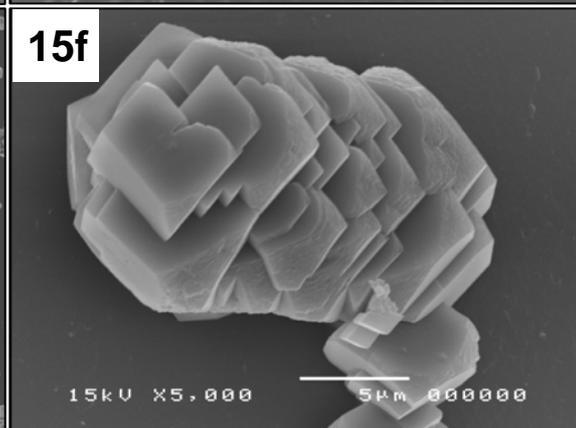
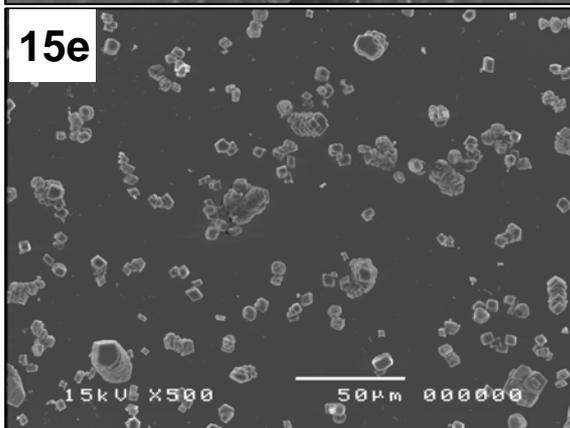
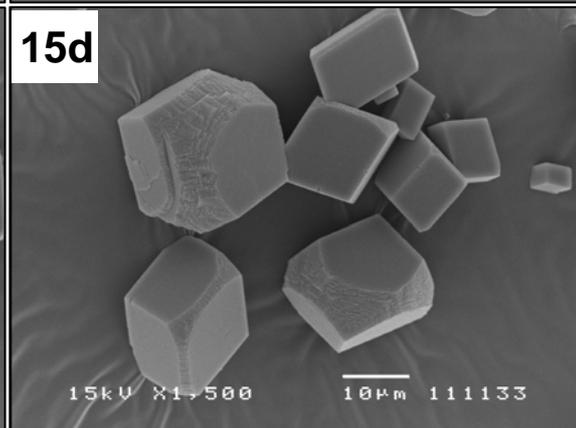
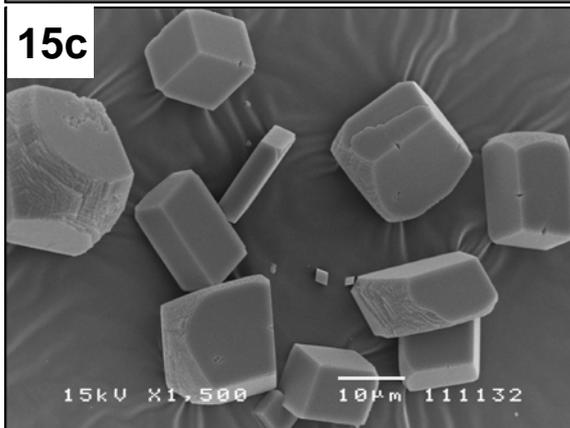
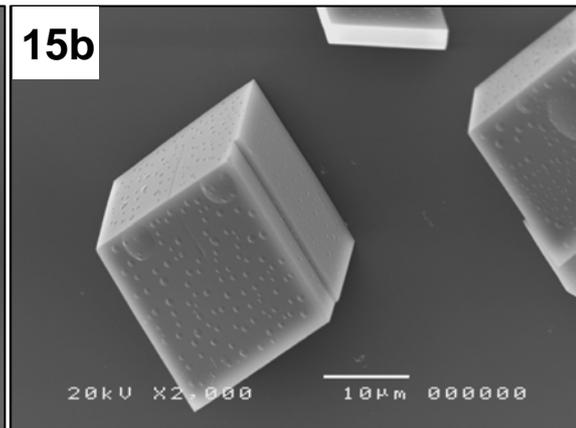
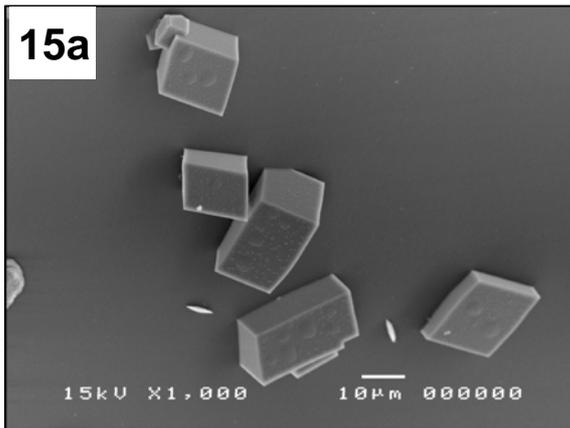
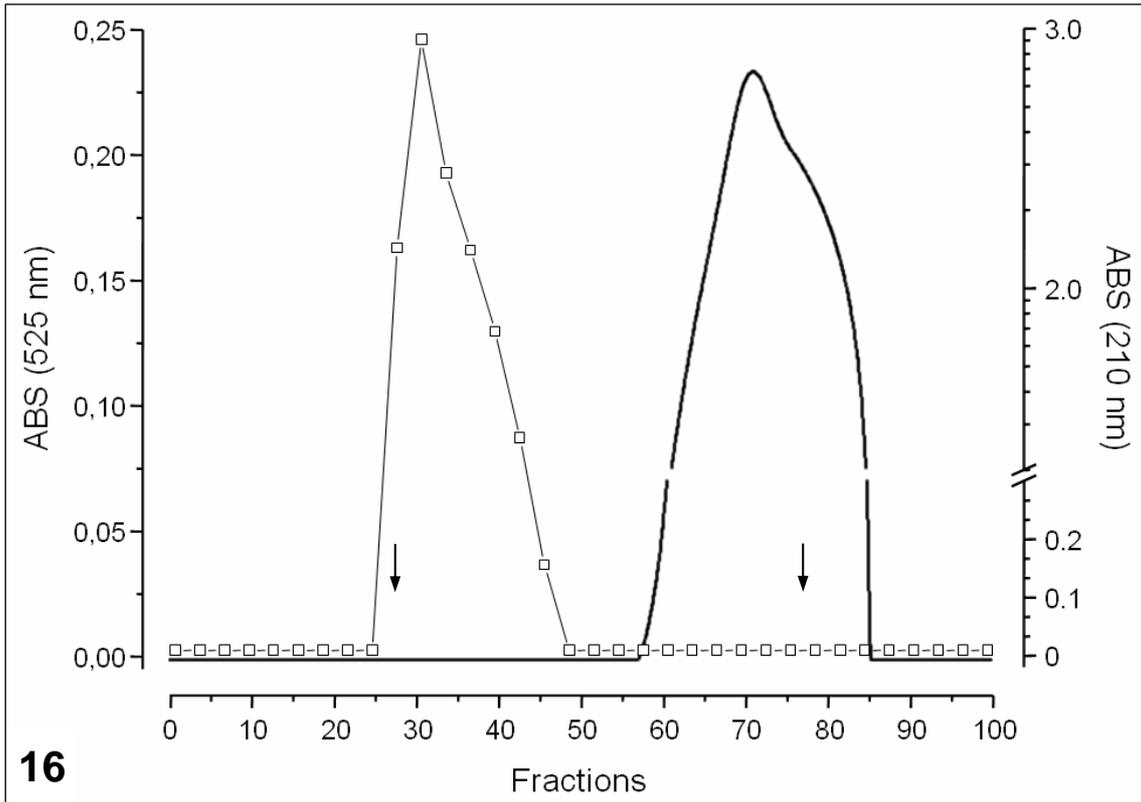


Figura 16: Cromatografia de separação por peso molecular do alginato isolado de *F. vesiculosus* incubado com compostos fenólicos, sem a adição da enzima VBPO. As setas indicam o  $V_0 = 5000$  kDa e o  $V_t = 5$  kDa da coluna, respectivamente. As frações foram checadas para a detecção de ácidos urônicos ( $\square$ ) e compostos fenólicos (linha contínua). Notar que não há formação de complexos de alto peso molecular, o que demonstra que estes compostos não se ligam *in vitro* sem a adição de algum mediador químico específico.



16

Figura 17: Cromatografia de separação por peso molecular do alginato isolado de *F. vesiculosus* incubado com compostos fenólicos e com a enzima VBPO. As setas indicam o  $V_0 = 5000$  kDa e o  $V_t = 5$  kDa da coluna, respectivamente. As frações foram cheçadas para a detecção de ácidos urônicos (□) e compostos fenólicos (linha contínua). Notar que houve formação de complexos de alto peso molecular, demonstrando a atividade específica desta enzima para auxiliar no processo de ligação entre os compostos fenólicos e os alginatos.

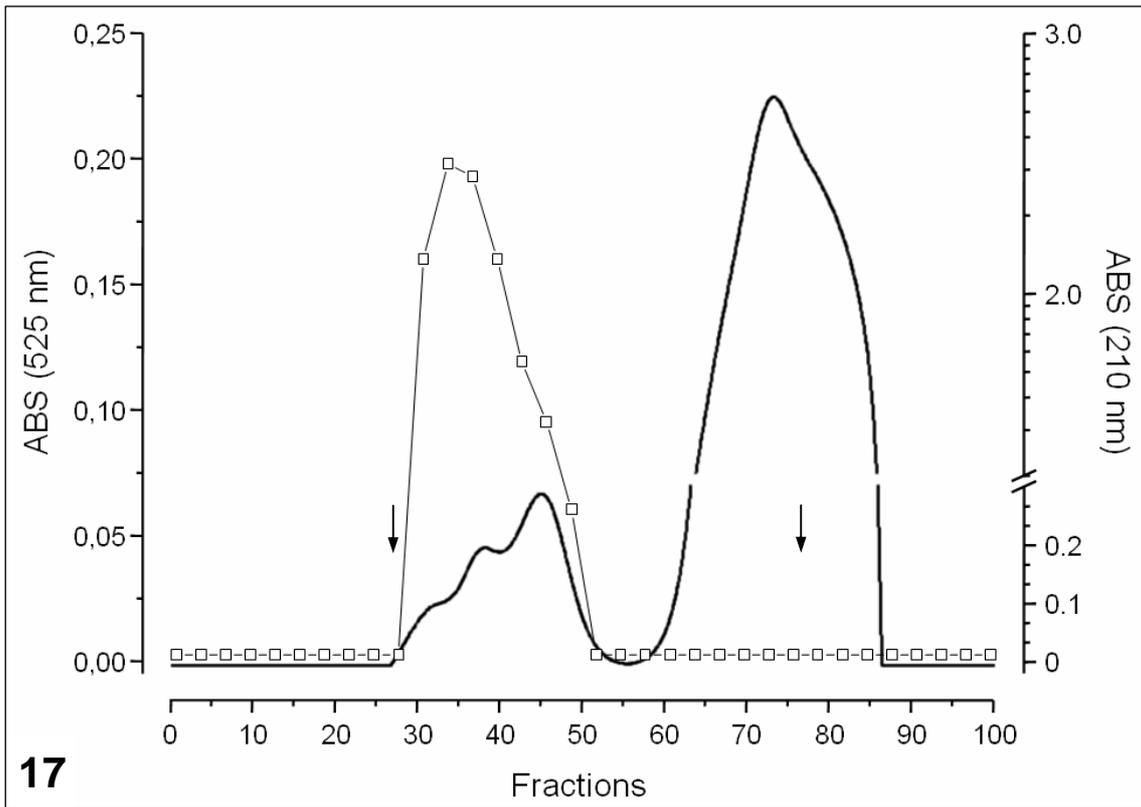
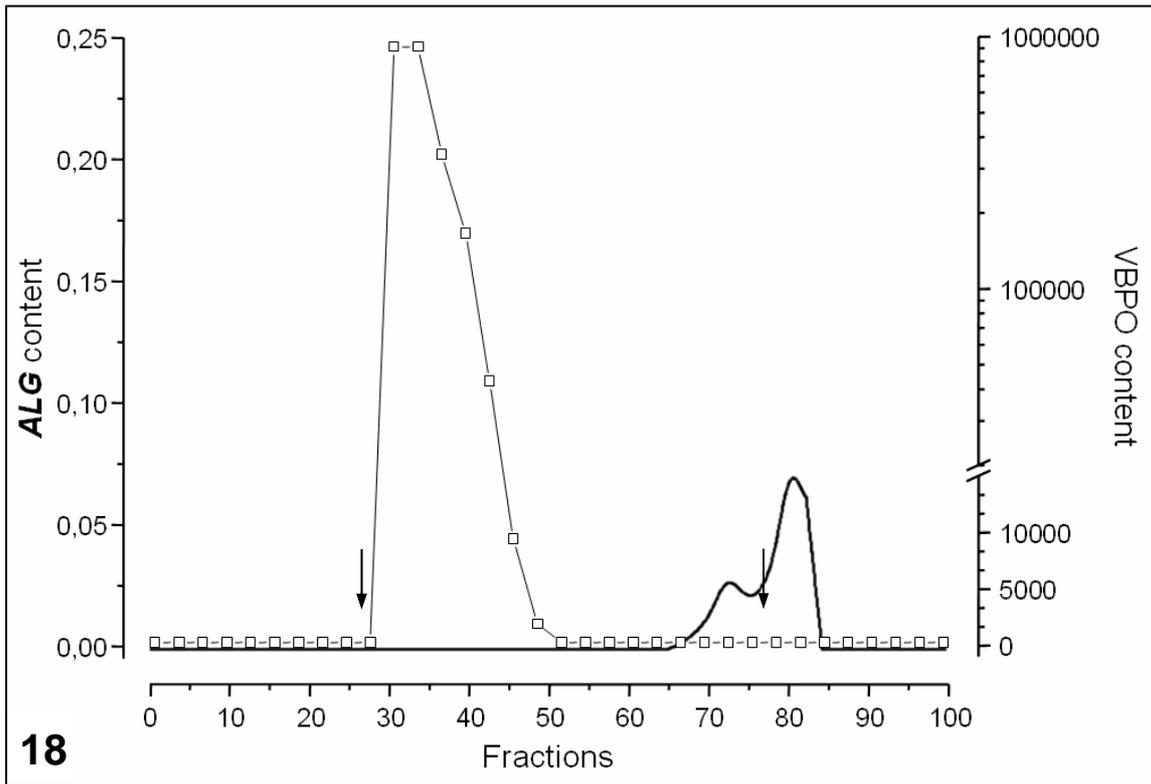
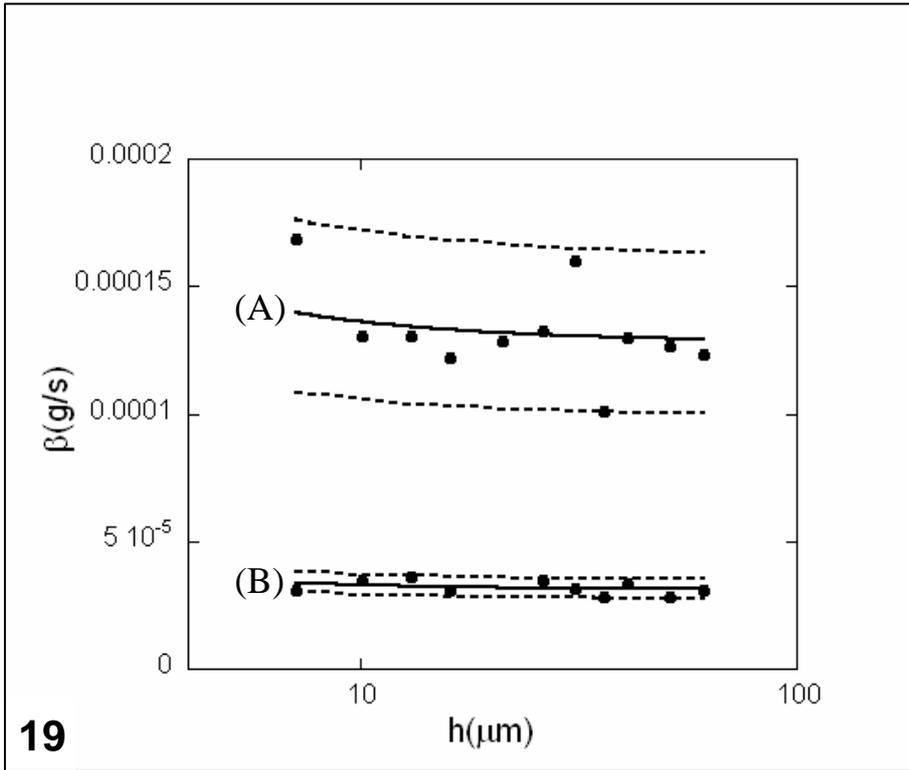


Figura 18: Cromatografia de separação por peso molecular do alginato isolado de *F. vesiculosus* incubado apenas com a enzima VBPO. As setas indicam o  $V_0 = 5000$  kDa e o  $V_t = 5$  kDa da coluna, respectivamente. As frações foram checadas para a detecção de ácidos urônicos (□) e compostos fenólicos (linha contínua). Notar que não houve formação de complexos de alto peso molecular, demonstrando que a enzima não se complexa aos alginatos para gerar um falso positivo.



18

Figura 19: Gráfico mostrando o coeficiente de fricção medido ( $\beta$ ) em função da altura das esferas ( $h$ ) utilizando a pinça óptica. A partir destas medidas, a viscosidade  $\eta$  é obtida (ver equação '3' nos Materiais e Métodos para maiores detalhes). *Linhas contínuas* em (A) e (B) são plotagens dos resultados de  $\beta$  utilizando o método do menor quadrado. *Linhas tracejadas* em (A) e (B) correspondem a curvas teóricas obtidas se considerarmos que a viscosidade é duas vezes o desvio padrão (o qual corresponde a aproximadamente 100 % dos dados) em ambos os lados da curva. Pode-se observar que todos os dados experimentais (círculos e quadrados cheios) estão localizados entre essas linhas significando que o erro experimental corresponde ao desvio padrão. (A) curva de  $\beta \times h$  obtida a partir da análise de uma solução aquosa de alginato purificado de *F. vesiculosus* (5mg/mL),  $\eta = 6.6 \pm 0.5$  cPoise; (B) curva de  $\beta \times h$  obtida a partir de uma solução aquosa do produto da incubação do alginato purificado de *F. vesiculosus* com compostos fenólicos e a com enzima VBPO.  $\eta = 1.6 \pm 0.1$  cPoise.



19

Tabela 1: Valores de viscosidade expressos em *cPoise* medidos com a pinça óptica. Ver materiais e métodos para detalhes. Para todas as amostras analisadas os alginatos foram diluídos a 5 mg/ml, enquanto que as concentrações de compostos fenólicos variaram de 0,25 mg/ml a 50 mg/ml. A concentração dos compostos fenólicos (CF) nos experimentos com a adição da enzima VBPO (última linha da tabela) foi de 5 mg/ml.

<b>Amostra</b>	<b>Viscosidade (cPoise)</b>
CF	1.0 ± 0.1
ALG-Pg (com CF ligado <i>in vivo</i> )	1.1 ± 0.1
ALG-Fv	6.7 ± 0.5
ALG-Fv misturado com CF (concentrações de PC em mg/ml)	
0,25	7,6 ± 0.6
2,50	7,8 ± 0.6
5,00	7,6 ± 0.5
10,0	6,8 ± 0.5
50,0	6,9 ± 0.5
ALG-Fv ligado com CF	1.6 ± 0.1

Figura 20: Imagens de microscopia óptica de contraste diferencial interferencial (DIC) de células vivas corticais, medulares e do tricoblasto de *Laurencia obtusa*. a) Vista superficial de células corticais e medulares, onde é possível notar a presença de dois corpos em cereja (\*) em uma célula cortical; b) Imagem em visão superficial de células do tricoblasto onde também se observa a presença de corpos em cereja. Notar a presença de conexões entre os corpos em cereja e a periferia celular (setas); c-d) Imagens em visão superficial de células corticais. Notar também os corpos em cereja e as estruturas alongadas conectando as organelas a periferia da célula. (barras = 10  $\mu\text{m}$ )

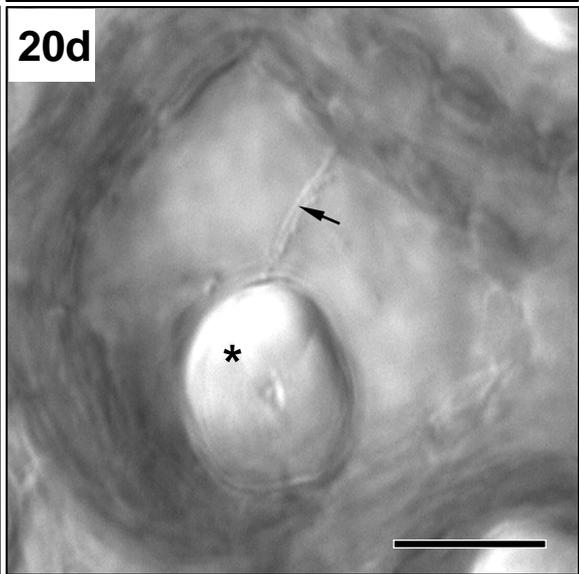
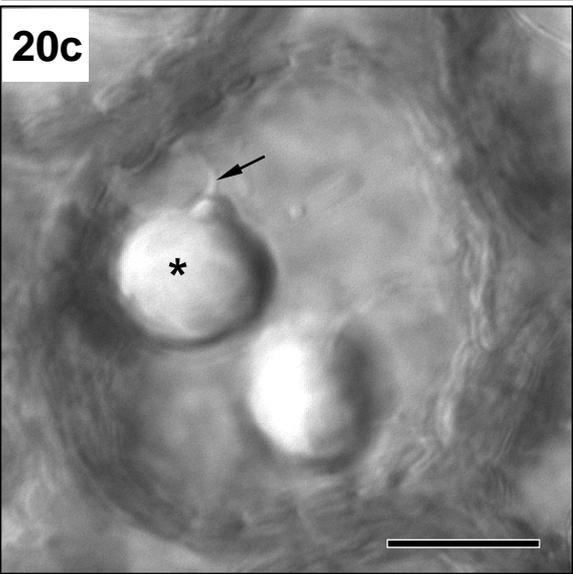
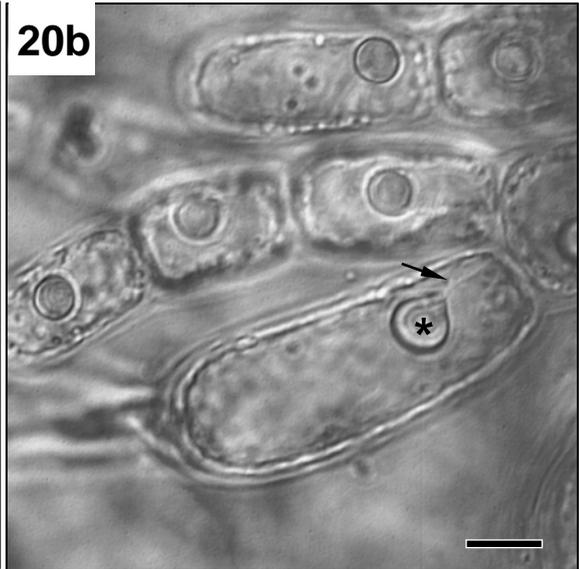
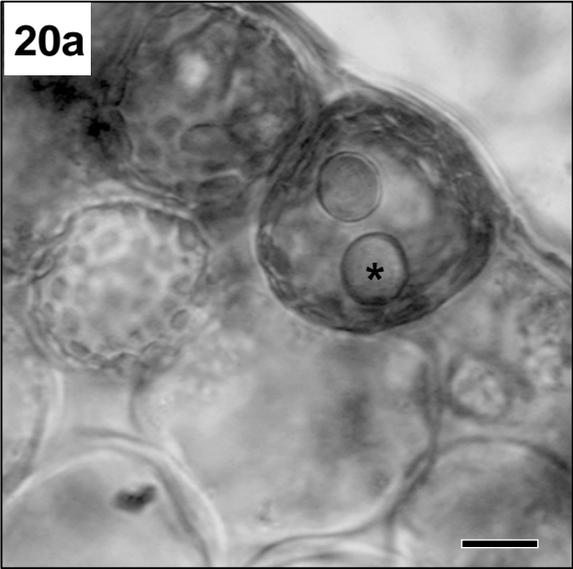


Figura 21: Microscopia óptica de DIC e de fluorescência de cortes transversais semifinos da alga *L. obtusa*. a) Imagem de DIC onde se observam os corpos em cereja (CC), a parede celular (PC) e os cloroplastos (C). b) Imagem revelando a auto-fluorescência tipicamente observada nessas células após o procedimento de fixação. c) Imagem composta das estruturas visualizadas em DIC e pela auto-fluorescência. Note a auto-fluorescência emitida pelos corpos em cereja e localizada, também, em diversas vesículas distribuídas pelo espaço intracelular e em inclusões presentes nos cloroplastos. (barras = 10  $\mu\text{m}$ )

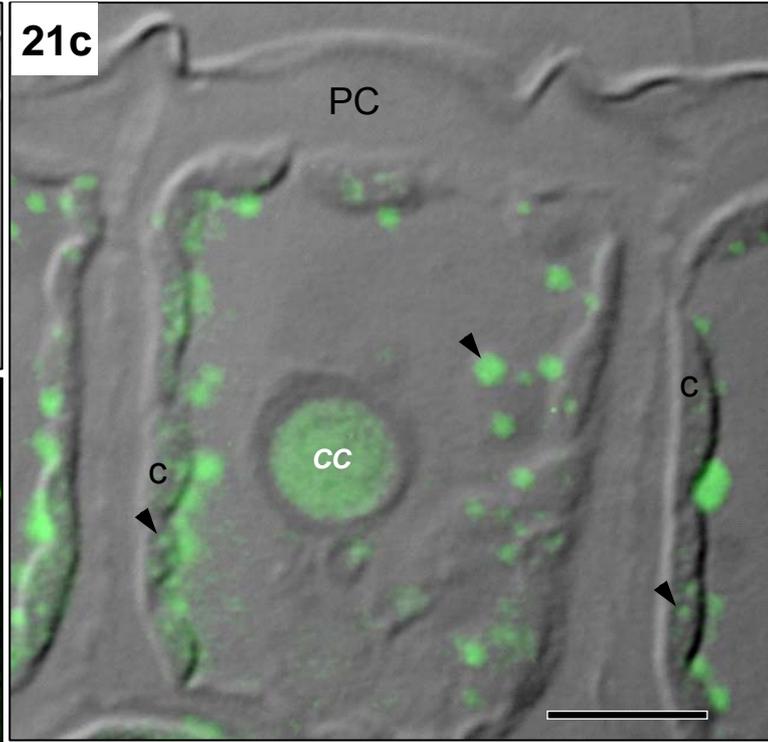
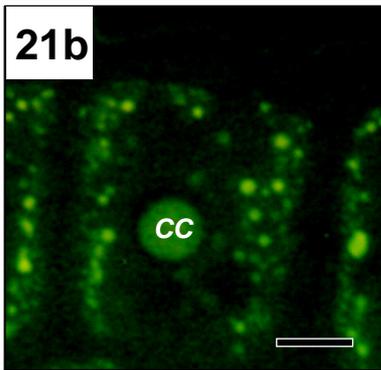
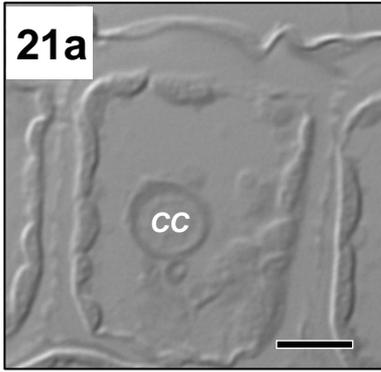


Figura 22: Imagens de microscopia óptica de campo claro mostrando uma célula cortical de *L. obtusa* em dois momentos distintos. Em 'a' observa-se os corpos em cereja na posição inicial antes da manipulação utilizando a microscopia de pinças ópticas. Notar a posição da organela em relação aos eixos traçados na figura. Em 'b', a organela apresenta-se deslocada mediante a ação do LASER gerado pela pinça óptica. Notar que o deslocamento da organela foi limitado em função de uma única região de fixação estrutural que está marcada com o asterisco. A medida dos ângulos formados entre as retas 'a' e 'b' (b e b') foi realizada e a diferença entre esses ângulos foi de aproximadamente 6°. Notar também que as estruturas de conexão (cabeças de seta) visualizadas anteriormente sofreram deslocamento em consequência da movimentação da organela. (barras = 3  $\mu\text{m}$ )

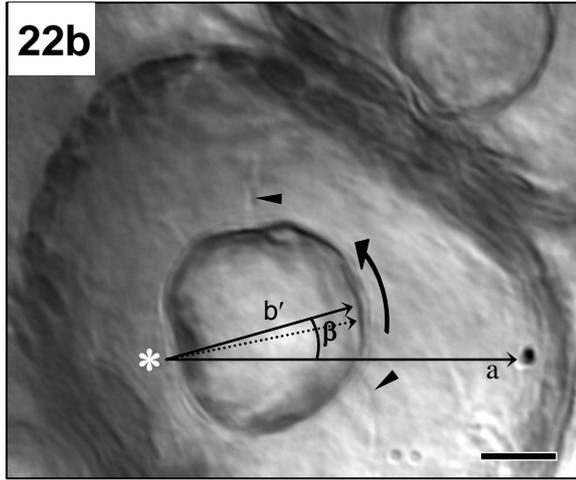
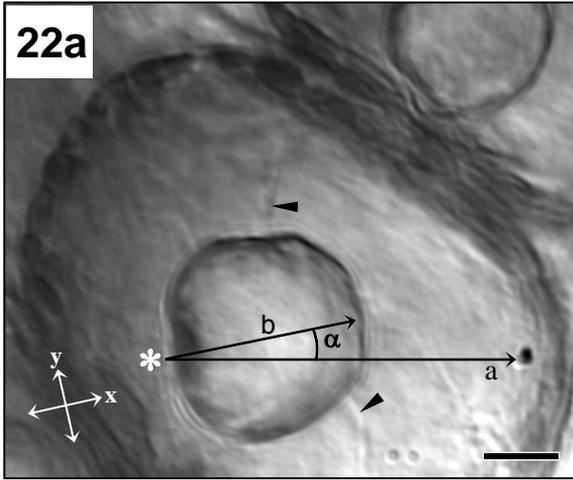


Figura 23: Imagens de microscopia eletrônica de transmissão de células corticais de *L. obtusa*. a) Visão geral de uma célula cortical cortada longitudinalmente. Observam-se, um corpo em cereja localizado na região central da célula (CC), os cloroplastos (C), o núcleo (N), a parede celular (CW), inúmeras vesículas (cabeças de seta) e inclusões nos cloroplastos (cabeças de seta) (barra = 1  $\mu\text{m}$ ); b) Detalhe em maior aumento de um corpo em cereja (CC) onde se observa a presença de vesículas compreendidas no espaço delimitado pelas membranas externa e interna da organela (cabeças de seta) (barra = 1  $\mu\text{m}$ ); c) Imagem de um cloroplasto em detalhe no qual se encontram diversas inclusões distribuídas entre as membranas tilacóides (barra = 1  $\mu\text{m}$ ); d) Imagem de uma vesícula (V) aderida à parede celular (PC) demonstrando o processo de exocitose devido à liberação do seu conteúdo para o exterior da célula (barra = 40 nm).

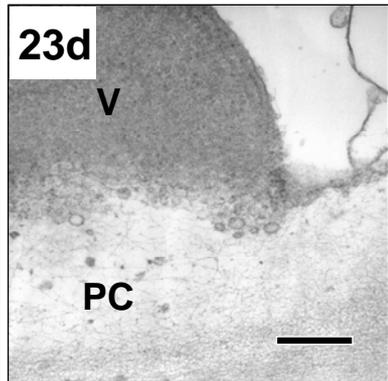
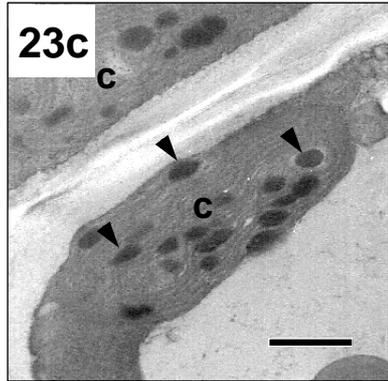
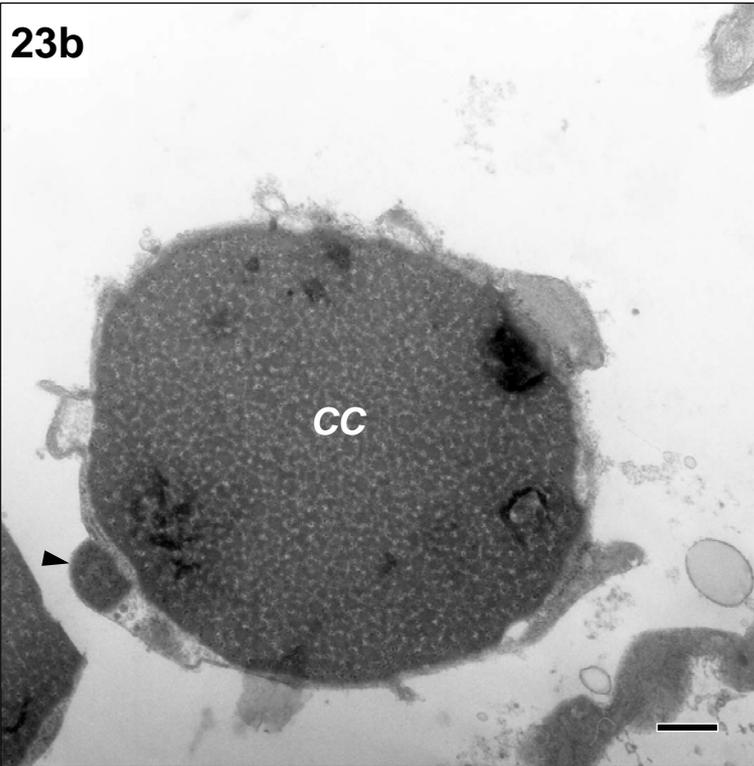
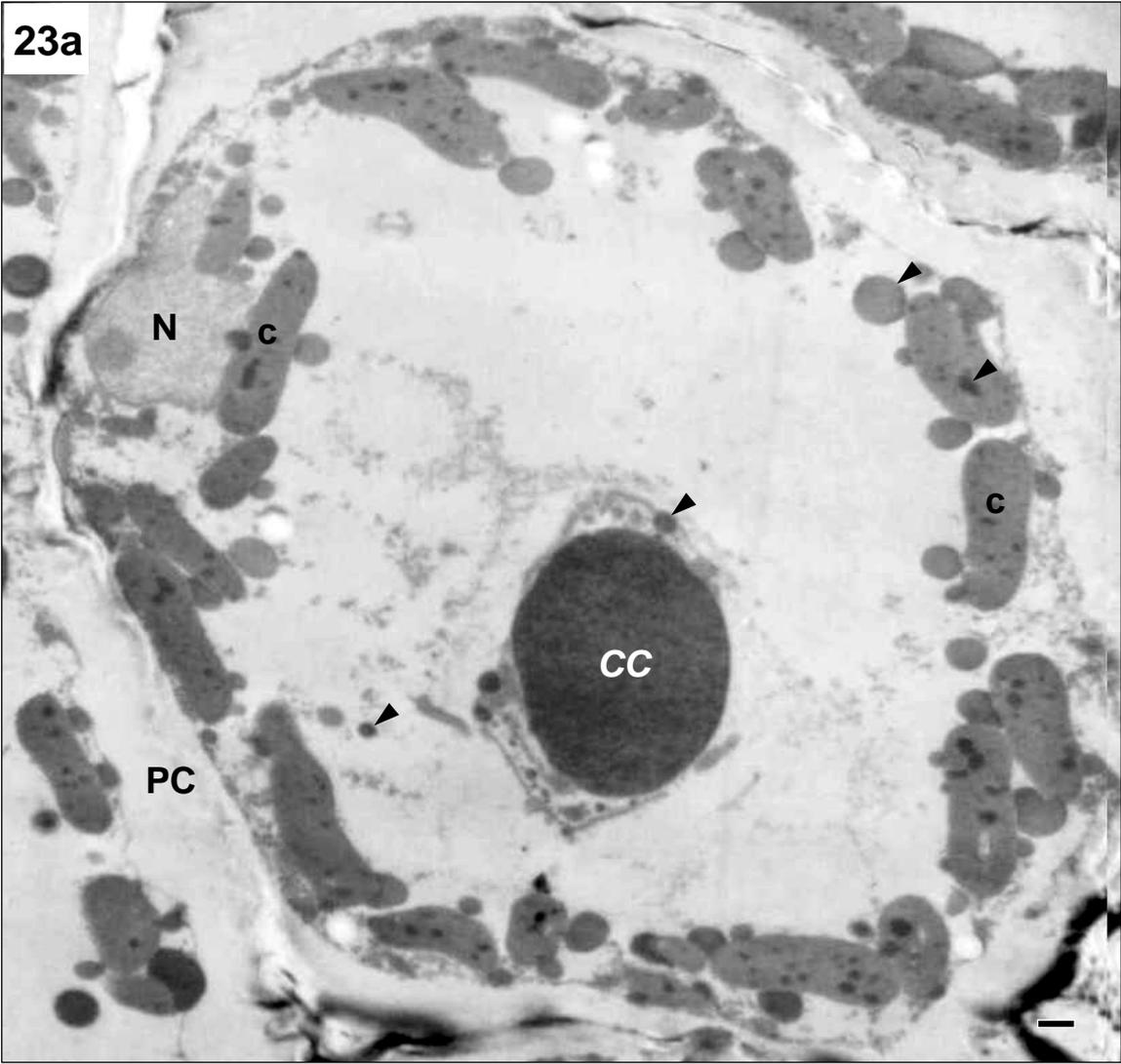


Figura 24: Análise da composição elementar dos corpos em cereja. a) Imagem de microscopia eletrônica de transmissão de um corpo em cereja isolado de uma célula cortical de *L. obtusa*; b) Região do espectro de EDXA obtido da análise do composto halogenado elatol extraído da alga *L. obtusa* revelando a presença do bromo na sua composição; c) Espectro de EDXA obtido da análise do corpo em cereja isolado de uma célula cortical de *L. obtusa*. Notar os picos característicos de emissão do bromo ( $K\alpha=11.90$  e  $K\beta=13.38$  keV) e também do cloro ( $K\alpha=2.62$  keV). Os elementos Na ( $K\alpha=1.04$  keV), P ( $K\alpha=1.74$  keV), S ( $K\alpha=2.31$  keV), K ( $K\alpha=3.31$  keV) e Ca ( $K\alpha=3.69$  keV) também foram detectados. Os picos de níquel ( $K\alpha=7.47$  keV) e de cobre ( $K\alpha=8.04$  e  $K\beta=8.91$  keV) observados foram originados da grade e da coluna do microscópio, respectivamente. (barra = 3  $\mu\text{m}$ )

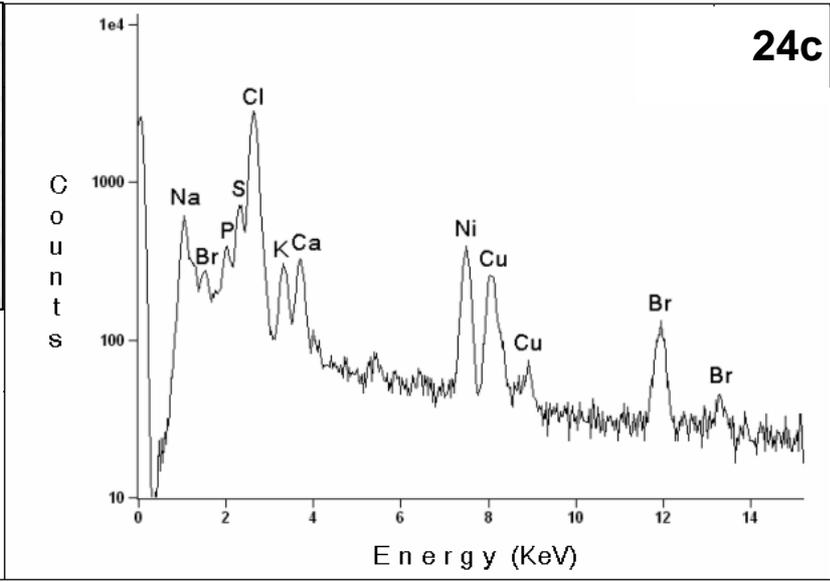
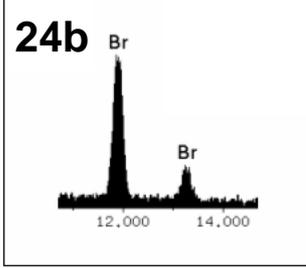
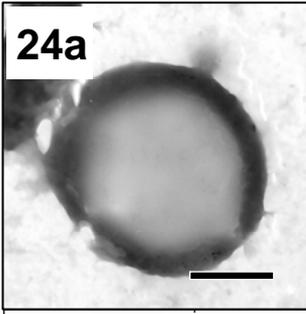


Figura 25: Imagens de células corticais de *L. obtusa* visualizadas por microscopia óptica e obtidas por video-microscopia. Notar na seqüência 'a-f' o deslocamento das vesículas (setas e cabeças de seta) originadas a partir dos corpos em cereja em direção a periferia da célula, para uma região próxima a um cloroplasto no tempo de 60 segundos (\*) (barra = 3  $\mu\text{m}$ ).

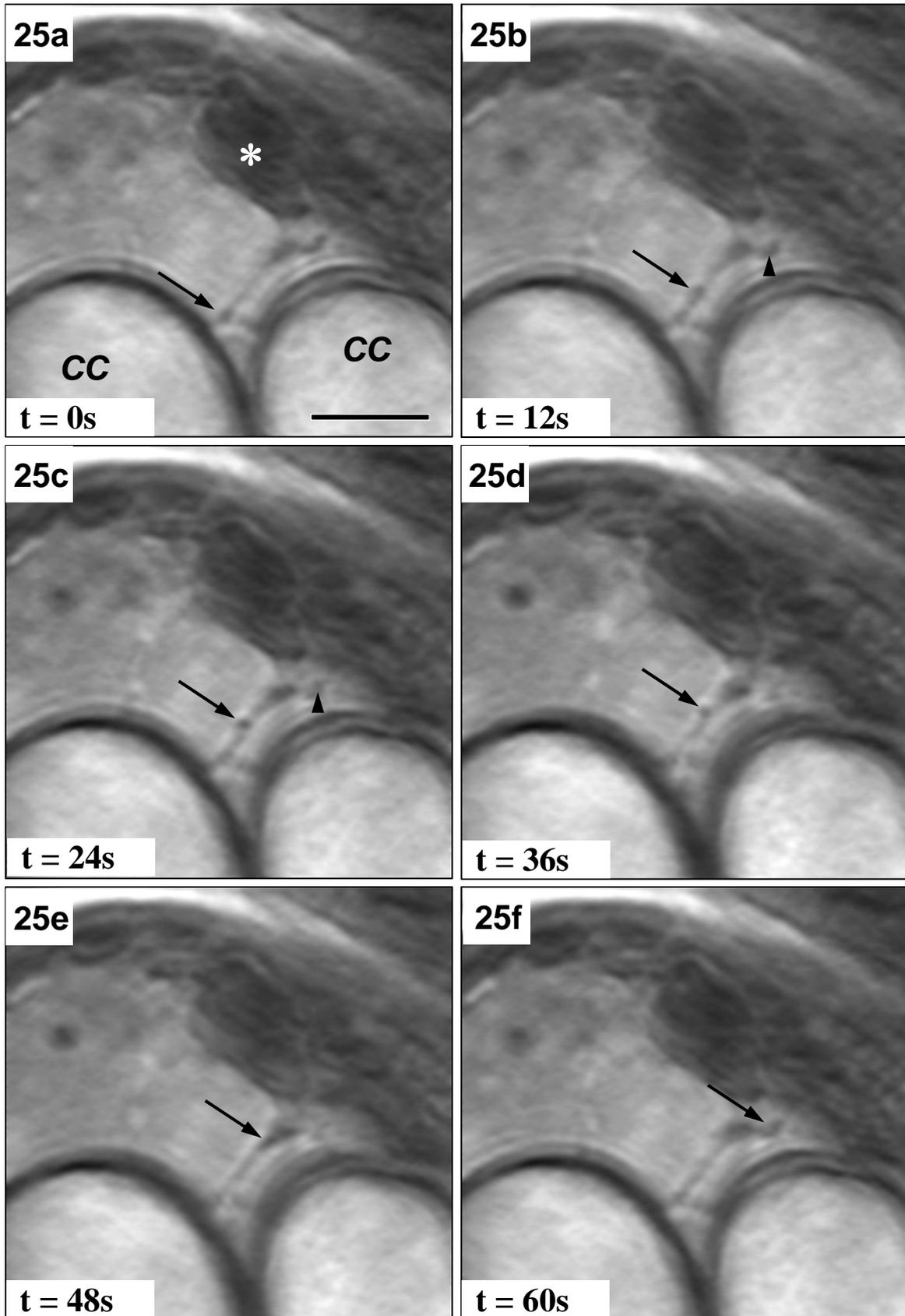


Figura 26: Processo de degradação de corpos em cereja. Na seqüência (a-c) das imagens de microscopia óptica (DIC), é possível observar a fragmentação dos corpos em cereja em vesículas de tamanho variado. Também se pode visualizar a concomitante modificação do conteúdo celular, a degeneração dos cloroplastos e, ao final do processo, a aparente morte da célula (barra = 3  $\mu\text{m}$ ).

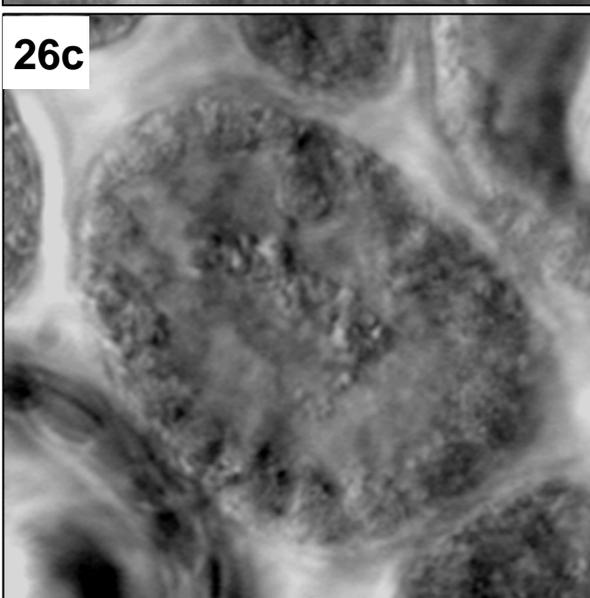
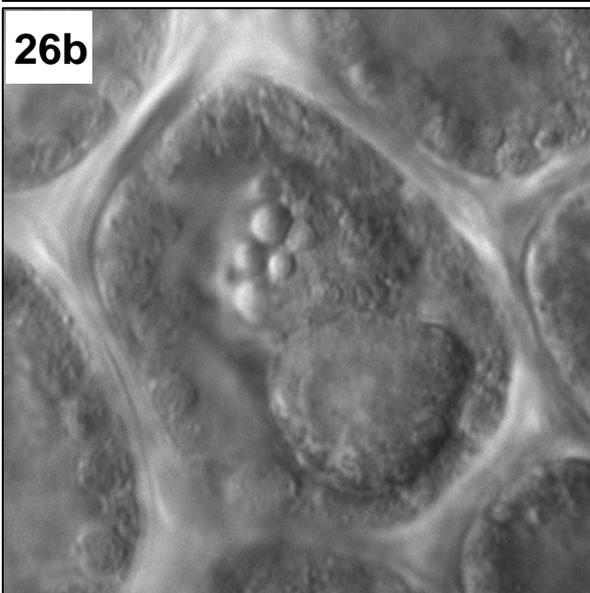
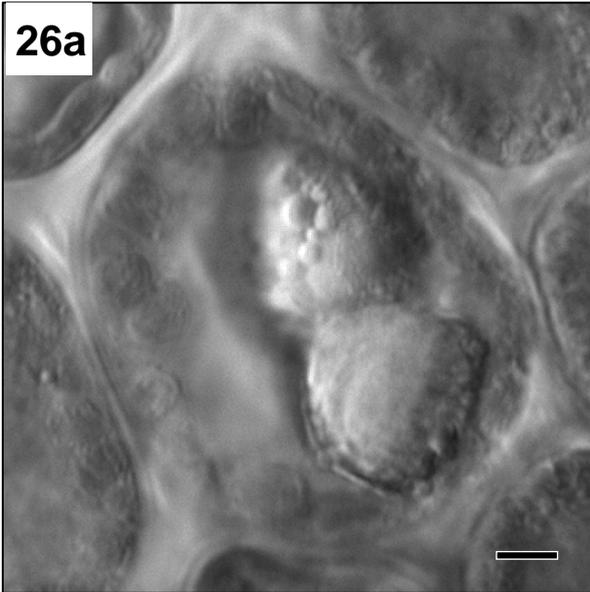


Figura 27: Imagens de vídeo-microscopia revelando um processo distinto de degradação dos corpos em cereja e de morte celular em relação àquele apresentado na figura 26. Na seqüência de imagens (a-f), foi possível observar que os corpos em cereja (CC) são deslocados em direção a periferia da célula. Simultaneamente, se observa a retração da membrana do vacúolo (setas) até a sua ruptura (cabeça de seta). Apenas no final do processo de degradação (f) foram visualizadas a degeneração completa dos cloroplastos (\*) e a aparente morte da célula. (barra = 7  $\mu\text{m}$ ).

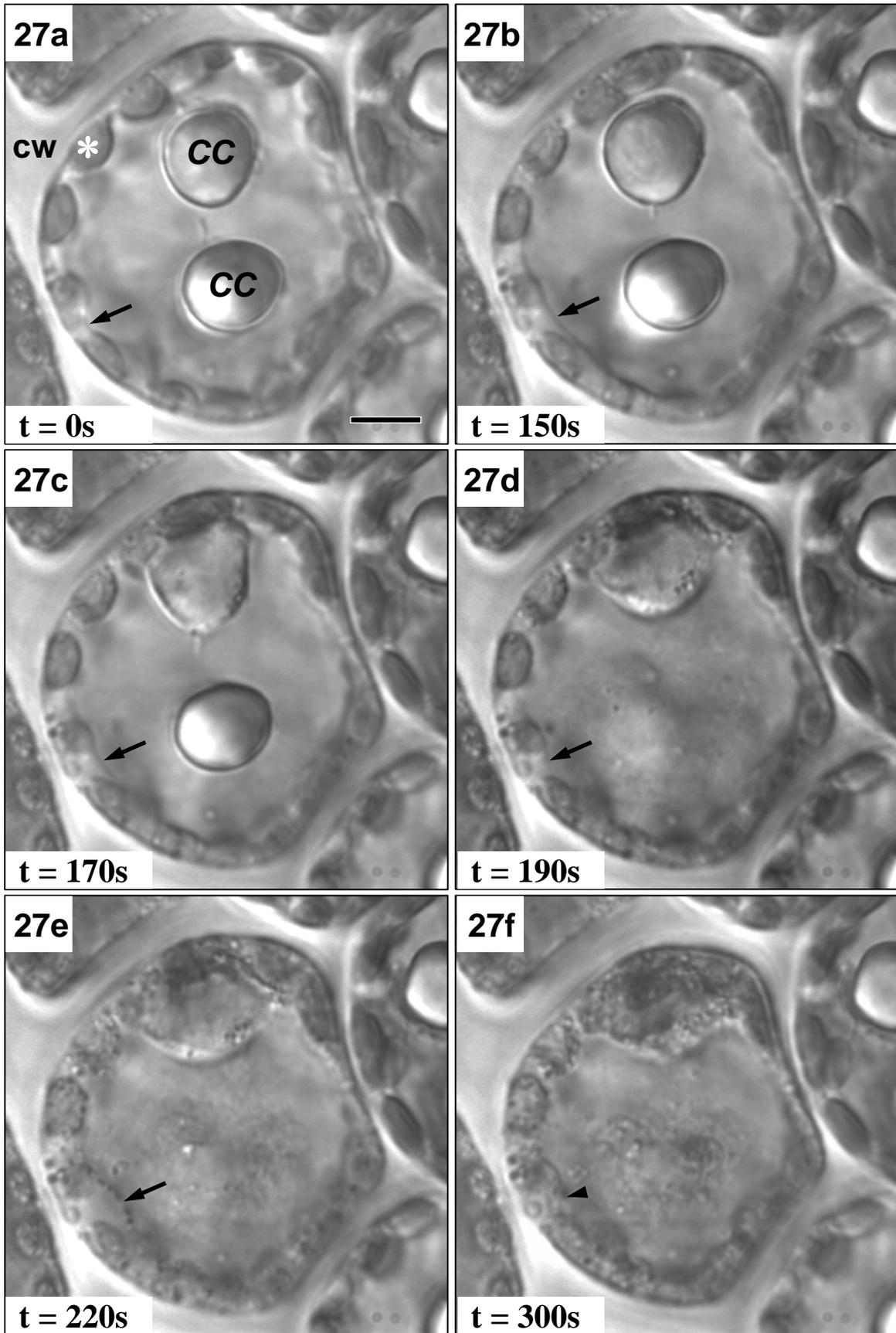


Figura 28: Reconstrução tri-dimensional das conexões tubulares membranosas. a-c) Imagens de microscopia eletrônica de transmissão de alguns dos cortes seriados utilizados para o processo de reconstrução tridimensional onde é possível observar as conexões tubulares membranosas (\*), os corpos em cereja (setas) e uma vesícula dentro da conexão (cabeça de seta); d-e) Imagens obtidas a partir da reconstrução tri-dimensional. A parede celular e o citoplasma periférico encontram-se representados em azul; o corpo em cereja é representado em vermelho; a conexão tubular membranosas, que também é constituída pela membrana do vacúolo e que envolve os corpos em cereja, aparece em amarelo; também se observa uma vesícula sendo transportada ao longo da conexão em vermelho (barras = 400 nm).

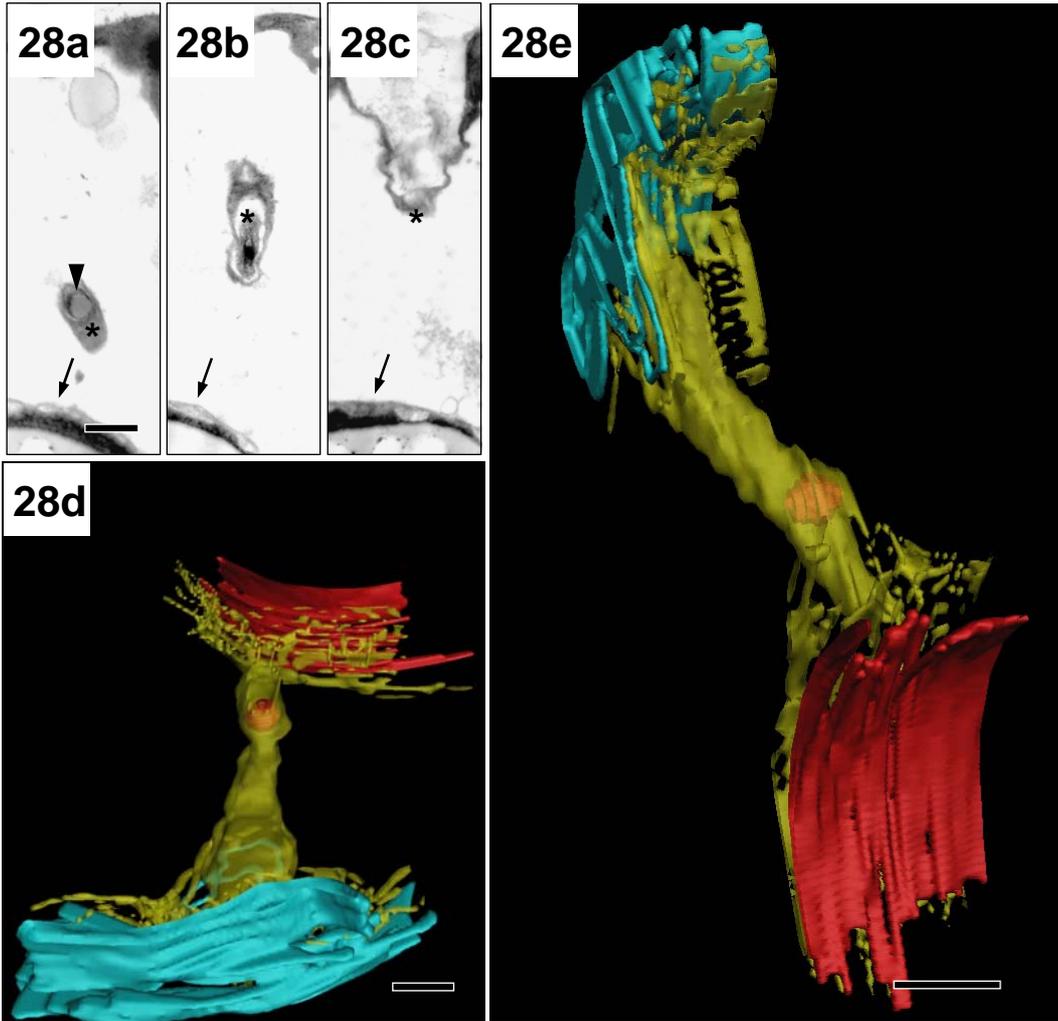
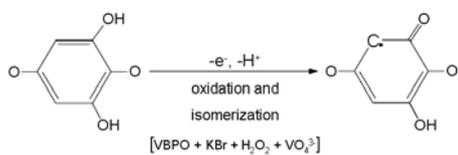
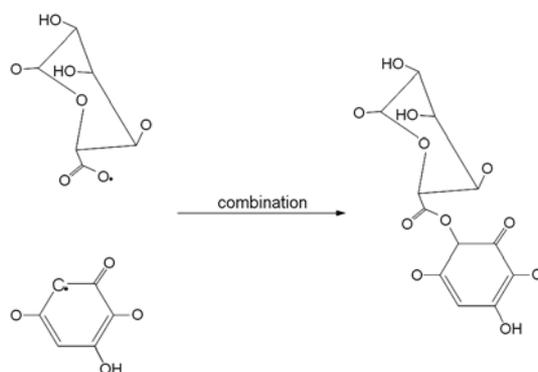


Figura 29: Modelo esquemático do processo de ligação entre compostos fenólicos e alginatos mediado pela enzima VBPO. A primeira etapa mostra a oxidação e a isomerização da unidade de floroglucinol. A segunda etapa apresenta o possível mecanismo de ligação relacionado com a combinação do ácido urônico (o ácido gulurônico é mostrado) com o floroglucinol, reduzindo as vacâncias químicas em ambas as moléculas. A terceira etapa representa o processo de halogenação (podendo ser também de protonação) da vacância restante na unidade de floroglucinol. A última etapa consiste no rearranjo do átomo adicionado na estrutura do floroglucinol e mostra configuração molecular final.

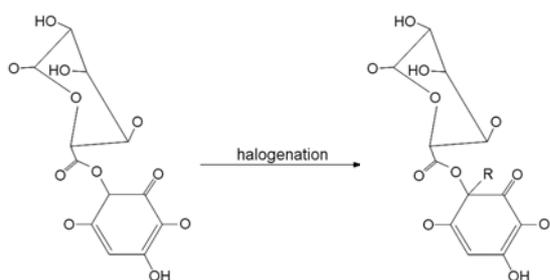
### ETAPA 1



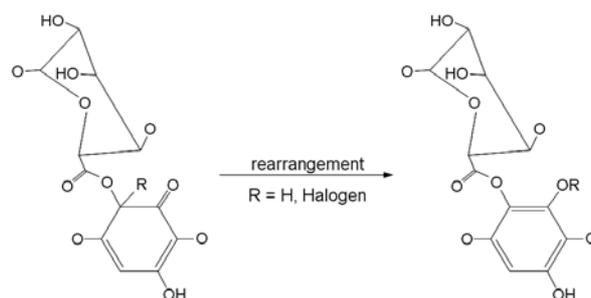
### ETAPA 2



### ETAPA 3



### ETAPA 4



## DISCUSSÃO

### 13. ABSORÇÃO DE METAIS PESADOS PELAS ALGAS PARDAS

Estudos anteriores demonstraram que moléculas sulfatadas estão relacionadas ao processo de acumulação de metais pesados nas paredes celulares de *P. gymnospora* (Amado Filho *et al.*, 1996; Andrade *et al.*, 2002). Ensaio histoquímico com azul de toluidina em diferentes pHs demonstraram que a distribuição de moléculas sulfatadas é similar à distribuição de grânulos de metais pesados na parede celular, além dos grânulos de metais conterem S em análises por EDXA (Andrade *et al.*, 2002). Recentemente, Andrade *et al.* (2004) demonstraram, por EDXA e por espectrofotometria de absorção atômica, que o Zn pode encontrar-se associado aos polissacarídeos ácidos da parede celular, os quais foram extraídos de indivíduos de *P. gymnospora* coletados numa área contaminada por metais pesados, principalmente Zn e Cd.

Desta forma, o padrão de distribuição de  $\alpha$ -L-fucose observado na alga *P. gymnospora* através da marcação com UEA, finalmente confirmou que as fucanas sulfatadas apresentam-se localizadas preferencialmente ao longo das camadas externas das paredes periclinais e nas regiões próximas a membrana plasmática. Este resultado, semelhante ao padrão de distribuição de grânulos de metais pesados, indicou que estes polissacarídeos atuam de forma efetiva no processo de acumulação de metais pesados pelas paredes celulares de *P. gymnospora*, sem excluir a participação dos alginatos.

A marcação com a lectina Concanavalina A contra as moléculas de resíduos terminais de  $\alpha$ -D-manosil e  $\alpha$ -D-glicosil demonstrou que estas moléculas estão em baixas concentrações nas paredes celulares. As marcações observadas, sempre fracas e esparsas, confundiam-se com a marcação de fundo (dado não mostrado). Desta forma, não foi possível especular, a partir da marcação com Concanavalina A, qualquer relação com a localização das fucanas. Por outro lado, é importante ressaltar que a concentração de moléculas de  $\alpha$ -D-manosil e  $\alpha$ -D-glicosil na composição das fucanas é freqüentemente baixa.

A detecção do zinco nos fisóides indicou que esta organela também está envolvida na acumulação de metais pesados, como vem sendo apontado em outros trabalhos (Ragan e

Glombitza, 1986; Karez e Pereira, 1995; Schoenwaelder, 2002). A hipótese de que fisóides são organelas de acumulação de metais pesados devido somente à presença das substâncias fenólicas não pode ser confirmada. Se outras moléculas estão presentes nesta organela, o mecanismo de absorção de metais pelos fisóides pode ser ainda desconhecido. Como demonstrado neste e em outros trabalhos, os polissacarídeos aniônicos, como as fucanas e os alginatos, possuem a capacidade de ligar cátions divalentes, como metais pesados. É importante lembrar que já vem sendo apontado que polissacarídeos e substâncias fenólicas possuem afinidade entre si (Reviere, 1989).

A presença das fucanas nos fisóides de *P. gymnospora* foi confirmada pela detecção, nesta organela, de  $\alpha$ -L-fucose e em menor intensidade, de resíduos terminais de  $\alpha$ -D-manosil e  $\alpha$ -D-glicosil. Os alginatos já foram localizados dentro desta organela em outra espécie de alga parda (Vreeland *et al.*, 1988). Desta forma, os resultados de localização do metal pesado zinco nos fisóides e os resultados de localização de fucanas (determinados neste trabalho) e de localização de alginatos (Vreeland *et al.*, 1988) permitiram, em conjunto, sugerir um novo mecanismo responsável pelo processo de ligação de metais pesados aos fisóides. Este processo está relacionado às propriedades dos polissacarídeos polianiónicos que interagem com as substâncias fenólicas dentro dos fisóides.

## 14. ABSORÇÃO DE RADIAÇÃO SOLAR ULTRAVIOLETA EM ALGAS PARDAS

Diversos trabalhos na literatura tratam da caracterização dos pesos moleculares de substâncias fenólicas solúveis. Ragan & Glombitza (1986) caracterizou as substâncias fenólicas de *Ascophyllum nodosum*, os quais apresentam peso molecular médio de (13 kDa). As substâncias fenólicas da alga *Fucus vesiculosus*, caracterizada por Berglin *et al.* (2004), apresentam peso molecular variando de 3 a 25 kDa. Nesta tese, a análise por SEC das substâncias fenólicas solúveis de *P. gymnospora* revelou um peso molecular médio de ~ 10 kDa, e que é similar aos pesos encontrados para substâncias fenólicas de outras espécies de algas pardas. Por outro lado, a análise das substâncias fenólicas por RMN revelou uma estrutura majoritária compondo a amostra de 350,5 Da, a molécula do 1-(2,4,6-Trihidroxi-fenil)-tetradecano-1-um, também chamada de 2-(1'-Oxo-hexandecil)-1,3,5-trihidroxibenzeno. Este metabolito já foi identificado anteriormente em *Lobophora papenfussii* (Gerwick & Fenical, 1982).

Alguns autores descrevem que substâncias fenólicas de algas pardas podem estabelecer ligações com polissacarídeos (Koivikko *et al.* 2005; Shoenwaelder, 2002). Entretanto, nenhum resultado conclusivo foi mostrado até o momento. Nessa tese, foi possível confirmar que alginatos e compostos fenólicos encontram-se fortemente ligados entre si.

A atividade das substâncias fenólicas em uma série de processos celulares, como a sua capacidade de absorver a radiação ultravioleta, é bem determinada. Alterações na intensidade de irradiação do espectro de ultravioleta e luz visível influenciam a concentração intracelular de substâncias fenólicas, como ocorre com as micosporinas (Korbee *et al.*, 2005; Henry & Alstynne, 2004; Abdala-Díaz *et al.*, 2006). Entretanto, dados sobre a influência de outras moléculas na capacidade de absorção de UV por substâncias fenólicas são inexistentes. Os experimentos desenvolvidos neste trabalho revelaram que a ligação dos alginatos às substâncias fenólicas preserva a capacidade destes metabólitos secundários de absorverem radiação UV, quando comparados com substâncias fenólicas puras. Esta diferença pode estar relacionada à redução da instabilidade química das moléculas de substâncias fenólicas, pois aumentaria a integridade da

estrutura molecular das substâncias fenólicas. Berglin *et al.* (2004) obtiveram resultados semelhantes ao mostrarem que modificações na estrutura molecular das substâncias fenólicas alteram a capacidade destas substâncias de absorverem radiação UV. Por outro lado, vimos que a simples adição de alginatos a solução de substâncias fenólicas purificadas não provocou o mesmo efeito observado quando se encontravam ligados entre si. Este resultado deve ter sido provocado pelas modificações causadas pelos alginatos no pH das soluções de substâncias fenólicas analisadas, pois foi demonstrado que, quando em soluções alcalinizadas, as substâncias fenólicas perdem mais rapidamente a capacidade de absorverem radiação UV do que aqueles que se encontram solubilizados em pH ácido.

## 15. A MINERALIZAÇÃO DO CARBONATO DE CÁLCIO EM ALGAS PARDAS

Os efeitos dos alginatos e das fucanas na formação de cristais de carbonato de cálcio (calcita) *in vitro* foram estocásticos. Como pôde ser observada, a interação das moléculas com o cristal de calcita provocou a lentificação na mineralização de regiões de aresta do cristal. Desta forma, estas arestas tornaram-se mais aparentes e os cristais apresentaram aspecto mais arredondado. Acredita-se que este processo se deve a interação inespecífica das moléculas com o carbonato de cálcio. Assim, regiões com maiores áreas de superfície encontram-se com mais moléculas de fucanas e alginatos aderidas. Logo, estas regiões crescem mais lentamente devido a maior dificuldade do carbonato de cálcio de formar uma rede cristalina.

Por outro lado, quando foi avaliado o efeito das substâncias fenólicas isolados sobre o crescimento de cristais de carbonato de cálcio foi possível observar que estas moléculas apresentam uma atividade específica sobre o crescimento de cristais de carbonato de cálcio. A espécie cristalina dominante após o término dos experimentos continuou sendo a calcita, porém foi observado que as substâncias fenólicas inibem o crescimento de faces cristalinas específicas. Esta atividade proporcionou a formação de cristais com formato alongado e, também, a formação de inúmeras maclas (conhecidas como “twin”).

Considerando-se que estas substâncias fenólicas possam fazer parte da constituição da parede celular e que também podem ser exudadas durante alguns processos fisiológicos, como a adesão celular e em processos de defesa química (Shoenwaleder, 2002), é possível que participem da formação de um micro-ambiente adequado para a mineralização do carbonato de cálcio na superfície da parede celular das algas pardas do gênero *Padina*.

A atividade específica que as substâncias fenólicas apresentam neste processo de mineralização deve estar relacionada à sua estrutura molecular. Além de apresentarem radicais hidroxilas, os quais conferem propriedade hidrofílica à molécula, também possuem cadeias de ácidos graxos ligadas a sua estrutura aromática, conferindo-lhes também um caráter hidrofóbico. Por fim, estes metabólitos anfipáticos podem formar polímeros (Berglin *et al.*, 2004). Assim, é

provável que estas características induzam a ocorrência de processos de auto-arranjo das moléculas e em consequência apresentem diferentes graus de afinidade pelas faces de um cristal de calcita.

## 16. A FORMAÇÃO DA PAREDE CELULAR EM ALGAS PARDAS

A visualização por microscopia óptica de fluorescência dos cortes de *P. gymnospora*, evidenciou uma intensa emissão de auto-fluorescência nos fisóides, provavelmente causada pelo alto teor de compostos fenólicos dentro desta organela. O mesmo tipo de auto-fluorescência também foi visualizado nas paredes celulares, indicando a presença em potencial dos compostos fenólicos nessa estrutura. A auto-fluorescência vem sendo utilizada para determinar a distribuição de metabólitos secundários, como as próprias substâncias fenólicas. Em monocotiledôneas, a presença de substâncias fenólicas nas paredes celulares foi indicada a partir da auto-fluorescência dos compostos (Rudall & Caddick, 1994). Em algas vermelhas, esta técnica foi aplicada para revelar a presença de compostos halogenados em células glandulares de *Asparagopsis armata* (Paul *et al.*, 2006c). Curiosamente, a auto-fluorescência em *P. gymnospora* foi mais intensa nas paredes de células apicais, as quais apresentam maior atividade metabólica relacionada à formação de paredes celulares. Resultados similares já foram obtidos em zigotos da alga parda *Hormosira banksii*, indicando a participação dos substâncias fenólicas no processo de formação da parede e celular (Schoenwaelder & Clayton, 1998). Os resultados prévios da literatura e os qualitativos apresentados nesta tese obtidos por análise microscópica sugerem fortemente que as substâncias fenólicas desenvolvem um papel importante na formação da parede celular de algas pardas. Por outro lado, a composição destas substâncias fenólicas e como eles interagem com os polissacarídeos da parede celular ainda são temas não esclarecidos.

Trabalhos prévios têm demonstrado que o peso molecular de compostos fenólicos pode variar consideravelmente. Compostos fenólicos extraídos de uma única espécie apresentam variações de 0,32 a 400 KDa (Ragan & Glombtiza, 1986). Esta variação pode ser uma consequência dos procedimentos utilizados para isolar as substâncias fenólicas, os quais produzem extratos constituídos de substâncias fenólicas solúveis e insolúveis. Quando a análise é restrita às substâncias fenólicas solúveis, como mencionado no item 14 dessa discussão, a faixa de variação dos pesos moleculares é significativamente menos ampla e fica próxima a ~ 10 KDa,

como mostrado neste trabalho. Para exemplificar, as substâncias fenólicas da alga parda *Fucus serratus* possuem pesos moleculares variando de 3 to 25 KDa (Berglin *et al.*, 2004).

Como mencionado anteriormente, foi possível comprovar neste trabalho que as substâncias fenólicas co-eluem com os alginatos, evidenciando a formação de complexos de alto peso molecular, possivelmente formados *in vivo*. Desta forma, este resultado traz uma nova informação que será relevante no estudo das propriedades físico-químicas dos alginatos.

A influência das substâncias fenólicas nas propriedades reológicas dos alginatos tem sido bastante discutida, principalmente devido às aplicações biotecnológicas deste polissacarídeo. Alguns autores sugerem que a viscosidade dos alginatos decresce devido à contaminação da amostra provocada por substâncias fenólicas (Moen *et al.*, 1997a, 1997b; Davis *et al.*, 2004; Tame *et al.*, 2006). Em contraste, outros autores sugerem que as substâncias fenólicas teriam um efeito contrário, pois inibem a atividade microbiana nas amostras de alginatos e conseqüentemente reduziriam especificamente a atividade das enzimas alginato liases produzidas por bactérias. Como conseqüência, as substâncias fenólicas preservariam a propriedade viscosa dos alginatos por mais tempo (Moen *et al.*, 1997b).

Nesta tese, foi observado que os alginatos obtidos de duas espécies diferentes de algas pardas, *P. gymnospora* e *F. vesiculosus*, os quais diferem na quantidade de substâncias fenólicas ligadas (o segundo não apresenta compostos fenólicos ligados), apresentam valores de viscosidade significativamente diferentes. Observou-se também que a adição de substâncias fenólicas as soluções de alginatos purificados de *F. vesiculosus* não modificou significativamente a viscosidade da solução destes polissacarídeos.

Em relação às ligações estabelecidas entre as substâncias fenólicas e polissacarídeos, tem sido sugerido que a interação entre estas moléculas é resultante de interações químicas fracas, como pontes de hidrogênio (McManus *et al.*, 1985; Le Bourvellec *et al.*, 2004; Koivikko *et al.*, 2005). Entretanto, também tem sido proposto que estas interações podem envolver ligações covalentes, possivelmente do tipo éster ou hemiacetal (Vreeland *et al.*, 1998; Schoenwaelder, 2002; Arnold & Targett, 2003; Koivikko *et al.*, 2005). A ligação dos polissacarídeos às substâncias fenólicas através de pontes éster-éter tem sido demonstrada para grupos de plantas (Lozovaya *et*

*al.*, 1999; Xua *et al.*, 2005; Kerr & Fry, 2004; Lewis & Yamamoto, 1990; de Ascensão & Dubery, 2003). Para alguns autores, as ligações entre substâncias fenólicas de algas pardas e os alginatos podem estar relacionadas ao processo de degradação das substâncias fenólicas, o qual ocorreria imediatamente após sua passagem pelas paredes celulares (Koivikko *et al.*, 2005). Segundo esta teoria, oxidações não específicas poderiam causar as modificações necessárias na estrutura das substâncias fenólicas para que se ligassem aos alginatos.

A proposição de que um agente específico é necessário para catalisar as ligações entre as substâncias fenólicas e os alginatos foi previamente sugerida (Vreeland *et al.*, 1998; Schoenwaelder, 2002; Arnold & Targett, 2003; Koivikko *et al.*, 2005), sendo a enzima bromoperoxidase dependente de vanádio (VBPO) o “catalisador” desta reação. Entretanto, nenhuma evidência experimental para esta proposição foi reportada nestes trabalhos (Vreeland *et al.*, 1998; Schoenwaelder, 2002; Arnold & Targett, 2003; Koivikko *et al.*, 2005). Os três tipos de haloperoxidases (bromoperoxidases, cloroperoxidases e iodoperoxidases) foram descritos em diversos gêneros de algas vermelhas e pardas, como *Corallina*, *Laminaria*, *Fucus* e *Dictyota* (Rush *et al.*, 1995; Almeida *et al.*, 1998; Shimonishi *et al.*, 1998; Vreeland *et al.*, 1998; Weyand *et al.*, 1999; Colin *et al.*, 2004). Apesar da diversidade entre as divisões de algas, a evolução e a similaridade das bromoperoxidases dependentes de vanádio foram demonstradas por análise filogenética. Foi observado que a estrutura geral das proteínas é altamente conservada e também que os sítios ativos e os mecanismos de reação são quase idênticos (Colin *et al.*, 2005). Estes dados foram essenciais para validar os resultados obtidos nesta tese, desde que foi utilizada uma enzima VBPO purificada da alga vermelha *Corallina officinalis* e compostos fenólicos e alginatos de algas pardas.

Nossos resultados utilizando SEC confirmaram a atividade específica da enzima VBPO como um catalisador da reação de ligação entre substâncias fenólicas e alginatos, devido à co-eluição dos substâncias fenólicas com o alginato. Quando a VBPO não foi incluída nas soluções de incubação, nenhum complexo de alto peso molecular foi formado. Estes resultados confirmaram que a enzima é necessária para a ligação entre as duas moléculas. Em relação à viscosidade, quando a enzima foi adicionada na solução de incubação, foi possível observar uma

redução significativa da viscosidade do alginato resultante (produto da reação). Uma possível explicação para esta redução pode estar relacionada ao fato de que as substâncias fenólicas, quando ligados, previnem em algum grau o processo de auto-arranjo do alginato, o qual normalmente acontece de acordo com o modelo “caixa de ovo” (“egg-box model”) (Kloareg & Quatrano, 1988). Desta forma, foi possível mimetizar, *in vitro*, as condições necessárias para a formação de ligações entre os compostos fenólicos e os alginatos.

Como proposto de uma maneira esquemática na figura 30, a atividade da VBPO é essencial para promover as modificações estruturais nas substâncias fenólicas para que ocorra o processo de ligação com os resíduos de ácidos urônicos constituintes do alginato. Estas modificações são bastante similares àquelas demonstradas em trabalhos prévios relacionados ao mecanismo de polimerização das moléculas de floroglucinol para formar as substâncias fenólicas (Gross & Sizer, 1959; Eickhoff *et al.*, 2001; Oudgenoeg *et al.*, 2002; Berglin *et al.*, 2004). É possível que a oxidação e a isomerização sejam as primeiras modificações a ocorrerem. Estas modificações podem produzir duas vacâncias químicas no átomo de carbono da estrutura cíclica do floroglucinol (etapa 1). Após, a combinação entre o floroglucinol oxidado e o ácido urônico caracteriza o início do processo de ligação. Nesta etapa, uma das vacâncias do floroglucinol é reduzida e a vacância do ácido urônico é eliminada. Na etapa 3, a enzima VBPO atua no processo de halogenação reduzindo a última vacância presente na molécula de floroglucinol. Finalmente, após o rearranjo do halogênio (ou hidrogênio) recém incluído na estrutura do floroglucinol, o processo de ligação da substância fenólica com o alginato está finalizado (etapa 4).

É importante ressaltar que a participação das substâncias fenólicas na constituição da parede celular não pode ser considerada uma característica exclusiva das algas pardas. Trabalhos anteriores têm proposto que, em plantas superiores, um processo similar ocorre durante a formação das paredes celulares (Tamagnone *et al.*, 1998). As substâncias fenólicas envolvidos neste processo são: a lignina, um polímero de unidades de monolignol ligados por acoplamento oxidativo; e os ácido hidroxicinâmicos de baixo peso molecular, os quais podem atuar como pontes moleculares nas paredes celulares de plantas (Wallace & Fry, 1994). Outros trabalhos mostraram que as pectinas estão ligadas a outras pectinas ou a polissacarídeos não-

celulósicos através de ligações éster com ácido hidroxicinâmicos (Fry, 1986; Parr *et al.*, 1996; Waldron *et al.*, 1997).

Também foi demonstrado que o mecanismo de formação da parede celular em plantas superiores depende da atividade de enzimas peroxidases. Nesta tese, foi demonstrado que em algas pardas, consideradas mais primitivas na árvore filogenética, este processo é catalisado por bromoperoxidases dependentes de vanádio, enquanto alguns autores mostraram que em plantas superiores outras peroxidases, como as lacases, atuam no processo de lignificação e também na ligação de compostos fenólicos a polissacarídeos da parede celular (Li *et al.*, 1989; Lewis & Yamamoto, 1990; McDoughall, 1993; Wallace & Fry, 1995; Ranocha *et al.*, 2002; Caparros-Ruiz *et al.*, 2006). Desta forma, foi mostrado que a interação entre substâncias fenólicas e polissacarídeos é uma característica comum de espécies de algas pardas e do grupo Viridiplantae. Inquestionavelmente, estes achados contribuem para diminuir a distância evolucionária entre esses dois grupos.

## 17. O METABOLISMO SECUNDÁRIO EM ALGAS VERMELHAS

Neste trabalho, através da análise ultra-estrutural, foi possível observar que as organelas denominadas corpos em cereja apresentam, em condições normais, conteúdo homogêneo. Bodard (1968) é a única referência na literatura a respeito da ultraestrutura dessas organelas, onde a descreve como apresentando aspecto de colméia de abelha e conteúdo irregular. Essa diferença descritiva se deve provavelmente a algum fator associado que não permitiu uma boa preservação celular à época que o referido trabalho foi realizado. É possível que uma fraca eficiência do processo de fixação química associada à elevada volatilidade do conteúdo presente nesta organela tenha resultado na produção de artefatos.

Em relação ao conteúdo dos corpos em cereja, Young *et al.* (1980) investigou a natureza dos compostos internalizados dentro desta organela através da microanálise de raios-X. Baseado na detecção do elemento bromo, sugeriu que esta organela fosse responsável pelo armazenamento dos compostos halogenados de *Laurencia* (compostos brominados). Entretanto, sua conclusão baseou-se somente na apresentação de um único espectro de EDXA, no qual se detectou o bromo em um único pico de emissão, o  $L\alpha$  (1,486 keV). Outros picos de emissão de raios-X do elemento bromo não foram detectados, pois a técnica foi realizada com 20kV de voltagem de aceleração e não possui energia suficiente para causar a ionização dos elétrons da camada eletrônica “K” do bromo. Além disso, não se pode garantir que o pico de Br presente no espectro não possa ser resultante da presença do elemento alumínio, pois o valor do seu  $K\alpha$  (=1,480 keV) é altamente semelhante ao  $L\alpha$  do bromo. Esta suspeita “contaminação” com alumínio se deve à presença desse elemento em impurezas comuns, como a poeira. Apenas para exemplificar, experimentos desenvolvidos por nosso grupo de pesquisa, realizados nas mesmas condições descritas por Young *et al.* (1980), não foram capazes de reproduzir seus resultados. Também é possível que os elementos detectados na amostra de Young *et al.* (1980) não fossem provenientes dos corpos em cereja, pois foi utilizado um diâmetro de feixe de elétrons extremamente largo (500 nm) e as regiões dos corpos não definida no trabalho.

Nesta tese, a detecção do elemento bromo nos corpos em cereja só foi possível a partir do momento que esta organela foi isolada através da utilização do sistema de micromanipulação. Desde que foi utilizada uma aceleração de voltagem de 100 kV, foi possível ionizar elétrons das camadas K e L do bromo. Desta forma, foram detectados no espectro de emissão de raios-X mais picos de emissão do bromo ( $K\alpha$ ,  $K\beta$  e  $L\alpha$ ). Outro elemento presente na estrutura molecular do elatol (composto halogenado sintetizado pela alga *L. obtusa*), o cloro, também foi detectado. Assim, confirmou-se, indiretamente, que os corpos em cereja são organelas especializadas no armazenamento dos compostos halogenados no gênero *Laurencia*.

Entretanto, foi possível sugerir, a partir dos resultados de microscopia óptica de fluorescência, que a distribuição dos compostos halogenados dentro das células corticais de *L. obtusa* não é restrita aos corpos em cereja. Como já mencionado, a propriedade auto-fluorescente dos metabólitos secundários têm sido utilizada para indicar a sua localização sub-celular. Através da utilização da microscopia óptica de fluorescência, foi possível observar um padrão de auto-fluorescência presente tanto nos corpos em cereja quanto em outras regiões da célula. Vesículas localizadas principalmente na periferia da célula e inclusões dentro dos cloroplastos (elétrondensas ao microscópio eletrônico de transmissão) apresentaram a mesma auto-fluorescência encontrada nos corpos em cereja.

A partir desses resultados obtidos, questiona-se a localização dos compostos halogenados dentro dos cloroplastos. É possível que estes compostos estejam sendo sintetizados nesta organela, ou pelo menos, parte do processo de síntese esteja acontecendo nos cloroplastos. A fundamentação teórica para fortalecer essa teoria é que se sabe que, durante o processo de foto-inibição, o fluxo de elétrons nos cloroplastos cai, provocando a dissipação da energia através da fluorescência, da produção de singletos de oxigênio e, por fim, a produção de peróxido de hidrogênio nas membranas tilacóides (Demmig-Adams & Adams III, 1992; Aro *et al.*, 1993; Sundström *et al.*, 1996). Em seguida, o peróxido de hidrogênio é utilizado por enzimas peroxidases presentes nos cloroplastos ou, também, por catalases presentes nos peroxissomos (Pamatmat, 1988; Foyer *et al.*, 1993; Sundström *et al.*, 1996). É descrito que plantas superiores e algas possuem diferentes formas de peroxidases nos cloroplastos, as quais realizam

hidroxilações, entre outras reações (Theiler *et al.*, 1978; Sundström *et al.*, 1996). Em algas vermelhas essas enzimas podem ser as bromoperoxidases e as cloroperoxidases (Theiler *et al.*, 1978; Sundström *et al.*, 1996). Estas enzimas podem utilizar peróxido de hidrogênio, bromo, cloro e cetonas (e outros compostos) como substratos para formar derivados halocarbonados, como por exemplo, os metabólitos secundários halogenados (Theiler *et al.*, 1978; Sundström *et al.*, 1996). Assim, em função dos resultados obtidos e dos dados apresentados na literatura, sugerimos que os cloroplastos participam da rota biosintética dos compostos halogenados produzidos pelo gênero *Laurencia*.

Em relação à caracterização dos corpos em cereja, os resultados desta tese, obtidos através da utilização da microscopia de pinça óptica, confirmaram que uma única estrutura é a principal responsável pela fixação mecânica dos corpos em cereja a periferia da célula, como sugerido anteriormente (Godin, 1970). Como uma nova característica destas células, foi possível verificar que há um mecanismo de transporte de vesículas ao longo de estruturas de conexão que ligam os corpos e cereja à periferia da célula. Estas conexões tubulares membranosas são as estruturas responsáveis pela transferência de compostos halogenados a partir dos corpos em cereja para a superfície do talo da alga *L. obtusa*. Assim, acredita-se que este processo de transferência é fundamental para o sistema de defesa química da alga, principalmente naquilo que tange a defesa química contra a bioincrustação.

A defesa química contra a bioincrustação é um assunto ainda polêmico e pouco esclarecido. Experimentos *in vitro* têm demonstrado que as concentrações de elatol encontradas na superfície do talo das algas *L. rigida* (~ 1ng/cm<sup>2</sup>) e *L. obtusa* (0.5 – 10 ng.cm<sup>-2</sup>) são pouco efetivas como defesa química contra organismos incrustantes (De Nys *et al.*, 1996; Sudatti *et al.*, no prelo). Assim, como poderia ser explicada a propriedade anti-incrustante *in vivo* encontrada nas espécies de *Laurencia*? A princípio, não pode ser desconsiderado o fato de que as concentrações de compostos halogenados determinadas na superfície do talo destas algas não representam as variações que podem ocorrer durante o tempo. A descoberta do mecanismo de transferência de compostos halogenados dos corpos em cereja para a periferia das células é um

fator determinante para esta discussão, visto que é possível que as concentrações superficiais de elatol variem de acordo com condições ambientais, as quais ainda não foram determinadas.

A velocidade do transporte vesicular ao longo das conexões tubulares membranosas foi igual a  $\sim 40 \text{ nm.s}^{-1}$ . Trabalhos prévios (D'Andrea *et al.*, 1994; Schott *et al.*, 2002) descrevem velocidades de transporte vesicular que variam entre 100 e 10  $\text{nm.s}^{-1}$ . Estes trabalhos demonstraram que, a essas velocidades, o transporte vesicular está geralmente relacionado à atividade de proteínas da classe de miosinas não-convencionais. Em contraste, Morimatsu *et al.* (2000) identificaram uma classe de miosina também não-convencional na alga verde *Chara*. Surpreendentemente, este tipo de miosina consegue percorrer um filamento de actina a  $60 \mu\text{m/s}$ , uma velocidade dez vezes maior do que a velocidade de uma miosina de músculo esquelético. O tráfego vesicular em maiores velocidades também tem sido relacionado à participação de proteínas motoras de microtúbulos (Hirokawa *et al.*, 1996; Ruthardt *et al.*, 2005; Shaw *et al.*, 2007). Estes trabalhos têm registrado que, em concentrações normais de ATP, as velocidades de vesículas guiadas por cinesinas varia de 600 a 1500  $\text{nm.s}^{-1}$ . Contudo, foi demonstrado que concentrações mínimas de ATP podem fazer com que a cinesina “caminhe” a velocidades de  $\sim 10 \text{ nm.s}^{-1}$  (Schnitzer & Block, 1997). Mas, considerando que estas concentrações só conseguiram ser avaliadas *in vitro*, pode-se sugerir que o transporte de vesículas oriundas dos corpos em cereja em direção a parede celular deve ser guiado por proteínas da classe das miosinas. Entretanto, são necessários mais estudos para compreender melhor este processo.

As mesmas condições ambientais que podem induzir um aumento da frequência de vesículas com compostos halogenados em direção a parede celular, podem também ser responsáveis pelo desencadeamento dos possíveis processos de morte celular registrados nesta tese, que também podem contribuir de forma inegável para o aumento da concentração de elatol na superfície do talo de *L. obtusa*. É possível que a degradação dos corpos em cereja esteja relacionada a eventos de morte celular necrótica e programada. Até o momento, estudos sobre a morte celular programada em algas são escassos (Segovia *et al.*, 2003). Alguns autores sugerem que a morte celular programada pode ser provocada tanto por foto-sensibilização quanto por estresse salino (Huh *et al.*, 2002; Ning *et al.*, 2002; Danon *et al.*, 2004; Hope & Wilson, 2006).

Estes dados são extremamente importantes, pois o evento de morte no qual corpos em cereja não se fragmentaram e que foi considerado o mais sincronizado pode ter sido provocado por estresse salino, dada a evaporação gradual da água do mar onde a amostra foi mantida durante o processo de vídeo-microscopia. Assim, como última proposição, sugere-se que este evento de degradação mencionado possa estar relacionado à morte celular programada.

## CONCLUSÕES

## 18. O METABOLISMO SECUNDÁRIO EM ALGAS PARDAS

- Os fisóides podem ser caracterizados como organelas capazes de acumular metais pesados, quando a alga parda *Padina gymnospora* estiver submetida a concentrações elevadas destes elementos.
- O mecanismo de acumulação de metais pelos fisóides deve estar relacionado às interações existentes entre substâncias fenólicas e polissacarídeos, já que fucanas foram detectadas indiretamente dentro desta organela e foram consideradas como polissacarídeos responsáveis pela acumulação nas paredes celulares de *P. gymnospora*.
- A análise do alginato isolado de *P. gymnospora* por cromatografia de separação por peso molecular confirmou que os compostos fenólicos presentes nesta fração estão efetivamente ligados a este polissacarídeo.
- O processo de ligação entre substâncias fenólicas e alginatos contribui especificamente para a preservação da capacidade de absorção de radiação UV por estes metabólitos secundários.
- Por outro lado, a mistura de alginato purificado com substâncias fenólicas causa modificações no pH da solução que induzem a diminuição da capacidade destes metabólitos de absorverem a radiação UV, evidenciando que a atividade dos alginatos é dependente do grau de interação estabelecido com as substâncias fenólicas.
- Sugere-se que as substâncias fenólicas de *P. gymnospora* apresentam atividade no processo de mineralização do carbonato de cálcio, pois influenciam de forma específica na formação dos cristais de calcita *in vitro*.
- Os alginatos e as fucanas extraídas de *P. gymnospora* não influenciam especificamente na cristalização do carbonato de cálcio *in vitro*.

- Não há ligação *in vitro* entre substâncias fenólicas de *P. gymnospora* e alginato purificado da alga parda *Fucus vesiculosus* sem a ação de um mediador químico específico.
- A enzima bromoperoxidase dependente de vanádio (VBPO) catalisa o processo de ligação entre as substâncias fenólicas e os alginatos *in vitro*, e é sugerido que esta enzima seja o mediador químico responsável pelo processo de ligação *in vivo*.
- A ligação com as substâncias fenólicas provoca a redução significativa dos valores de viscosidade dos alginatos, tanto nos isolado de *P. gymnospora* quanto no isolado de *F. vesiculosus* ligado *in vitro* pela ação da VBPO.
- A mistura das substâncias fenólicas com alginatos isolados de *F. vesiculosus* em solução, sem a adição da VBPO, não provoca a redução significativa na viscosidade do alginato.
- Os resultados obtidos neste trabalho confirmam que as paredes celulares de algas pardas também são constituídas por substâncias fenólicas, os quais são possivelmente ligados a essa estrutura devido à ação da VBPO e desempenham papel estrutural.
- Estes resultados revelam uma similaridade no processo de formação da parede celular de algas pardas e vegetais superiores (Viridiplantae). Desta forma, os resultados obtidos contribuem para demonstrar que o processo de formação da parede celular é evolutivamente antigo e diminui a distância filogenética entre estes dois “grupos”.

## 19. O METABOLISMO SECUNDÁRIO EM ALGAS VERMELHAS

- O corpo em cereja é a organela principal de armazenamento dos compostos halogenados produzidos pela vermelha *Laurencia obtusa*.
- Os compostos halogenados não estão restritos aos corpos em cereja, pois podem ser encontrados também em vesículas distribuídas pelo citoplasma ou aderidas a parede celular, e também, em inclusões localizadas no interior dos cloroplastos.
- Sugerimos que o cloroplasto participa do processo de síntese dos compostos halogenados em *Laurencia*.
- Os compostos halogenados são transferidos a partir dos corpos em cereja para a parede celular em vesículas que migram por conexões tubulares membranosas, as quais atravessam o vacúolo celular.
- A fixação mecânica dos corpos em cereja a periferia da célula ocorre principalmente através de uma única estrutura. As conexões membranosas de transporte não desempenham papel essencial neste processo de fixação.
- A degradação dos corpos em cereja pode representar dois aspectos morfológicos distintos, os quais podem estar relacionados a eventos de morte celular programada e não-programada.
- Os eventos de morte celular podem estar relacionados ao processo de defesa química, visto que resultam na liberação de elevadas quantidades de compostos halogenados para a superfície do talo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdala-Díaz, R. T.; Cabello-Pasini, A.; Pérez-Rodríguez, E.; Conde Álvarez, R. M.C. & Figueroa, F. L. (2006). Daily and seasonal variations of optimum quantum yield and PC in *Cystoseira tamariscifolia* (Phaeophyta). *Mar. Biol.*, **148**: 459-465.
- Almeida, M., Humanes, M., Melo, R., Silva, J.A., da Silva, J.J.R.F. & Vilter, H. (1998) *Saccorhiza polyschides* (Phaeophyceae; Phyllariaceae): A new source for vanadium dependent haloperoxidases. *Phytochemistry*, **48** (2): 229-239.
- Al-Ogily, S.M. & Knight-Jones, E.W. (1977) Anti-fouling role of antibiotics produced by marine algae and bryozoans. *Nature*, **265**: 728-729.
- Amado Filho, G.M. (1996). Metais pesados e macroalgas marinhas: resultados de campo, ensaios em laboratório e localização ultraestrutural. Tese de Doutorado, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, UFRJ, pp: 106.
- Amado Filho, G.M.; Andrade, L.R.; Karez, C.S.; Farina, M. & Pfeiffer, W.C. (1999). Brown algae species as biomonitors of Zn and Cd at Sepetiba Bay, Rio de Janeiro, Brazil. *Marine Environmental Research*, **48** (3): 213-224.
- Andrade, L.R.; Farina, M. & Amado Filho, G.M. (2002) Role of *Padina gymnospora* (DICTYOTALES, PHAEOPHYCEAE) cell walls in cadmium accumulation. *Phycologia*, **41** (1): 39-48.
- Andrade, L.R.; Salgado, L.T.; Farina, M.; Pereira, M.S.; Mourão, P.A.S. and Amado Filho, G.M. (2004) Ultrastructure of acidic polysaccharides from the cell walls of brown algae. *Journal of Structural Biology*, **145**: 216-225.
- Arnold, T.M. & Targett, N.M. (2003) To grow and defend: lack of tradeoffs for brown algal phlorotannins. *OIKOS*, **100** (2): 406-408.
- Aro, E.; McCaffery, S. & Anderson, J. M. (1993) Photoinhibition and D1 protein degradation in peas acclimated to different growth irradiance. *Plant Physiol.* **103** (3): 835.
- Arroniz-Crespo, M.; Sinha, R. P.; Martinez-Abaigar, J.; Nunez-Olivera, E. & Hader, D. P. (2005) Ultraviolet radiation-induced changes in mycosporine-like amino acids and physiological variables in the red alga *Lemanea fluviatilis*. *J. Freshwat. Ecol.*, **20** (4):677-687.

- Ashkin, A. & Dziedzic, J.M. (1987) Optical trapping and manipulation of viruses and bacteria. *Science*, **235** (4795): 1517-1520.
- Berglin, M.; Delage, L.; Potin, P.; Vilter, H. & Elwing, H. (2004) Enzymatic cross-linking of a phenolic polymer extracted from the marine alga *Fucus serratus*. *Biomacromolecules*, **5** (6): 2376-2383.
- Bernstein, B.B. & Jung, N. (1979) Selective pressures and coevolution in a kelp canopy community in Southern-California. *Ecol. Monogr.*, **49**: 335-355.
- Bhadury, P. & Wright, P.C. (2004). Exploitation of marine algae: biogenic compounds for potential antifouling application. *Planta*, **219**: 561-578.
- Bilan, I.M.; Grachev, A.A.; Ustuzhanina, N.E.; Shashkov, A.S.; Nifantiev, N.E. & Usov, A.I. (2002) Structure of a fucoidan from the brown seaweed *Fucus evanescens* C.Ag.. *Carbohydrate Research*, **337**: 719-730.
- Blackman, A.J.; Rogers, G.I. & Volkman, J.K. (1988) Phloroglucinol derivatives from three Australian marine algae of the genus *Zonaria*. *J. Nat. Prod.* **51** (1): 158-160.
- Bodard, M. (1968) Infrastructure of cherry bodies of *Laurencia* (Rhodomelaceae Ceramiales). *Comptes rendus hebdomadaires des ceances de L'Academie des Sciences serie D*, **266** (26): 2393.
- Callow, M.E. & Callow, J.A. (2002) Marine biofouling: a sticky problem. *Biologist*, **49** (1): 1-5.
- Caparros-Ruiz, D.; Fornale, S.; Civardi, L.; Puigdomenech, P. & Rigau, J. (2006) Isolation and characterisation of a family of laccases in maize. *Plant Sci.*, **171** (2): 217-225.
- Chevolot, L.; Mulloy, B.; Ratiskol, J.; Foucault, A. & Collic-Jouault, S. (2000). A disaccharide repeat unit is the major structure in fucoidans from two species of brown algae. *Carbohydrate Research*, **330**: 529-535.
- Chizhov, A.S.; Dell, A.; Morris, H.R.; Haslam, S.M.; McDowell, R.A.; Shashkov, A.S.; Nifant'ev, N.E.; Khatuntseva, E.A. & Usov, A.I. (1999) A study of fucoidan from the brown seaweed *Chorda filum*. *Carbohydrate Research*, **320**: 108-119.

- Chung, T.W.; Yang, J.; Akaike, T.; Cho, K.Y.; Nah, J.W. Kim, S.I. & Cho, C.S. (2002) Preparation of alginate/galactosylated chitosan scaffold for hepatocyte attachment. *Biomaterials*, **23**: 2827-2834.
- Cirne-Santos, C.C.; Teixeira, V.L.; Castello-Branco, L.R.; Frugulhetti, I.C.P.P. & Bou-Habib, D.C. (2006) Inhibition of HIV-1 replication in human primary cells by a dolabellane diterpene isolated from the marine algae *Dictyota paffii*. *Planta Medica*, **72** (4): 295-299.
- Colin, C.; Leblanc, C.; Wagner, E.; Delage, L.; Leize-Wagner, E.; Van Dorsselaer, A.; Kloareg, B. & Potin, P. (2005) The brown algal kelp *Laminaria digitata* features distinct bromoperoxidase and iodoperoxidase activities. *J. Biol. Chem.* **278** (26): 23545-23552.
- Correa, J.A.; Castilla, J.C.; Ramirez, M.A.; Varas, M.; Lagos, N.; Vergara, S.; Moenne, A.; Roman, D. & Brown, M.T. (1999) Copper, copper mine tailings and their effects on marine algae in Northern Chile. *J. Appl. Phycol*, **11**: 57-67.
- D'Andrea, L.; Danon, M.A.; Sgourdas, G.P. & Bonder, E.M. (1994) Identification of coelomocyte unconventional myosin and its association with *in vivo* particle/vesicle motility. *Journal of Cell Science*, **107**: 2081-2094.
- Da Gama, B.A.P.; Pereira, R.C.; Carvalho, A.G.V.; Coutinho, R. & Yoneshigue-Valentin, Y. (2002) The effects of seaweed secondary metabolites on biofouling. *Biofouling*, **18**: 13-20.
- Danon, A.; Rotari, V.I.; Gordon, A.; Mailhac, N. & Gallois, P. (2004) Ultraviolet-C overexposure induces programmed cell death in *Arabidopsis*, which is mediated by caspase-like activities and which can be suppressed by caspase inhibitors, p35 and defender against apoptotic death. *The Journal of Biological Chemistry*, **279** (1): 779-787.
- Davis, T.A.; Ramirez, M.; Mucci, A. & Larsen, B. (2004) Extraction, isolation and cadmium binding of alginate from *Sargassum spp.*. *J. Appl. Phycol.*, **16** (4): 275-284.
- De Ascensão, A.R.F.D.C. & Dubery, I.A. (2003) Soluble and wall-bound phenolics and phenolic polymers in *Musa acuminata* roots exposed to elicitors from *Fusarium oxysporum* f.sp. cubense. *Phytochemistry*, **63** (6): 679-686.

- De Nys, R.; Steinberg, P.D.; Willemsen, P.; Dworjanyn, S.A.; Gabelish, C.L. & King, R.J. (1991) Broad spectrum effects of secondary metabolites from the red alga *Delisea pulchra* in antifouling assays. *Biofouling*, **8**: 259-271.
- Demmig-Adams, B. & Adams III, W.W. (1992) *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **43**: 599.
- Dietrich, C.P.; Farias, G.G.M.; de Abreu, L.R.D.; Leite, E.L.; Silva, L.F. & Nader, H.B. (1995) A new approach for the characterization of polysaccharides from algae: presence of four main acidic polysaccharides in three species of the class Phaeophyceae. *Plant Science*, **108**: 143-153.
- Diffey, B. L. (2002) Sources and measurement of ultraviolet radiation. *Methods*, **28**: 4-13.
- Dworjanyn, S.A.; de Nys, R. & Steinberg, P.D. (1999) Localization and surface quantification of secondary metabolites in the red alga *Delisea pulchra*. *Mar. Biol.*, **133**: 727-736.
- Eickhoff, H.; Jung, G. & Rieker, A. (2001) Oxidative phenol coupling - tyrosine dimers and libraries containing tyrosyl peptide dimers. *Tetrahedron*, **57**(2): 353-364.
- Farina, M. & Amado Filho, G.M. 2007. Biomineralização em organismos marinhos. *In*: Pereira, R.C. & Soares-Gomes, A. (orgs.) *Biologia Marinha*. 2ª edição. Editora Interciência, Rio de Janeiro, no prelo.
- Feitosa, M.I.M. & Mesquita, O.N. (1991) Wall-drag effect on diffusion of colloidal particles near surfaces – a photon-correlation study. *Phys. Rev. A*, **44**(10): 6677-6685.
- Feldmann, J. & Feldmann, G. (1950) Les corps en cerise du *Laurencia obtusa* (Huds) Lamour. *Comptes rendus hebdomadaires des ceances de L'Acadmie des Sciences*, **231** (23): 1335-1337.
- Fenical, W. (1975) Halogenation in the Rhodophyta, A Review. *Journal of Phycology*, **11**: 245-259.
- Fernandez, M.S.; Passalacqua, K.; Arias, J.I. and Arias, J.L. (2004) Partial biomimetic reconstitution of avian eggshell formation. *Journal of Structural Biology*, **148**: 1-10.
- Foyer, C.H.; Lelandais, M. & Kunnert, K.J. (1994) *Physiol. Plant.* **92**: 696.
- Franklin, L.A. & Forster, R.M. (1997) The changing irradiance environment: consequences for marine macrophyte physiology, productivity and ecology. *Eur. J. Phycol.*, **32**: 207-232.

- Fry, S. (1986) Cross-linking of matrix polymers in the growing cell walls of angiosperms. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, **37**: 165-186.
- Gerwick, W. & Fenical, W. (1982) Phenolic lipids from related marine algae of the order Dictyotales. *Phytochemistry*, **21** (3): 633-637.
- Godin, J. (1970) Ultrastructure of pedicle of body of cherry of *Laurencia scoparia*. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Seances de L'academie des Sciences Serie D*, **271** (19): 1669-1671.
- Gross, A.J. & Sizer, I.W. (1959) Oxidation of tyramine, tyrosine, and related compounds by peroxidase. *J. Biol. Chem.*, **234** (6): 1611-1614.
- Häder, D. P.; Kumar, H. D.; Smith, R. C. & Worrest, R. C. (1998) Effects on aquatic ecosystems. *J. Photochem. Photobiol. B*, **46**: 53–68.
- Hanelt, D.; Wiencke, C. & Nultsch, W. (1997) Influence of UV-radiation on the photosynthesis of arctic macroalgae in the field. *J. Photochem. Photobiol. B*, **38**: 40-47.
- Hay, M.E. & Fenical, W. (1988) Marine plant-herbivore interactions: the ecology of chemical defense. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **19**: 111-145.
- Henry, B.E. & Alstyne, K.L.V. (2004) Effects of UV radiation on growth and phlorotannins in *Fucus gardneri* (Phaeophyceae) juveniles and embryos. *J. Phycol.*, **40**: 527–533.
- Hirokawa, N. (1996). Organelle transport along microtubules – the role of KIFs. *Trends in Cell Biology*, **6**: 135-141.
- Holzinger, A. & Lütz, C. (2006) Algae and UV irradiation: Effects on ultrastructure and related metabolic functions. *Micron*, **37**:190–207.
- Hope, C.K. & Wilson, M. (2006) Induction of lethal photosensitization in biofilms using a confocal scanning laser as the excitation source. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **57**: 1227–1230.
- Huh, G.H.; Damsz, B.; Matsumoto, T.K.; Reddy, M.P.; Rus, A.M.; Ibeas, J.I.; Narasimhan, M.L.; Bressan, R.A. & Hasegawa, P.M. (2002) Salt causes ion disequilibrium-induced programmed cell death in yeast and plants. *The Plant Journal*, **29** (5): 649-659.

- John, D.M.; Hawkins, S.J. & Price, J.H. (1992) Plant-animal interactions in the marine benthos. Systematics Association, Special Volume, 46. Clarendon Press, Oxford, England.
- Karez, C.S. & Pereira, R.C. (1995) Metal contents in polyphenolic fractions extracted from the brown alga *Padina gymnospora*. *Botanica Marina*, **38**: 151-155.
- Karez, R.; Engelbert, S. & Sommer, U. (2000) 'Co-consumption' and 'protective coating': two new proposed effects of epiphytes on their macroalgal hosts in mesograzer-epiphyte-host interactions. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **205**: 85-93.
- Katsuoka, M.; Ogura, C.; Etoh, H.; Sakatam, K. & Ina, K. (1990) Galactosyldiacylglycerols and sulfoquinovosyldiacyl-glycerols isolated from the brown algae, *Undaria pinnatifida* and *Costaria costata* as repellents of the blue mussel, *Mytilus edulis*. *Agr. Biol. Chem.*, **54**: 3043-3044.
- Kerr, E.M. & Fry, S.C. (2004) Extracellular cross-linking of xylan and xyloglucan in maize cell-suspension cultures: the role of oxidative phenolic coupling. *Planta*, **219** (1): 73–83.
- Kloareg, B. & Quatrano, R. S. (1988) Structure of the cell walls of marine algae and ecophysiological functions of the matrix polysaccharides. *Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev.*, **26**: 259-315.
- Kloareg, B.; Demarty, M. & Mabeu, S. (1986) Polyanionic characteristics of purified sulphated homofucans from brown algae. *International Journal of Biological Macromolecules*, **8**: 380-386.
- Koivikko, R.; Lojonen, J.; Hokanen, T. & Jormalainen, V. (2005) Contents of soluble, cell-wall-bound and exuded phlorotannins in the brown alga *Fucus vesiculosus*, with implications on their ecological functions. *J. Chem. Ecol.*, **31** (1): 195-212.
- Korbee, N.; Figueroa, F. L. & Aguilera, J. (2005) Effect of light quality on the accumulation of photosynthetic pigments, proteins and mycosporine-like amino acids in the red alga *Porphyra leucosticta* (Bangiales, Rhodophyta). *J. Photochem. Photobiol. B*, **80**:71–78.
- Krishnamurthy KV (1999) Methods in cell wall cytochemistry. CRC press, Boca Raton, Florida.
- Lau, S.C.K. & Qian, P.Y. (2000) Inhibitory effect of phenolic compounds and marine bacteria on larval settlement of the barnacle *Balanus amphitrite* Darwin. *Biofouling*, **16** (1): 47-58.

- Le Bourvellec, C.; Guyot, S. and Renard, C.M.G.C. (2004) Non-covalent interaction between procyanidins and apple cell wall material Part I. Effect of some environmental parameters. *BBA - GEN subjects*, **1672** (3): 192-202.
- Lewis, N.G. & Yamamoto, E. (1990) Lignin: occurrence, biogenesis and biodegradation. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **41**: 455–496.
- Li, Z.C.; McClure, J.W. & Hagerman, A.E. (1989) Soluble and bound apoplastic activity for peroxidase, beta-glucosidase, malate-dehydrogenase, and nonspecific arylesterase, in Barley (*Hordeum-vulgare* L) and Oat (*Avena-Sativa* L) primary leaves. *Plant Physiol.*, **90** (1),:185-190.
- Lozovaya, V.V., Gorshkova, T.A., Yablokova, E.V., Rumyantseva, N.I., Valieva, A., Ulanov, A. and Widholm, J.M. (1999) Cold alkali can extract phenolic acids that are ether linked to cell wall components in dicotyledonous plants (buckwheat, soybean and flax). *Phytochemistry*, **50** (3): 395-400.
- Mabeau, S.; Kloareg, B. & Joseleau, J.P. (1990) Fractionation and analysis of fucans from brown algae. *Phytochemistry*, **29** (8): 2441-2445.
- Madronich, S.; McKenzie, R. L.; Bjorn, L. O. & Caldwell, M. M. 1998. Changes in biologically active ultraviolet radiation reaching the Earth's surface. *J. Photochem. Photobiol. B*, **46** (1-3): 5-19.
- Marais, M.F. & Joseleau, J.P. (2001) A fucoidan fraction from *Ascophyllum nodosom*. *Carbohydrate Research*, **336**: 155-159.
- Mariani, P.; Tolomio, C.; Baldan B. & Braghetta, P. (1990) Cell wall ultrastructure and cation localization in some benthic marine algae. *Phycologia*, **29** (2): 253-262.
- Marijnissen, W.J.C.M.; van Osch, G.J.V.M.; Aigner, J.; van Der Veen, S.W.; Hollander, A.P.; Verwoerd-Verhoef, H.L. & Verhaar, J.A.N. (2002). Alginate as a chondrocyte-delivery substance in combination with a non-woven scaffold for cartilage tissue engineering. *Biomaterials*, **23** (6): 1511-1517.
- Marshall, R.A.; Hamilton, J.T.G.; Dring, M.J. & Harper, D.B. (2003) Do vesicle cells of the red alga *Asparagopsis* (Falkenbergia stage) play a role in bromocarbon production? *Chemosphere*, **52**: 471–475.

- McDoughall, G. (1993) Accumulation of wall-associated peroxidases during wound-induced suberization of flax. *J. Plant Physiol.* **142** (6): 651-656.
- McManus, J.P.; Davis, K.; Beart, J.E.; Gaffney, S.H.; Lilley, T.H. & Haslam, E. (1985) Polyphenol interactions: Part I. Introduction. Some observation on the reversible complexation of polyphenols with proteins and polysaccharides. *J. Chem. Soc., Perkin Transactions 2* (9): 1429-1438.
- Medcalf, D.G.; Schneider T.L. & Barnett R.W. (1978) Structural features of a novel glucuronogalactofucan from *Ascophyllum nodosum*. *Carbohydrate Research*, **66**: 167-171.
- Moen, E.; Horn, S. & Østgaard, K. (1997a) Biological degradation of *Ascophyllum nodosum*. *J. Appl. Phycol.*, **9** (4): 347-357.
- Moen, E.; Larsen, B. & Østgaard, K. (1997b) Aerobic microbial degradation of alginate in *Laminaria hyperborea* stipes containing different levels of polyphenols. *J. Appl. Phycol.*, **9** (1): 45-54.
- Nassar, C.A.G.; L.T. Salgado; Y. Yoneshigue-Valentin & G.M. Amado Filho (2003) The effect of iron-ore particles on the metal content of the brown algae *Padina gymnospora* (Espírito Santo Bay-Brazil). *Environmental Pollution*, **123**: 301-305.
- Ning, S.B.; Guo, H.L.; Wang, L. & Song, Y.C. (2002) Salt stress induces programmed cell death in prokaryotic organism *Anabaena*. *Journal of Applied Microbiology*, **93**: 15–28.
- Nylund, G.M.; Cervin, G.; Hermansson, M. & Pavia, H. (2005) Chemical inhibition of bacterial colonization by the red alga *Bonnemaisonia hamifera*. *Marine Ecology-Progress Series*, **302**: 27-36.
- Orive, G.; Ponce, S.; Hernandez, R.M.; Gascon, A.R.; Igartua, M. and Pedraz, J.L. (2002). Biocompatibility of microcapsules for cell immobilization elaborated with different type of alginates. *Biomaterials*, **23** (18): 3825-3831.
- Orth, R.J. & Van Montfrans, J. (1984) Epiphyte-seagrass relationships with an emphasis on the role of micrograzing: a review. *Aq. Bot.*, **18**: 43-69.
- Oudgenoeg, G.; Dirksen, E.; Ingeman, S.; Hilhorst, R.; Gruppen, H.; Boeriu, C.G.; Persma, S. R.; van Berkel, W.J.H.; Laane, C. & Voragen, A.G.J. (2002) Horseradish peroxidase-catalyzed

- oligomerization of ferulic acid on a template of a tyrosine-containing tripeptide. *J. Biol. Chem.* **277** (24): 21332-22134.
- Pamatmat, M.M. (1988) *Arch. Hydrobiol. Beih.*, **31**: 107.
- Parr, A.J., Waldron, K.W., Ng, A. and Parker, M.L. (1996) The wall-bound phenolics of chinese waterchestnut (*Eleocharis dulcis*). *J. Sci. Food Agr.* **71**(4): 501–507.
- Patankar, M.S.; Oehninger, G.; Barnett, T.; Williams, R.L. & Clark, G.F. (1993) A revised structure for fucoidan may explain some of its biological activities. *The Journal of Biological Chemistry*, **268** (29): 21770-21776.
- Paul, N.A.; Cole, L.; de Nys, R. & Steinberg, P.D. (2006a) Ultrastructure of the gland cells of the red alga *Asparagopsis armata* (Bonnemaisoniaceae). *J. Phycol.*, **42**: 637–645.
- Paul, N.A.; de Nys, R. & Steinberg, P.D. (2006b) Chemical defence against bacteria in the red alga *Asparagopsis armata*: linking structure with function. *Marine Ecology Progress Series*, **306**: 87–101.
- Paul, V.J.; Cruz-Rivera, E. & Thacker, R.W. (2001) Chemical mediation of macroalgal-herbivore interactions: ecological and evolutionary perspectives. In: McClintock, J.M. & Baker, B.J. (Eds.) *Marine Chemical Ecology*. CRC Press, pp. 227-65.
- Paul, V.J.; Puglisi, M.P. & Ritson-Williams, R. (2006c). Marine chemical ecology. *Nat. Prod. Rep.*, **23**:153-80.
- Pavez, J.; Silva, J.F. & Melo, F. (2005) Effects of alginic acid from marine algae on calcium carbonate electrodeposited coating. *Journal of Crystal Growth*, **282**: 438-447.
- Percival, E. (1979) The polysaccharides of green, red and brown seaweeds: their basic structure, biosynthesis and function. *British Phycology Journal*, **14**: 103-117.
- Pereira, R.C. 2004. A química defensiva como potencial invasor de espécies marinhas. In: Silva, J.S.V. & Souza, R.C.C.L.. (Eds.) *Água de Lastro e Bioinvasão*. Ed. Interciência, Rio de Janeiro, pp. 173-189.
- Pereira, R.C.; da Gama, B.A.P.; Teixeira, V.L. & Yoneshigue-Valentin, Y. (2003) Ecological roles of natural products from the Brazilian red seaweed *Laurencia obtusa*. *Braz. J. Biol.*, **63**: 665-672.

- Phillips, D.W. & Towers, G.H.N. (1982) Chemical ecology of red algal bromophenols. 1. Temporal, interpopulational and within-thallus measurements of lanosol levels in *Rhodomela larix* (Turner) C. Agardh. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **58**: 285-293.
- Ragan, M.A.; Glombitza, K.W. (1986) Phlorotannins, brown algal polyphenols. *Progress in Phycological Research*, **4**: 129-241.
- Ranocha, P.; Chabannes, M.; Chamayou, S.; Danoun, S.; Jauneau, A.; Boudet, A.M. & Goffner, D. (2002) Laccase down-regulation causes alterations in phenolic metabolism and cell wall structure in poplar. *Plant Physiol.* **129** (1): 145-155.
- Raven, P.H.; Evert, R.F. & Eichhorn, S.E. (2007). *Biologia Vegetal*, 7ª edição, Ed. Guanabara Koogan, pp. 856.
- Reviere, B. (1989) Fucans and alginates without phenolic compounds. *Journal of Applied Phycology*, **1**: 75-76.
- Rocha, G.M.; Brandão, B.A.; Mortara, R.A.; Attias, M.; de Souza, W. & Carvalho TM. (2006) The flagellar attachment zone of *Trypanosoma cruzi* epimastigote forms. *J Struct Biol.*, **154** (1): 89-99. Epub 2005 Dec 22.
- Rudall, P.J. & Caddick, L.R. (1994) Investigation of the presence of phenolic compounds in monocotyledonous cell walls, using UV fluorescence microscopy. *Ann. Bot.-London*, **74** (5): 483-491.
- Rush, C.; Willetts, A.; Davies, G.; Dauter, Z.; Watson, H. & Littlechild, J. (1995) Purification, crystallization and preliminary-X-RAY analysis of the vanadium-dependent haloperoxidase from *Corallina officinalis*. *FEBS Lett.* **359** (2-3): 244-246.
- Ruthardt, N; Gulde, N.; Spiegel, H.; Fischer, R. & Emans, N. (2005) Four-dimensional imaging of transvacuolar strand dynamics in tobacco BY-2 cells. *Protoplasma*, **225**: 205–215.
- Schmitt, T.M.; Hay, M.E. & Lindquist, N. (1995) Constraints on chemically mediated coevolution: multiple functions for seaweed secondary metabolites. *Ecology*, **76**:107-123.
- Schnitzer, M.J. & Block, S.M. (1997) Kinesin hydrolyses one ATP per 8-nm step. *Nature*, **388**: 386-390.

- Schoenwaelder, M.A.E. (2002) The occurrence and cellular significance of physodes in brown algae. *Phycologia*, **41** (2): 125-139.
- Schoenwaelder, M.E.A. and Clayton, M.N. (1998) Secretion of phenolic substances into the zygote wall and cell plate in embryos of *Hormosira* and *Acrocarpia* (Fucales, Phaeophyceae). *J. Phycol.* **34** (6): 969-980.
- Schott, D.H.; Collins, R.N. & Bretscher, A. (2002) Secretory vesicle transport velocity in living cells depends on the myosin-V lever arm length. *The Journal of Cell Biology*, **156** (1): 35–39.
- Segovia, M.; Haramaty, L.; Berges, J.A. & Falkowski, P.G. (2003) Cell death in the unicellular chlorophyte *Dunaliella tertiolecta*. A hypothesis on the evolution of apoptosis in higher plants and metazoans. *Plant physiology*, **132** (1): 99-105.
- Shanmugam, M. and Mody, K.H. (2000) Heparinoid-active sulphated polysaccharides from marine algae as potential blood anticoagulant agents. *Current Science*, **79** (12): 1672-1683.
- Shaw, R.M.; Fay, A.J.; Puthenveedu, M.A.; Zastrow, M.; Jan, Y. & Jan, L.Y. (2007) Microtubule plus-end-tracking proteins target gap junctions directly from the cell interior to adherens junctions. *Cell*, **128**: 547–560.
- Shimonishi, M.; Kuwamoto, S.; Inoue, H.; Wever, R.; Ohshiro, T.; Izumi, Y. & Tanabe, T. (1998) Cloning and expression of the gene for a vanadium-dependent bromoperoxidase from a marine macro-alga *Corallina pilulifera*. *FEBS Lett.* **428** (1-2): 105-110.
- Shoenwaelder, M. & Clayton, M. (2000) Physode formation in embryos of *Phyllospora comosa* and *Hormosira banksii* (Phaeophyceae). *Phycologia*, **39** (1): 1-9.
- Sieburth, J.M. & Conover, J.T. (1965) *Sargassum* tannin an antibiotic which retards fouling. *Nature*, **208**: 52.
- Silverberg, B.A. (1975). Ultrastructural localization of lead in *Stigeoclonium tenue* (Chlorophyceae, Ulotrichales) as demonstrated by cytochemical and X-Ray microanalysis. *Phycologia*, **14**: 265-274.
- Steinberg, P.D. & De Nys, R. (2002). Chemical mediation of colonization of seaweed surfaces. *J. Phycol.*, **38**: 621-629.

- Stengel, D.B. & Dring, M.J. (2000). Copper and iron concentrations in *Ascophyllum nodosum* (Fucales, Phaeophyta) from different sites in Ireland and after culture experiments in relation to thallus age and epiphytism. *J. of Experimental Marine Biology and Ecology.*, **246** (2): 145-161.
- Sudatti, D.B.; Rodrigues, S.V.; Coutinho, R.; da Gama, B.A.P.; Salgado, L.T.; Amado Filho, G.M. & Pereira, R.C. Transport and defensive action by chemicals on the surface of the red seaweed *Laurencia obtusa*. *Journal of Phycology*, (no prelo).
- Sundstrom, J.; Collin, J; Abrahamsson, K & Pedersen, M. (1996) Halocarbon production *in vivo* brominating activity of *Eucheuma denticulatum*. *Phytochemistry*, **42** (6): 1527-1530.
- Tam, S.K., Dusseault, J., Polizu, S., Ménard, M., Hallé, J.P., & Yahia, L. (2006) Impact of residual contamination on the biofunctional properties of purified alginates used for cell encapsulation. *Biomaterials*, **27** (8): 1296-1305.
- Tamagnone, L.; Merida, A.; Stacey, N.; Plaskitt, K.; Parr, A.; Chang, C.; Lynn, D.; Dow, J.; Roberts, K. & Martin, C. (1998) Inhibition of phenolic acid metabolism results in precocious cell death and altered cell morphology in leaves of transgenic *Tobacco* plants. *The Plant Cell*, **10**: 1801-1816.
- Teixeira, V.L. (2002) Produtos naturais marinhos. *In*: Pereira, R.C. & Soares-Gomes, A. (orgs) *Biologia Marinha*. Editora Interciência, Rio de Janeiro. pp.249-279.
- Theiler, R., Cook, J. C., Hager, L. E & Siuda, J.F. (1978) *Science*, **202**: 1094.
- Tretyn, A.; Grolig, F.; Magdowshi, G.; Wagner, G. (1996) Selective binding of Ca<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup> and K<sup>+</sup> by the physodes of the green alga *Mougeotia scalaris*. *Folia Histochemica et Cytobiologica*, **34** (2): 103-108.
- Tringali, C. & Piattelli, M. (1982) Two chromone derivatives from the brown alga *Zonaria tournefortii*. *Tetrahedron Lett.* **23**(14): 1509-1512.
- Vallim, M.A.; De Paula, J.C.; Pereira, R.C. & Teixeira, V. L. (2005) The diterpenes from Dictyotacean marine brown algae in the Tropical Atlantic American region. *Biochem. Syst. Ecol.*, **33**: 1-16.

- Viana, N.B.; Rocha, M.S.; Mesquita, O.N.; Mazolli, A.; Maia Neto, P.A. & Nussenzveig, H.M. (2006) Characterization of objective transmittance for optical tweezers. *Appl. Optics*, **45** (18): 4263-4269.
- Viana, N.B.; Rocha, M.S.; Mesquita, O.N.; Mazolli, A.; Maia Neto, P.A. & Nussenzveig, H.M. (2007) Towards absolute calibration of optical tweezers. *Phys. Rev. E*, **75** (2): Art. No. 021914 Part 1.
- Vreeland V.; Weite, J.H.; & Epstein, L. (1998a) Polyphenols and oxidases in substratum adhesion by marine algae and mussels. *J. Phycol.* **34** (1): 1-8.
- Vreeland, V. & Laetsch, W.M. (1988) Role of alginate self-associating subunits in the assembly of *Fucus* embryo cell walls. In: Self-assembling architecture (Ed. By J.E. Varner), pp. 77-96. Alan R. Liss, New York.
- Vreeland, V.; Ng, K.L. & Epstein, L. (1998b) cDNA sequence and active recombinant vanadium bromoperoxidase from *Fucus* embryos. *Mol. Biol. Cell.*, **9**: 180A-180A 1043 Suppl. S.
- Waldron, K.W.; Ng, A.; Parker, M.L. and Parr, A.J. (1997) Ferulic acid dehydrodimers in the cell walls of *Beta vulgaris* and their possible role in texture. *J. Sci. Food Agr.*, **74** (2): 221–228.
- Wallace, G. & Fry, S.C. (1994) Phenolic components of the plant cell wall. *Int. Rev. Cytol.*, **151**: 229-267.
- Wallace, G. & Fry, S.C. (1995) *In vitro* peroxidase catalyzed oxidation of ferulic acid-esters. *Phytochemistry*, **39** (6): 1293-1299.
- Weyand, M.; Hecht, H.J.; Kiess, M.; Liaud, M.F.; Vilter, H. & Schomburg, D. (1999) X-ray structure determination of a vanadium dependent haloperoxidase from *Ascophyllum nodosum* at 2.0 Å resolution. *J. Mol. Biol.*, **293**(3): 595-611.
- Willemsen, P.R. (1994) The screening of sponge extracts for antifouling activity using a bioassay with laboratory-reared cyprid larvae of the barnacle *Balanus amphitrite*. *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, **34**: 361–373.
- Wolk, C.P. (1968) Role of bromine in formation of refractile inclusions of vesicle cells of Bonnemaisoniaceae (Rhodophyta). *Planta*, **78** (4): 371-378.

- Xua, F.; Sunb, R.; Suna, J.; Liu, C.; Heb, B. & Fan, J. (2005) Determination of cell wall ferulic and p-coumaric acids in sugarcane bagasse. *Anal. Chim. Acta*, **552**(1-2): 207–217.
- Young, D.N. & West, J.A. (1980) Fine structure and histochemistry of vesicle cells of the red alga *Antithamnion defectum* (Ceramiaceae). *Journal of Phycology*, **15**: 49-57.
- Young, S.J.; Royer, S.M.; Groves, P.M. & Kinnamon, J.C. (1987) 3-Dimensional reconstructions from serial micrographs using IBM PC. *Journal of Electron Microscopy Technique*, **6** (2): 207-217.
- Yuan, Y.V. & Walsh, N.A. (2006) Antioxidant and antiproliferative activities of extracts from a variety of edible seaweeds, *Food and Chemical Toxicology*, **44** (7): 1144-1150.

## PRODUÇÃO CIENTÍFICA

## 20. ARTIGOS PUBLICADOS E MANUSCRITOS RELACIONADOS À TESE

1. Transport and defensive role of natural products at surface of the red seaweed *Laurencia obtusa*. Sudatti, D.B.; Rodrigues, S.V.; Coutinho, R.; da Gama, B.A.P.; **Salgado, L.T.**; Amado-Filho, G.M. & Pereira, R.C. (aceito-*Journal of Phycology*)
2. The influence of brown algae alginates on phenolic compounds capability of UV absorption in vitro. **Salgado, L.T.**; Tomazetto, R.; Cinelli, L.P.; Farina, M. & Amado Filho, G.M. (2007) *Brazilian Journal of Oceanography*, 55 (2).
3. Localization of specific monosaccharides in cells of the brown alga *Padina gymnospora* and the relation to the heavy metal accumulation. **Salgado, L.T.**; Andrade, L.R.; & Amado Filho, G.M. (2005) *Protoplasma*, 225: 123–128.
4. The formation of high-molecular-weight complexes between phenolic compounds and alginates from marine brown algae is catalyzed by vanadium bromoperoxidases. **Salgado, L.T.**; Cinelli, L.P.; Viana, N.B.; Tomazetto, R.; Mourão, P.A.S.; Teixeira VL; Farina, M. & Amado Filho, G.M. (submetido)
5. Cellular storage, transport and exudation of halogenated compounds in red alga *Laurencia obtusa*. **Salgado L.T.**; Leal, R.N.; Viana, N.B.; da Gama, B.A.P.; Attias, M.; Farina, M.; Pereira, R.C. & Amado Filho, G.M. (submetido)
6. The influence of phenolic compounds, fucans and alginates from brown alga *Padina gymnospora* on calcium carbonate mineralization. **Salgado, L.T.**; Amado Filho, G.M. & Farina, M. (em preparação)

# 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](#)