

Efeito caotrópico do íon lítio na permeabilidade da cápsula polissacarídica da microalga *Ankistrodesmus gracilis* (Reinsch) Korsikov (Chlorophyceae)

Cristina Souza Freire Nordi^{1,3}, Thays Gabrielle Wenzel Ferreira Cavagliere¹,
Armando Augusto Henriques Vieira² e Otaciro Rangel Nascimento¹

Recebido em 11/02/2005. Aceito em 14/10/2005

RESUMO – (Efeito caotrópico do íon lítio na permeabilidade da cápsula polissacarídica da microalga *Ankistrodesmus gracilis* (Reinsch) Korsikov (Chlorophyceae)). O objetivo deste trabalho foi investigar o efeito caotrópico do íon Li^+ na cápsula polissacarídica da microalga colonial *Ankistrodesmus gracilis*. Esta microalga possui uma cápsula extensa e contínua que envolve completamente as células. Neste estudo, foram utilizados a técnica de Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE) e o marcador de spin - Tempo (2,2,6,6-tetrametilpiperidine-1-oxil), de natureza não reativa. A técnica de RPE é utilizada para monitorar o tempo de difusão dos marcadores de spin através da cápsula polissacarídica, parede e membrana celular, até o interior da célula, onde eles perdem suas propriedades paramagnéticas. O íon Li^+ utilizado tem a propriedade de provocar a desorganização estrutural da cápsula e, em consequência, a modificação do tempo de difusão do marcador de spin. Observou-se que os tempos de decaimento do sinal paramagnético nas células tratadas com Li^+ são sempre menores do que nas células não expostas ao Li^+ e que os tempos de difusão diminuem com o aumento da concentração de LiCl . As fotomicrografias das algas mostram que a partir da concentração de LiCl 1,0 M, as cápsulas são totalmente retiradas, resultando em células que se aglutinam formando grumos. Também foi constatada a morte das células acima quando expostas a concentração de LiCl acima de 1,0 M.

Palavras-chave : cápsula polissacarídica, *Ankistrodesmus gracilis*, LiCl , marcador de spin e tempo de permeação

ABSTRACT – (Chaotropic effect of lithium ion on permeability of polysaccharide capsule of the microalga *Ankistrodesmus gracilis* (Reinsch) Korsikov (Chlorophyceae)). The aim of this study was to investigate the role of chaotropic effect of Li^+ on the polysaccharide sheath of the microalga *Ankistrodesmus gracilis* (Chlorophyceae, Chlorococcales) in the selective permeability and transport of molecules in the interior of the cell. The colonial microalga *Ankistrodesmus gracilis* has a relatively large and continuous mucilaginous sheath. The Electron Paramagnetic Resonance (EPR) was applied using the spin label- Tempo 2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl of non-reactive nature to study its diffusion coefficients across the polysaccharide envelope. The EPR technique is used to monitor the spin labels diffusion time across the polysaccharide capsule, cell wall and membrane into the interior of the cell, where they lose their paramagnetic properties. The lithium ion (Li^+) has the property to structurally disorganize the polysaccharide capsule and the spin label diffusion changes producing different spin label time decay. The time decays of cells subjected to Li^+ treatment are faster than the cells without this ion usage and the decay time decreases with increasing Li^+ concentration. The photomicrographies show the complete removal of the cell capsule from LiCl 1,0 M upward and as a result, the algal cells agglutinate producing cell clumps, and the algal cells are clearly died.

Key words: polysaccharide capsule, *Ankistrodesmus gracilis*, LiCl , spin label and permeation

Introdução

Algumas espécies de microalgas podem acumular polissacarídeos extracelulares como uma massa gelatinosa envolvendo as células, chamadas de envelope, bainha ou cápsula. Estas estruturas podem ser encontradas entre muitas clorofíceas, cianofíceas e rodofíceas. As cápsulas algáceas podem ser facilmente visualizadas com o uso de tinta Nankin e possuem uma diversidade de tipos, podendo ser

extensas e com estrutura bem definida ou relativamente estreitas e que se dissolvem continuamente no meio de cultura. Entretanto, os estudos sobre suas funções, propriedades e estrutura ainda são insipientes.

Como as cápsulas formam uma camada externa envolvendo completamente as células algáceas, essas estruturas devem ter um papel fundamental na interação entre as células e o meio ambiente (Lange 1976; Costerton *et al.* 1987; Kloareg & Quatrano 1988). Várias funções têm sido atribuídas a essas

¹ Universidade de São Paulo, Instituto de Física de São Carlos, Av. Trabalhador Sancarlene, 400, CEP 13560-270, São Carlos, SP, Brasil

² Universidade Federal de São Carlos, Departamento de Botânica, C. Postal 676, CEP 13560-970, São Carlos, SP, Brasil

³ Autor para correspondência: crisnordi@ifsc.usp.br

estruturas, tais como: proteção das células contra predação pelo zooplâncton (Porter 1977), dessecação ou epifitismo (Round 1973; Sheperd & Beilby 1999); auxílio na reprodução sexual mantendo as células reprodutivas juntas e protegendo os gametas (Boney 1981), complexação de metais tóxicos e com isso proteção da célula contra a ação desses metais (Vieira & Nascimento 1988; Lombardi *et al.* 2002) e redução da taxa de afundamento das células ou aumento da sua capacidade de flutuar na água (Boney 1981).

Uma outra função possível das cápsulas seria a de agir como barreira seletiva no transporte de moléculas até o interior da célula. Com o objetivo de estudar essa função, dois estudos utilizando microalgas, *Spondylosium panduriforme* e *Nephrocytium lunatum*, foram realizados (Freire-Nordi *et al.* 1998; 2003). Uma técnica inovadora foi aplicada, a Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE) e diferentes marcadores de spin foram utilizados como sondas. A técnica de RPE permite medir o tempo de decaimento dos marcadores de spin (paramagnéticos), enquanto se difundem através da cápsula, parede e membrana celular, até atingir o interior da célula, onde eles são metabolizados e transformados em moléculas diamagnéticas, ou seja, deixam de ser paramagnéticas. Os resultados obtidos com *Spondylosium panduriforme* e *Nephrocytium lunatum* mostraram que a cápsula é capaz de fazer diferenciação de tempo de trânsito entre os diferentes marcadores de spin utilizados e, portanto, exerce um papel seletivo como resultado de interações polares com os marcadores de spin. A técnica de RPE e os marcadores de spin revelaram-se ferramentas muito boas no estudo de permeação de pequenas moléculas através das cápsulas algáceas, pelo fato de não produzirem alterações nas células e serem prontamente convertidos à forma diamagnética dentro das células.

O cloreto de lítio (LiCl) é um agente caotrópico, que tem a propriedade de retirar solubilizando macromoléculas como polissacarídeos e proteínas da parede celular (Voigt 1985). Outra aplicação mais recente do uso deste íon é a de fragmentar polissacarídeos extracelulares ou da parede celular, auxiliando nas investigações estruturais desses polímeros (Petrus *et al.* 1995; Flores *et al.* 2000; Fransen *et al.* 2000; Gloaguen *et al.* 1999; 2004). É sabido da química do Li⁺ que é um íon de pequeno raio iônico e que requer um número relativamente grande de moléculas de água no processo de solvatação; entretanto, não é muito clara sua ação como elemento desorganizador da estrutura de polissacarídeos.

A utilização da técnica de RPE, associada ao uso de marcadores de spin no estudo da permeação de moléculas pequenas através das cápsulas algáceas, já consiste em uma metodologia bem desenvolvida e está bem descrita (Freire-Nordi *et al.* 1998; 2003). Neste estudo, a metodologia dos marcadores de spin é utilizada para investigar o efeito caotrópico do íon Li⁺ como agente desorganizador da estrutura capsular, produzindo mudança no tempo de difusão do marcador de spin através da célula tratada. A microalga *Ankistrodesmus gracilis* foi utilizada porque possui uma cápsula polissacarídica grande, envolvendo as células. O marcador de spin Tempo foi usado por ser estruturalmente o mais hidrofóbico e de estrutura molecular mais simples.

Material e métodos

Condições de cultivo das algas – A microalga *Ankistrodesmus gracilis* (Reinsch) Korsikov (Chlorococcales) foi coletada na represa de Barra Bonita, Estado de São Paulo, Brasil, e vem sendo mantida isolada no banco de culturas do laboratório de Ficologia da Universidade Federal de São Carlos. Os cultivos foram do tipo “batch” em meio WC (Guillard & Lorenzen 1972), em frascos de 4 L, com aeração constante. As culturas experimentais eram unialgáceas e não axênicas. Antes das inoculações, o inóculo algáceo foi centrifugado várias vezes com meio fresco, com o objetivo de diminuir a contaminação por bactérias. As algas cresceram sob condições controladas de temperatura (23 ± 1 °C); irradiância (174 ± 40 $\mu\text{fotons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) e fotoperíodo de 12 horas.

O tempo de duração das culturas foi de 30 dias, período para que as células algáceas atingissem a fase estacionária. O meio de cultura foi separado e as células algáceas centrifugadas por 10 minutos a 3000 rpm em centrífuga Exelsa Baby II (FANEM). As células foram novamente centrifugadas em outra centrífuga do tipo Eppendorf modelo Spin I (Incibras), para remover o restante do meio de cultura.

Experimentos com LiCl– Da suspensão concentrada de células algáceas, foram retiradas 100 μL aos quais foram adicionados 40 μL de LiCl com diferentes concentrações (0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,6; 1,0; 1,5 e 2,0 M). O tempo de exposição ao LiCl foi de cinco minutos. Após esse tempo, as células foram centrifugadas por um minuto na centrífuga do tipo Eppendorf, o sobrenadante foi descartado e o marcador de spin

acrescentado (5 μL à concentração de 125 mM). Desta suspensão, foram retirados 40 μL em capilares tipo hematócrito, selados a fogo em uma de suas extremidades, para a realização posterior das medidas com EPR.

Medidas de RPE – O marcador de spin utilizado foi o 2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-oxil (Tempo). Os espectros de RPE foram obtidos em espectrômetro Varian E-109 em banda X, equipado com uma cavidade retangular (E-248), ligado a um microcomputador PC. A intensidade do decaimento do sinal do marcador de spin foi monitorada em função do tempo

As cinéticas de redução do sinal paramagnético foram geralmente completadas em 20 minutos para as concentrações mais baixas de LiCl, e entre 5 a 10 minutos para as concentrações mais altas. As curvas de cinética do marcador de spin foram ajustadas por exponenciais e as constantes de tempo foram assim obtidas para cada concentração de LiCl. Foram realizadas pelo menos cinco medidas para cada concentração de LiCl utilizada, tendo sido consideradas as três mais próximas para efeito de cálculos.

O efeito do tratamento das células submetidas a diferentes concentrações de LiCl também foi observado ao microscópio óptico Olympus BHS-2 equipado com uma câmara colorida Optronics CCD. As imagens foram analisadas pelo software Image-Pro Plus 4.0 (Media Cybernetics) e tratadas segundo Massana *et al.* (1997). Também foram realizadas medidas do tamanho das células e das cápsulas.

Resultados e discussão

Na Fig. 1 observa-se que o decaimento das curvas tratadas com LiCl é mais rápido, quando comparado com a curva sem o tratamento com lítio. Este efeito é mais pronunciado a partir da concentração de 0,6 M, quando decaimento é claramente mais rápido.

Duas retas ajustadas mostram dois comportamentos distintos das células sob a ação do LiCl: nas concentrações de 0,0 a 0,6 M, os tempos de decaimento decrescem linearmente; nas concentrações de 0,6 a 2,0 M os tempos tornam-se aproximadamente constantes e, nessas condições, o tempo de decaimento medido é suficiente para a ocorrência da morte celular, causado pela entrada do LiCl na célula. A Fig. 1 permite deduzir que a concentração letal de LiCl, para a célula está em torno da 0,6 M. A Tab. 1 apresenta também os tempos de decaimento médios para o marcador de spin Tempo e seus respectivos desvios padrão.

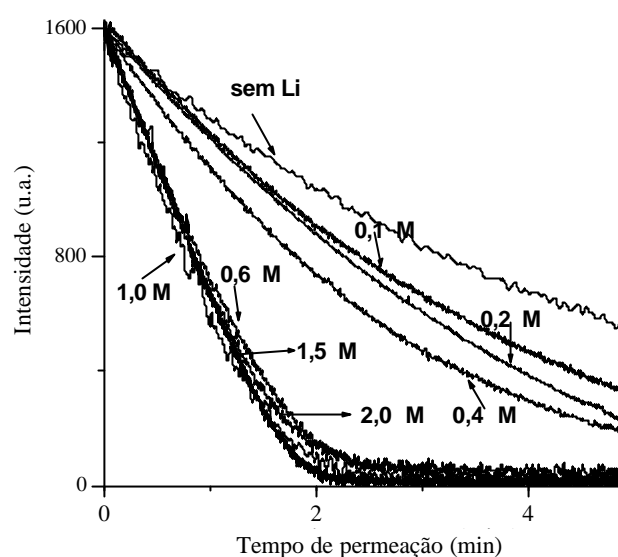


Figura 1. Curvas de decaimento do sinal do marcador de spin - Tempo obtidas com a microalga *Ankistrodesmus gracilis* (Reinsch) Korsikov, para cada uma das concentrações de LiCl testadas (0,0 a 2,0 M).

A Fig. 2A mostra uma colônia em processo de divisão celular e sem tratamento com LiCl, com a cápsula, que é grande e contínua, envolvendo completamente as células com um contorno regular. As células possuem formato lunar e suas dimensões são: largura - 4,50 μm e comprimento - 23,80 μm . A espessura da cápsula é de 9,40 μm . Na Fig. 2B, as células foram submetidas ao LiCl 0,5 M e constata-se que o contorno da cápsula torna-se mais irregular. Observa-se, também, que a cor esverdeada das células fica menos intensa. A exposição à solução de LiCl 1,0 M provocou a perda da cápsula na maioria das células algáceas (Fig. 2C). Ao final das medidas de RPE (aproximadamente um minuto), as células estavam

Tabela 1. Tempos médios de permeação do marcador-Tempo obtidos com a exposição da microalga *Ankistrodesmus gracilis* (Reinsch) Korsikov a diferentes concentrações de LiCl.

Concentração de LiCl (Molaridade)	Tempo de permeação do marcador de spin (min)
0,0	5,58 (0,4)
0,1	4,92 (0,5)
0,2	4,38 (0,1)
0,3	2,86 (0,3)
0,4	2,23 (0,3)
0,6	0,93 (0,1)
1,0	1,08 (0,3)
1,5	0,93 (0,1)
2,0	1,00 (0,2)

mortas, fato constatado pela mudança da coloração esverdeada para amarelada. Outro efeito observado é a aglutinação das células. Na Fig. 2D, as células foram submetidas à solução de LiCl 2.0 M, observando-se também a ausência das cápsulas e a aglutinação das células, formando extensos grumos.

Os resultados demonstram que a exposição das células a concentrações crescentes de LiCl, provoca um desarranjo da estrutura polissacarídica das cápsulas, com conseqüente diminuição do tempo de trânsito do marcador de spin. Nas concentrações mais altas (a partir de 0,6 M), nas quais a maioria das células algáceas encontra-se sem cápsula, provavelmente o LiCl começou a agir sobre a parede celular e/ou membrana plasmática, penetrando na célula e causando

sua morte. O mecanismo de ação do LiCl no interior da célula ainda não está completamente estabelecido, mas sabe-se que é capaz de inibir múltiplas enzimas (Phiel & Klein 2001).

O tratamento com LiCl altera a estrutura polissacarídica das cápsulas, tendo como conseqüência a mudança da permeabilidade das cápsulas às sondas de ressonância. Os resultados comprovam a importância da cápsula como barreira a moléculas que permeiam através delas, desde que a alteração e/ou retirada da cápsula implica em aumento da vulnerabilidade das células algáceas.

Outro fato interessante observado é a aglutinação das células que acontece com a retirada parcial ou total do material capsular. Giroldo *et al.* (2003)

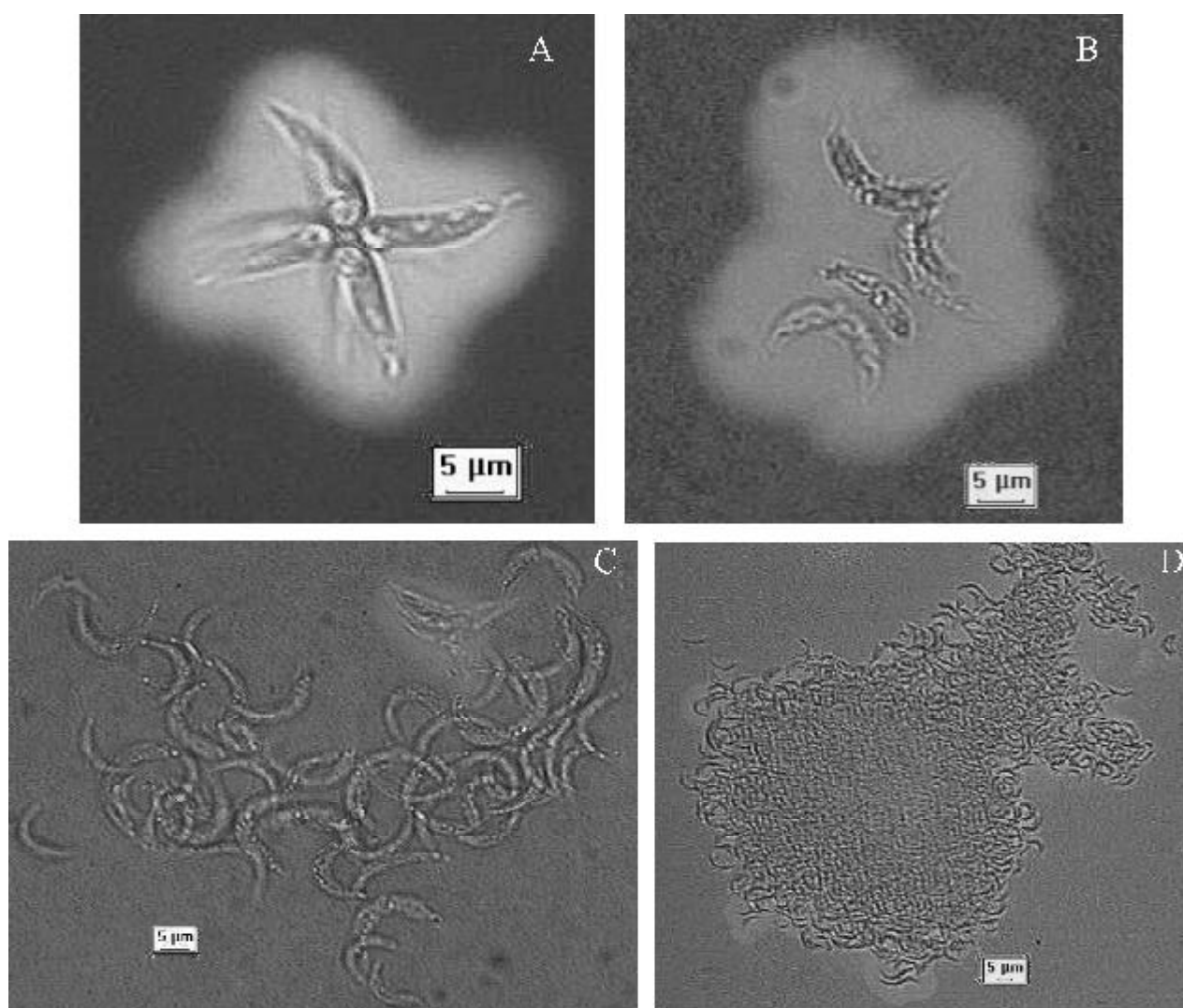


Figura 2. Fotomicrografias da microalga *Ankistrodesmus gracilis* (Reinsch) Korsikov, mostrando as alterações sofridas nas cápsulas devido à exposição às diferentes concentrações de LiCl: A. Sem LiCl. B. Tratamento com LiCl - 0,5 M. C. Tratamento com LiCl - 1,0 M. D. Tratamento com LiCl - 2,0 M. Fotomicrografias A-C obtidas com aumento de 400x; D com aumento de 100x.

estudaram a degradação microbiana do polissacarídeo extracelular liberado pela diatomácea *Thalassiosira* sp. Seus resultados indicaram que a degradação é seletiva e promove o aumento dos desoxi açúcares (fucose e ramnose), que conferem um caráter mais hidrofóbico ao polissacarídeo extracelular. O caráter mais hidrofóbico pode contribuir para a formação de agregados deste material extracelular. Efeito semelhante pode ter ocorrido com o LiCl ao desintegrar o polissacarídeo capsular, expondo também os açúcares mais hidrofóbicos, os quais podem ter favorecido a aglutinação das células algáceas. Portanto, os resultados parecem indicar outra função importante do envoltório capsular, qual seja, o de manter as colônias individualizadas, impedindo com isso a formação de extensos aglutinamentos entre as células.

Este estudo, em que o íon Li⁺ foi empregado na avaliação da permeabilidade de cápsulas algáceas usando a técnica de RPE, pode ser considerado uma nova aplicação desse íon, uma vez que os dados de literatura indicam sua utilização somente em estudos de natureza estrutural.

Agradecimentos

À FAPESP (processo 99/07766-0), pelo apoio financeiro concedido.

Referências bibliográficas

- Boney, A.D. 1981. Mucilage: the ubiquitous algal attribute. **British Phycological Journal** **16**: 115-132.
- Costerton, J.W.; Cheng, K.J.; Geesey, G.G.; Ladd, T.I.; Nichel, J.C.; Dasgupta, T.A.M. & Marrie, T.J. 1987. Bacterial biofilms: nature and disease. **Annual Review of Microbiology** **41**: 435-464.
- Flores M.L.; Stortz, C.A. & Cerezo, A.S. 2000. Studies on the skeletal cell wall of the cystocarpic stage of the seaweed *Iridaea undulosa* B. part II Fractionation of the cell wall and methylation analyses of the inner core-fibrillar polysaccharides. **International Journal of Biological Macromolecules** **27**: 21-27.
- Fransen, C.T.M.; Haseley, S.R.; Huisman, M.M.H.; Schols, H.A.; Voragen, A.G.J.; Kamerling, J. & Vliegthart, J.F.G.P. 2000. Studies on the structure of lithium-treated soybean pectin: characteristics of the fragments and determination of the carbohydrate substituents of galacturonic acid. **Carbohydrates Research** **328**: 539-547.
- Freire-Nordi, C.S.; Vieira, A.A.H. & Nascimento, O.R. 1998. Selective permeability of the extracellular envelope of the microalga *Spondylosium panduriforme* (Chlorophyceae) as revealed by Electron Paramagnetic Resonance. **Journal of Phycology** **34**: 631-637.
- Freire-Nordi, C.S.; Vieira, A.A.H. & Nascimento, O.R. 2003. Transport of spin-labelled molecules through the capsules of *Nephrocytium lunatum* (Chlorococcales) studied by electron paramagnetic resonance. **Phycologia** **42**: 465-472.
- Giroldo D.; Vieira, A.A.H. & Paulsen, B.S. 2003 Relative increase of deoxy sugars during microbial degradation of an extracellular polysaccharide released by a tropical freshwater *Thalassiosira* sp. (Bacillariophyceae). **Journal of Phycology** **39**: 1109-1115.
- Gloaguen, V.; Morvan, H.; Hoffmann, L.; Plancke, Y.; Wieruszkeski, J.M.; Lippens, G. & Strecker, G. 1999 Capsular polysaccharide produced by the thermophilic cyanobacterium *Mastigocladus laminosus*. **European Journal of Biochemistry** **266**: 762-770
- Gloaguen V.; Ruiz, G.; Morvan, H.; Mouradi-Givernaud, A.; Maes, E.; Krausz, P. & Strecker, G. 2004. The extracellular polysaccharide of *Porphyridium* sp.: an NMR study of lithium-resistant oligosaccharidic fragments. **Carbohydrate Research** **339**: 97-103.
- Guillard, R.R.L. & Lorenzen, C.J. 1972. Yellow-green algae with chlorophyllid-c. **Journal of Phycology** **8**: 10-14.
- Kloareg, B. & Quatrano, R.S. 1988 Structure of the cells walls of the marine alga and ecophysiological functions of the matrix polysaccharides. **Oceanography and Marine Biology an Annual Review** **26**: 259-315.
- Lange, W. 1976. Speculations on a possible essential function of gelatinous sheath of blue-green algae. **Canadian Journal of Microbiology** **22**: 1181-1185.
- Lombardi, A.T.; Vieira, A.A.H. & Sartori, L.A. 2002. Mucilaginous capsule adsorption and uptake of copper by *Kirchineriella aperta* (Chlorococcales). **Journal of Phycology** **38**: 332-337.
- Massana, R.; Gasol, J.M.; Bjornsen, P.K., Blackburn, N.; Hagstrom, A.; Hietanen, S.; Hygum, B.H.; Kuparinen, J. & PedrosAlio, C. 1997. Measurement of bacterial size via image analysis of epifluorescence preparations: description of an inexpensive system and solutions to some of the most common problems. **Scientia Marina** **61**: 397-407.
- Petrus, P.; Gray, D.G. & Bemiller, J.N. 1995. Homogeneous alkylation of cellulose in lithium chloride/dimethyl sulfoxide solvent with dimethyl sodium activation. A proposal for the mechanism of cellulose dissolution in LiCl/Me₂SO. **Carbohydrate Research** **268**: 319-323.
- Phiel, C.J. & Klein, P.S. 2001. Molecular targets of lithium action. **Annual Review of Pharmacology Toxicology** **41**: 789-813.
- Porter, K.J. 1977. The plant-animal interface in freshwater ecosystems. **American Science** **65**: 159-170.
- Round, F.E. 1973. **Biologia das algas**. (Traduzido por E.P. Neto). Rio de Janeiro, Editora Guanabara.
- Sheperd, V.A. & Beilby, M.J. 1999. The effect of an extracellular mucilage on the response to osmotic shock in the chlorophyte *Lamprothamnium papulosum*. **Journal of Membrane Biology** **170**: 229-242.

Vieira, A.A.H. & Nascimento, O.R. 1988. An EPR determination of copper complexation by excreted high molecular weight compounds of *Ankistrodesmus densus* (Chlorophyceae). **Journal of Plankton Research** **10**: 1313-1315.

Voigt, J. 1985. Extration by lithium chloride of hydroxyproline-rich glycoproteins from intact cells of *Chlamydomonas reinhardtii*. **Planta** **164**: 379-389.