



**UNIVERSIDADE DO ALGARVE**

Faculdade de Engenharia de Recursos Naturais



**ESTUDOS SOBRE APROVEITAMENTO BIOTECNOLÓGICO**

**DA QUITINA**

**PRODUZIDA POR ORGANISMOS MARINHOS**

(Dissertação para obtenção de grau de mestre em Biotecnologia)

**Ricardo Manuel Rafael Afonso**

Faro

2008

**NOME:** Ricardo Manuel Rafael Afonso

**ORIENTADOR:** Professora Doutora Maria Leonor Quintais Cancela da Fonseca

**CO-ORIENTADOR:** Professor Doutor Francisco Miguel Portela da Gama

**DATA:** 31 de Outubro de 2008

**TÍTULO DA DISSERTAÇÃO:**

Estudos Sobre Aproveitamento Biotecnológico da Quitina Produzida Por Organismos Marinhos.

**JÚRI:**

**Presidente:** Professor Doutor Alfredo Jaime Morais Cravador

**Vogais:** Professora Doutora Maria Leonor Quintais Cancela Fonseca

Professora Doutora Maria de Lurdes dos Santos Cristiano

Professora Doutora Maria dos Anjos Lopez de Macedo

Para os meus pais e irmã

## AGRADECIMENTOS

Especiais agradecimentos à minha orientadora Professora Dr<sup>a</sup> Leonor Cancela, por me ter dado a oportunidade de trabalhar no seu laboratório, por todo o apoio prestado, assim como a sua enorme paciência, foram fundamentais para a realização deste trabalho; ao meu co-orientador Professor Dr. Francisco Miguel Gama por todo o apoio, esclarecimento e orientação numa área para mim completamente nova.

Quero agradecer o esforço e auxílio da Professora Dr<sup>a</sup> Ana Garcia, Professora Dr<sup>a</sup> Ana Gil, Dr. Hélio Martins e Doutorando Ricardo Leite, pois sem eles também este trabalho nunca se teria realizado.

Não me posso esquecer também de todos os amigos e colegas de laboratório pelo apoio e amizade nos bons e maus momentos.

Um agradecimento especial à “cerejinha” e aos meus pais, pelo amor, compreensão e apoio prestados.

# STUDIES ON THE BIOTECHNOLOGY POTENCIAL OF CHITIN PRODUCED

BY

MARINE ORGANISMS

## Abstract

The sea is considered one of the richest habitats, yet is one of the least well-characterized and because of its diversity, it offers enormous opportunities within biotechnology. Chitin is the most important natural polysaccharide after cellulose, found mainly in crustaceans and in the cell wall of fungi. The applications of chitin are enormous but being quite difficult to isolate in a pure form and in a reproducible way under good economic conditions, it is not widely used. In order to know if the marine parasite *Perkinsus olseni* was a good source of chitin, the propagation of *in vitro* culture of this parasite, previously isolated from clams (*Ruditapes decussates*) from Ria Formosa, was successfully optimized in DMEM:Ham's F-12 (1:2) medium and the scale-up was accomplished with a biomass production of 2.1 mg/L/h. Chitin, one of the polysaccharide components of the cell wall of *P. olseni*, was isolated by two different methods: (i) alkaline extraction under different conditions and (ii) solvent extraction with DMAC/LiCl 5%. The extracted material was initially characterized by FTIR, and two samples were chosen, one isolated by alkaline extraction and designated by qAlc, and the other extracted with the chitin solvent and designated by qDMAC. Further characterization of these two samples was accomplished by elemental analysis, protein and acetylglucosamine content, x-ray diffraction and solid state <sup>13</sup>C NMR. The results of the characterization are still inconclusive but suggest that we are in the presence of an amorphous β-chitin.

**Keywords:** Biotechnology, *Perkinsus olseni*, *in vitro* propagation, chitin

# ESTUDOS SOBRE APROVEITAMENTO BIOTECNOLÓGICO DA QUITINA PRODUZIDA POR ORGANISMOS MARINHOS

## Resumo

O oceano é um dos mais ricos habitats do planeta, mas também um dos menos explorados, embora a sua grande diversidade ofereça enormes potencialidades na área da biotecnologia. A quitina, o segundo polissacarídeo mais abundante a seguir à celulose, é encontrada principalmente no exosqueleto de crustáceos e parede celular de fungos. As suas aplicações biotecnológicas são vastas, mas devido à dificuldade da sua extracção de maneira reprodutível e sob condições económicas viáveis, o seu uso é limitado. Com o objectivo de verificar a potencialidade do parasita marinho *Perkinsus olseni* como fonte de quitina, a cultura *in vitro* deste parasita, previamente estabelecida a partir de amêijoas (*Ruditapes decussatus*) infectadas provenientes da Ria Formosa, foi otimizada com sucesso em meio DMEM:Ham's F-12 (1:2) e a sua propagação em maior escala foi conseguida com uma produção de biomassa de 2,1 mg/L/h. A quitina, um dos componentes da parede celular de *P. olseni*, foi isolada através de dois métodos distintos: (i) por extracção alcalina em diferentes condições e (ii) por extracção com o solvente DMAC/LiCl 5%. O material extraído foi inicialmente caracterizado por FTIR, após o qual foram escolhidas duas amostras, uma extraída pelo método alcalino (qAlc) e outra extraída com solvente (qDMAC). Prosseguiu-se então com a caracterização das duas amostras através de análise elementar, quantificação de proteína residual e acetilglucosamina, difracção de raios-x e RMN de  $^{13}\text{C}$  do estado sólido. A caracterização foi algo inconclusiva, mas pareceu indicar a presença de uma  $\beta$ -quitina amorfa.

**Palavras-chave:** Biotecnologia, *Perkinsus olseni*, cultura *in vitro*, quitina

## ÍNDICE

<b>Agradecimentos .....</b>	<b>iii</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>iv</b>
<b>Resumo .....</b>	<b>v</b>
<b>Lista de Figuras .....</b>	<b>viii</b>
<b>Lista de Tabelas .....</b>	<b>x</b>
<b>Lista de Abreviaturas.....</b>	<b>xi</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
1.1. BIOTECNOLOGIA: PASSADO, PRESENTE E FUTURO .....	1
1.2. A BIODIVERSIDADE MARINHA COMO FONTE DE MATÉRIA PRIMA COM APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS .....	2
1.2.1. <i>Investigação e desenvolvimento na biotecnologia de organismos marinhos</i> .....	3
1.2.2. <i>Bioprocessos</i> .....	3
1.2.3. <i>Biocompostos de origem marinha com potencial biotecnológico</i> .....	5
1.3. QUITINA .....	8
1.3.1. <i>Estrutura</i> .....	8
1.3.2. <i>Biossíntese e Função</i> .....	11
1.3.3. <i>Produção de Quitina</i> .....	12
1.3.4. <i>Propriedades e Aplicações</i> .....	14
<i>Biorremediação</i> .....	15
<i>Indústria Alimentar</i> .....	16
<i>Indústria farmacológica e médica</i> .....	17
1.4. PARASITAS DE BIVALVES E GASTRÓPODES DO GÉNERO <i>PERKINSUS</i> .....	19
1.4.1. <i>Ciclo de vida</i> .....	20
1.4.2. <i>Cultura in vitro do protozoário Perkinsus</i> .....	22
1.4.3. <i>Caracterização celular do parasita Perkinsus</i> .....	23
1.4.4. <i>O parasita Perkinsus: potencialidades biotecnológicas</i> .....	25
1.5. OBJECTIVOS .....	26
<b>2. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>27</b>
2.1. MANUTENÇÃO E OPTIMIZAÇÃO DA CULTURA <i>IN VITRO</i> DE <i>PERKINSUS OLSENI</i> .....	27
2.2. DETERMINAÇÃO DO CRESCIMENTO DE <i>P. OLSENI</i> .....	27
2.3. EXTRACÇÃO DE QUITINA .....	28
2.4. CARACTERIZAÇÃO DA QUITINA EXTRAÍDA .....	28
2.4.1. <i>Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)</i> .....	28
2.4.2. <i>Difracção de raios-x</i> .....	29
2.4.3. <i><sup>13</sup>C-RMN no estado sólido</i> .....	29

2.4.4. <i>Análise elementar</i> .....	29
2.4.5. <i>Quantificação de proteína</i> .....	29
2.4.6. <i>Quantificação de acetilglucosamina</i> .....	30
2.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	30
3.1. OPTIMIZAÇÃO DA CULTURA <i>IN VITRO</i> DE <i>PERKINSUS OLSENI</i> .....	31
3.1.1. <i>Suplemento de FBS</i> .....	31
3.1.2. <i>Temperatura</i> .....	33
3.1.3. <i>Osmolaridade</i> .....	34
3.1.4. <i>Inóculo</i> .....	36
3.1.5. <i>Cultura em larga escala</i> .....	37
3.2. EXTRACÇÃO DE QUITINA .....	39
3.3. CARACTERIZAÇÃO DA QUITINA ISOLADA DE <i>P. OLSENI</i> .....	43
3.3.1 <i>Análise por espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier</i> .....	43
3.3.2. <i>Análise elementar</i> .....	46
3.3.3. <i>Quantificação de proteína e acetilglucosamina</i> .....	47
3.3.5 <i>Análise por difracção de raios-x</i> .....	48
3.3.6. <i>Análise por <sup>13</sup>C RMN do estado sólido</i> .....	50
<b>4. DISCUSSÃO</b> .....	<b>53</b>
<b>5. CONCLUSÕES</b> .....	<b>65</b>
<b>6. PERSPECTIVAS FUTURAS</b> .....	<b>67</b>
<b>7. BIBLIOGRAFIA</b> .....	<b>68</b>
<b>ANEXOS</b>	

## Lista de Figuras

<b>Figura 1-1.</b> Passos gerais de engenharia de bioprocessos.....	4
<b>Figura 1-2.</b> Estruturas químicas da celulose e quitina (adaptado de Kurita 2006). .....	9
<b>Figura 1-3.</b> Representação esquemática do arranjo das cadeias (a) antiparalelas da $\alpha$ -quitina e (b) paralelas da $\beta$ -quitina (adaptado de Tharanathan e Kittur 2003). .....	10
<b>Figura 4.</b> Diagrama esquemático do processo de manufatura de quitina, quitosano e seus derivados (adaptado de Hayes <i>et al.</i> (a) 2008). .....	13
<b>Figura 1-5.</b> Representação esquemática do ciclo de vida do parasita <i>Perkinsus</i> . .....	21
<b>Figura 1-6.</b> Trofozóide de <i>P. olseni</i> .....	24
<b>Figura 3-1.</b> Efeito do suplemento de FBS no crescimento (8 dias) <i>in vitro</i> de <i>P. olseni</i> , com inóculo inicial de 0,2 unidades de OD <sub>600</sub> ( $\pm$ DesvPad, n = 4). .....	32
<b>Figura 3-2.</b> Cultura de <i>P. olseni</i> em meio DMEM:Ham's F12 (1:2), suplementado com 1% FBS, a 28°C e osmolaridade de 925 mmol/kg (ampliação x 4000). Barra = 15 $\mu$ m. .	33
<b>Figura 3-3.</b> Efeito da temperatura no crescimento (8 dias) <i>in vitro</i> de <i>P. olseni</i> , com inóculo inicial de 0,1 unidades de OD <sub>600</sub> ( $\pm$ DesvPad, n = 4). .....	34
<b>Figura 3-4.</b> Efeito da osmolaridade do meio no crescimento (8 dias) <i>in vitro</i> de <i>P. olseni</i> , com inóculo inicial de 0,1 unidades de OD <sub>600</sub> ( $\pm$ DesvPad, n = 4). .....	35

<b>Figura 3-5.</b> Cultura de <i>P. olsenii</i> em meio DMEM:Ham's F12 (1:2), suplementado com 5% FBS, a 28°C e osmolaridade de 495 mmol/kg (ampliação x 4000). Barra = 15 µm. .	36
<b>Figura 3-6.</b> Efeito do inóculo inicial na curva de crescimento <i>in vitro</i> de <i>P. olsenii</i> , antes da otimização do meio e condições de cultura(± DesvPad, n = 4) .....	37
<b>Figura 3-7.</b> Efeito do volume e agitação na produção <i>in vitro</i> em larga escala de <i>P. olsenii</i> . Inóculo inicial de 0,2 unidades de OD <sub>600</sub> e agitação a 140 rpm (± DesvPad, n = 3). .....	38
<b>Figura 3-8.</b> Crescimento celular e biomassa (peso seco), antes e depois da otimização da cultura <i>in vitro</i> de <i>P. olsenii</i> (± DesvPad, n = 3).....	39
<b>Figura 3-9.</b> Representação esquemática da extração de quitina de <i>P. olsenii</i> pelo método alcalino .....	41
<b>Figura 3-10.</b> Representação esquemática da extração de quitina de <i>P. olsenii</i> pelo método de solvente orgânico .....	42
<b>Figura 3-11.</b> Espectros de FTIR de quitina comercial (Sigma Aldrich) e amostras de quitina de <i>P. olsenii</i> extraídas por diferentes métodos: (a) 1M NaOH a 28°C; (b) 1M NaOH a 60°C; (c) 3M NaOH a 28°C; (d) 3M NaOH a 60°C e (e) extração com DMAC/5% LiCl.....	45
<b>Figura 3-12.</b> Difractogramas de raios-x das amostras: (A) quitina comercial; (B) <i>P. olsenii</i> qDMAC; (C) <i>P. olsenii</i> qAlc.....	49
<b>Figura 3.13.</b> Espectros de <sup>13</sup> C RMN em estado sólido das amostras: (A) <i>P. olsenii</i> qDMAC e (B) <i>P. olsenii</i> qAlc.....	51

## Lista de Tabelas

<b>Tabela I.</b> Exemplos de bioprodutos marinhos comercialmente disponíveis (adaptado de Pomponi, S.A. 1999).....	6
<b>Tabela II.</b> Algumas das aplicações alimentares da quitina e derivados (adaptado de Tharanathan e Kittur 2003).....	15
<b>Tabela III.</b> Percentagem do produto obtido em cada um dos processos de extração relativamente ao peso seco inicial das células homogenizadas. ....	43
<b>Tabela IV.</b> Valores das percentagens de carbono, nitrogénio, hidrogénio e enxofre presentes na quitina comercial e na quitina isolada de <i>P. olseni</i> . ....	47
<b>Tabela V.</b> Percentagem de proteína e monossacarídeos de acetilglucosamina presentes em cada uma das amostras de quitina. ....	48
<b>Tabela VI.</b> Sinais de $^{13}\text{C}$ RMN do estado sólido obtidos para a quitina de caranguejo, qDMAC e qAlc. ....	52

## Lista de Abreviaturas

<b>ADN</b>	Ácido Deoxiribonucleico
<b>AI</b>	Alcalino-Insolúvel
<b>DesvPad</b>	Desvio Padrão
<b>DMAB</b>	<i>p</i> -Dimetilaminobenzaldeído
<b>DMAC/LiCl 5%</b>	Solvente dimetilacetamida + 5% de cloreto de lítio
<b>DMEM</b>	Meio Eagle Dulbecco's modificado
<b>FBS</b>	Soro fetal bovino
<b>FTIR</b>	Infravermelho por transformada de fourier
<b>Ham's F-12</b>	Mistura nutritiva F-12 (Ham)
<b>HDL</b>	Lipoproteína de alta densidade
<b>LDL</b>	Lipoproteína de baixa densidade
<b>OD</b>	Densidade óptica
<b>PBS</b>	Tampão fosfato salino
<b>PLGA</b>	Poli (D, L-lactido-co-glicolido)
<b>RMN</b>	Ressonância Magnética Nuclear
<b>UDP</b>	Uridina difosfato

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Biotecnologia: passado, presente e futuro

A biotecnologia pode ser definida como a área da ciência que tem como objectivo a utilização ou transformação de material biológico de origem vegetal, animal, microbiano ou viral, em produtos de valor comercial, social e económico.

O campo da biotecnologia não é novo, muito pelo contrário, os chineses já destilavam etanol há 3000 anos, os babilónios conservavam o leite através da fermentação láctica e os egípcios já dominavam a fermentação do pão (Hulse 2004). Historicamente, a biotecnologia evoluiu mais como uma arte artesanal do que como ciência, no entanto, tudo mudou a partir do século XIX, quando vários progressos na área da citologia, microscopia e química analítica, foram responsáveis pelos avanços na área da microbiologia, um dos alicerces das ciências biotecnológicas (Ratledge e Kristiansen 2001). Foi no entanto, o desenvolvimento da tecnologia do ADN que revolucionou definitivamente a biotecnologia, com a descoberta da estrutura desta molécula por Watson e Crick em 1953, seguida da produção do primeiro ADN recombinante em 1973 por Cohen *et al.*, através da clonagem de um gene num plasmídeo bacteriano (Colwell 2002). O domínio das novas tecnologias genéticas foi rapidamente aplicado na indústria, como o caso da empresa pioneira Genentech Inc., que em 1977 divulgou ter produzido a primeira proteína humana (somastatina) numa bactéria, e em 1982 foi responsável pela produção e comercialização da primeira insulina humana (Humulin) produzida em bactérias (Genentech Inc. 2008).

Desde o ano de 1982 até ao presente, a evolução da biotecnologia foi extraordinária, acompanhada por uma proliferação cada vez maior de indústrias e empresas de base biotecnológica, com um investimento mundial só no ano 2000 na ordem dos 37 mil milhões de dólares (Hulse 2004) e um crescimento previsto na ordem dos 3.8% durante o período 2005-2009 (European Commission 2006)

A futura expansão e diversificação das ciências biotecnológicas parece estar garantida com a ajuda dos governos da América do Norte e União Europeia, ao declararem a saúde, segurança alimentar e protecção ambiental como políticas prioritárias (US Department of State “Science and Technology Cooperation” 2007; JRC European Commission “Life Science and Biotechnology” 2007), mas esta expansão e diversificação só será atingida com a descoberta de novos produtos e processos, e uma das alternativas possíveis será recorrer a novas fontes de biocompostos (Cowan 1997).

### **1.2.A biodiversidade marinha como fonte de matéria-prima com aplicações biotecnológicas**

A biodiversidade marinha é extremamente elevada, desde os mais simples microrganismos aos mamíferos, uma consequência da variabilidade da biosfera marinha, onde existem pressões de 1 a 1000 atmosferas e temperaturas que vão desde os 1,5°C negativos do oceano Antártico, aos 350°C das fontes hidrotermais. Esta diversidade de ecossistemas constitui assim, uma enorme fonte de diversidade genética com inúmeras possíveis implicações no campo da biotecnologia (Cowan 1997).

Apesar da história de sucesso da biotecnologia, relativamente pouco tem sido feito na área da biotecnologia de organismos marinhos, um vasto recurso com enorme potencial

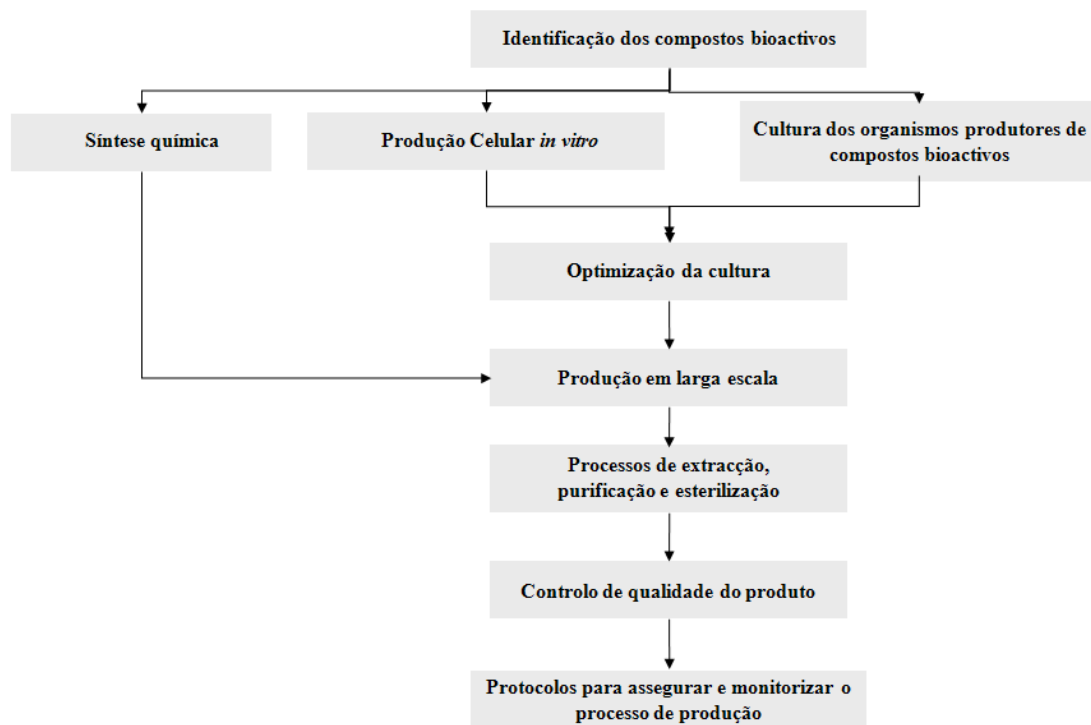
tanto na área industrial e alimentar, como na área médica e farmacêutica. De facto, praticamente só desde meados do século XX se passou a dar mais atenção à possível utilização de organismos marinhos como fonte de produtos de interesse biotecnológico, começando progressivamente a haver uma maior procura de produtos com interesse comercial. Desde então, várias centenas de produtos foram descobertos e isolados, mas apenas uma pequena percentagem foi comercializada (Grønning 2004).

### **1.2.1. Investigação e desenvolvimento na biotecnologia de organismos marinhos**

Os organismos marinhos, desde as bactérias, passando pelas algas até peixes transgénicos, possuem a capacidade de fornecer toda uma gama de bioprodutos que abrangem todas as áreas da biotecnologia, desde produtos biomédicos e alimentares até produtos usados na investigação científica (Kim e Mendis 2006), alguns dos quais já se encontram comercializados (Tab. I), outros estão em testes clínicos, enquanto alguns ainda não passaram das bancadas de laboratório, estando ainda na fase experimental. No entanto, para que um produto possa ser testado é necessário primeiro desenvolver e otimizar os métodos de extracção e purificação desses compostos, os chamados bioprocessos.

### **1.2.2 Bioprocessos**

Os bioprocessos consistem nos diferentes passos necessários desde a matéria-prima, até à comercialização do produto (Fig.1-1), quer sejam células, metabolitos celulares ou extracelulares.



**Figura 1-1.** Passos gerais de engenharia de bioprocessos.

A engenharia de bioprocessos é um elemento essencial para a investigação e aplicação competitiva na área da biotecnologia, e a difícil implementação destes bioprocessos aos organismos marinhos, é o motivo pelo qual estes têm sido subexplorados na biotecnologia.

A fraca acessibilidade destes recursos, a necessidade de recolha de material de forma sustentável e a dificuldade na cultura de organismos marinhos em laboratório, agravam o já complicado passo de extracção e purificação dos biocompostos (processo *downstream*), limitando a disponibilidade destes para ensaios clínicos ou posteriores modificações por métodos químicos ou biológicos (Zaborsky 1999).

Na última década, verificou-se no entanto um aumento do uso da genómica na descoberta de novos metabolitos, recorrendo a métodos como bibliotecas de ADN e *microarrays* não só se impulsionou a descoberta de novos compostos bioactivos, como também se minimizou o impacto da recolha de organismos marinhos (Hoover *et al.* 2007). Após a identificação dos biocompostos, a síntese química constitui uma alternativa para a produção destes em larga escala, no entanto a maioria requer passos complexos e pouco rentáveis, o que torna necessário recorrer a métodos alternativos como a produção dos organismos em aquacultura, sistemas *in vitro* ou bioreactores, como a aquacultura da esponja de águas profundas *Lissodendoryx sp.*, produtora de um composto antitumoral (Pomponi 1999) e a cultura celular *in vitro* da esponja *Dysidea avara*, produtora do composto “avarol” com actividade antitumoral, antibacteriana e antiviral (Müller *et al.* 2000).

### **1.2.3 Biocompostos de origem marinha com potencial biotecnológico**

A área biomédica é o segmento com maior crescimento e desenvolvimento na área da biotecnologia de organismos marinhos, confirmada pelas centenas de artigos publicados elucidando a identificação, estrutura e bioactividade de vários produtos de origem marinha (Cowan 1997).

As esponjas marinhas e microrganismos a elas associados, têm-se revelado como fontes importantes de novos compostos com propriedades biomédicas, como agentes anti-tumorais, imunossupressores e anti-infecciosos (Wijffels 2007).

Alguns compostos já são comercializados há algum tempo como o caso do “aciclovir”, “AZT” e “Ara-C”, derivados de compostos originalmente isolados de esponjas marinhas,

outros encontram-se em testes clínicos, como o caso da molécula “halicondrina-B” extraída da esponja *Halichondria okadai* e que apresenta propriedades anti-tumorais, e a molécula “manzamina”, com actividade anti-malária produzida pelo *Micromonospora sp.*, um microrganismo associado a uma esponja (Colwell 2002).

**Tabela I.** Exemplos de bioprodutos marinhos comercialmente disponíveis (adaptado de Pomponi, S.A. 1999)

Produto	Aplicação	Fonte original	Método de Produção
Ara-A	Composto antiviral	Esponja marinha	Fermentação microbiana de um análogo
Ara-C	Composto anticancerígeno	Esponja marinha	Síntese química de um análogo
Ácido Ocadaico	Sonda Molecular: Inibidor de Fosfatase	Dinoflagelado	Cultura Celular
Monoalido	Sonda Molecular: Inibidor de Fosfolipase A2	Esponja marinha <i>Luffariella variabilis</i>	Recolha natural da esponja marinha
Vent™ DNA Polimerase	Enzima Polimerase	Bactéria de fonte hidrotermal	Proteína Recombinante
Formulaid® (Martek Biosciences)	Ácidos gordos como suplemento na comida de crianças	Microalga marinha	Cultura Celular
Aequorin	Indicador de cálcio bioluminescente	Alforreca Bioluminescente <i>Aequora victoria</i>	Proteína Recombinante
Proteína Verde Fluorescente (GFP)	Gene Reporter	Alforreca Bioluminescente <i>Aequora victoria</i>	Proteína Recombinante
Ficoeritrine	Anticorpos conjugados usados em ELISA e citometria de fluxo	Alga vermelha	Cultura Celular
Resilience® (Estée Lauder)	"Extracto marinho" aditivo em cremes para a pele	Coral <i>Pseudopterogorgia elisabethae</i>	Recolha natural de coral

Muitos outros organismos marinhos têm fornecido compostos com propriedades farmacológicas, como o briozoário *Bugula neritina* que produz um agente anti-tumoral denominado “briostatine-1”, o tunicado *Ecteinascidia turbinata* do qual se isolou um novo alcalóide denominado “ecteinascidine 743” (Fenical 1997) e a cianobactéria *Lyngbya majuscula* que sintetiza o composto “curacina-A” com bioactividade ao nível da

divisão de células cancerígenas (Davidson 1995). Grande parte destes compostos são ou metabolitos secundários, sem qualquer função metabólica conhecida, ou toxinas, que servem para protecção de predadores como o “ácido ocadaico” (inibidor de fosfatases) produzido por dinoflagelados o que os torna responsáveis pela interdição de bivalves para alimentação humana quando existem surtos destes dinoflagelados nos locais onde os bivalves são apanhados.

A indústria alimentar é outra das beneficiárias da biotecnologia de organismos marinhos, na qual as algas são há muito tempo reconhecidas pela sua grande capacidade de fornecer produtos, nomeadamente carotenóides. Estes são usados como antioxidantes dos alimentos e como aditivos alimentares na aquacultura de salmão, o qual é responsável pela sua coloração vermelha (Wijffels 2007). As algas são também aproveitadas para extracção de biopolímeros como o agar, agarose, carregana e alginatos, produtos que fazem parte de uma indústria que move cerca de mil milhões de dólares, com importância não só na área alimentar como também na farmacêutica (Renn 1997).

A diversidade estrutural dos biopolímeros confere-lhes variadas propriedades que reflectem as suas muitas aplicações industriais, como o caso da quitina, um polímero actualmente extraído do exosqueleto de caranguejos e camarões, que conjuntamente com o seu derivado quitosano (quitina deacetilada), apresenta propriedades notáveis como a capacidade de formar fibras e filmes, adsorver iões metálicos e ter actividade antibacteriana e coagulante (Kim e Mendis 2006).

A procura cada vez maior de polímeros naturais, tem proporcionado um aumento do interesse em isolar e identificar novos organismos produtores de biopolímeros, estando já descritos vários microrganismos marinhos produtores de polímeros com propriedades

comercialmente interessantes, como a bactéria *Acinetobacter*, que sintetiza um exopolissacarídeo denominado emulsano com aplicações na indústria do petróleo, a bactéria *Zooglea sp.*, que produz um polissacarídeo com propriedades adsorventes de íons metálicos em solução, como o crômio, ferro e chumbo, e o *Alcaligenes eutrophus* que sintetiza polímeros poliésteres denominados poli- $\beta$ -hidroxialcanoatos, que já são conhecidos há algum tempo pelas suas aplicações no fabrico de termoplásticos biodegradáveis (Weiner 1997).

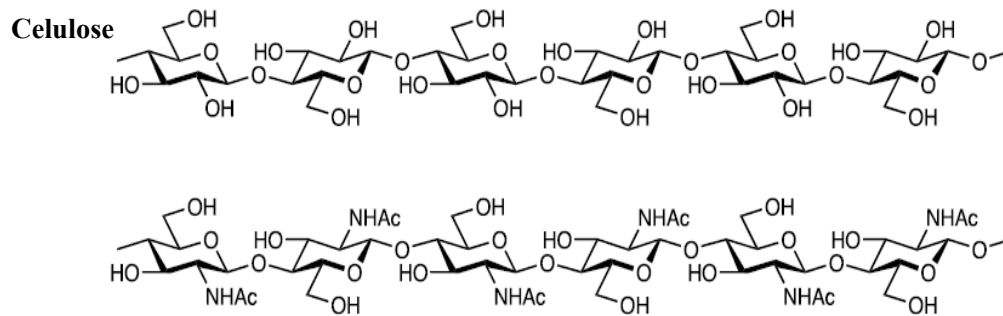
### **1.3. Quitina**

A quitina, descoberta no ano de 1811, é o segundo polissacarídeo mais abundante logo a seguir à celulose, presente principalmente no exosqueleto dos artrópodes e na parede celular de certas algas e fungos entre outros organismos. Apesar da disponibilidade de quitina em grande quantidade, e do reconhecimento das suas imensas aplicações biotecnológicas, esta permanece relativamente subaproveitada (Tharanathan e Kittur 2003).

#### **1.3.1. Estrutura**

A estrutura molecular da quitina demorou décadas a ser elucidada. Este homopolímero de (1 $\rightarrow$ 4)-N-acetil- $\beta$ -D-glucosamina difere da celulose pela substituição do grupo hidroxil, por um grupo acetamida na posição C-2 (Fig. 1-2) (Kumar 2000). A quitina pode variar quanto ao seu grau de polimerização e acetilação, mas as suas cadeias individuais são essencialmente lineares, com uma rotação de 180° em cada 10.1-10.5 Å ao longo do eixo

da cadeia (Tharanathan e Kittur 2003). As cadeias individuais de quitina estão dispostas paralelamente, e ligadas entre si por pontes de hidrogénio N-H...O=C.

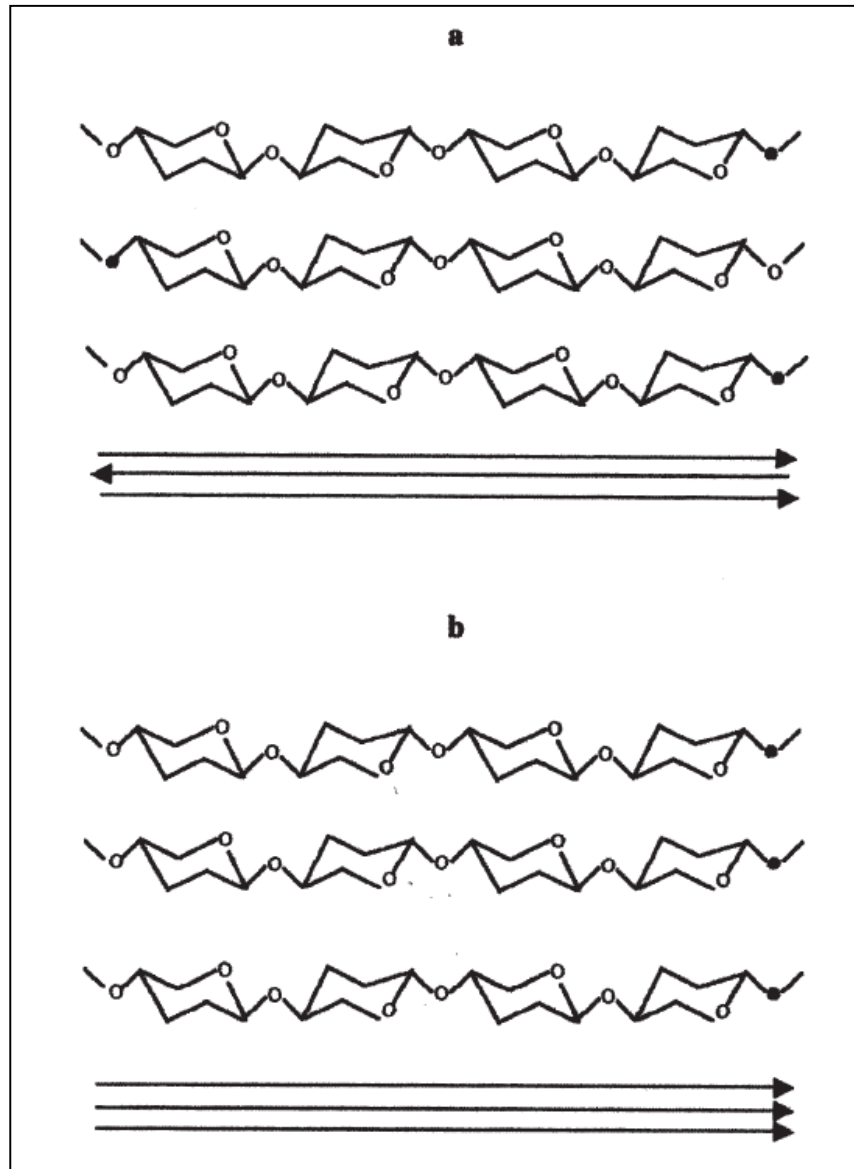


**Figura 1-2.** Estruturas químicas da celulose e quitina (adaptado de Kurita 2006).

A quitina pode apresentar três diferentes estruturas cristalinas consoante a origem deste polissacarídeo, denominadas de  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ -quitina, as quais podem ser diferenciadas por técnicas como a difracção de raios-x, ressonância magnética nuclear e espectroscopia de infravermelho (Cárdenas 2004; Jang *et al.* 2004).

A forma  $\alpha$  ( $\alpha$ -quitina), mais comum, encontra-se na parede celular de alguns fungos e no exosqueleto de artrópodes, enquanto a forma  $\beta$  ( $\beta$ -quitina), mais rara, encontra-se nas penas das lulas, nas lóricas produzidas por algumas algas e protozoários marinhos e nos espinhos excretados pela diatomácia *Thalassiosira fluviatilis*. Estas duas estruturas alomórficas diferem apenas no arranjo das várias cadeias poliméricas individuais, antiparalelas no caso da  $\alpha$ -quitina e paralelas na forma  $\beta$  (Fig. 1-3). A  $\alpha$ -quitina apresenta fortes pontes de hidrogénio inter e intra-cadeias enquanto a  $\beta$ -quitina possui apenas pontes de hidrogénio intra-cadeias mais fracas, o que a torna mais flexível e reactiva. Por seu lado a menos comum  $\gamma$ -quitina presente nos casulos do escaravelho *Ptinus*, apresenta uma estrutura ainda não completamente identificada, mas descrita como sendo uma

estrutura intermédia com duas cadeias paralelas e uma antiparalela. No entanto foi sugerida também a possibilidade de ser apenas uma simples distorsão das estruturas  $\alpha$  e  $\beta$ .



**Figura 1-3.** Representação esquemática do arranjo das cadeias (a) antiparalelas da  $\alpha$ -quitina e (b) paralelas da  $\beta$ -quitina (adaptado de Tharanathan e Kittur 2003).

### **1.3.2. Biossíntese e Função**

A formação e deposição de quitina é um processo complexo ainda não completamente compreendido, este, é iniciado intracelularmente e concluído com a inclusão da quitina em complexos macromoleculares externos, como a parede celular dos fungos e a cutícula dos artrópodes.

A biossíntese dos polímeros de quitina começa com a conversão sequencial de açúcares como a glucose ou a trealose no composto UDP-N-acetilglucosamina, o substrato da quitina sintase, esta enzima depois de translocada para as membranas plasmáticas é responsável pela polimerização dos monómeros de acetilglucosamina e consequente formação de quitina. Os polímeros de quitina são posteriormente translocados através da membrana plasmática para o exterior, onde formam microfibrilas através de pontes de hidrogénio, e finalmente associadas a outras moléculas (Cohen 2001) formando matrizes resistentes mas flexíveis, com uma função essencialmente estrutural.

Nos fungos, a quitina pode variar em quantidade relativamente às diferentes espécies e seus parâmetros fisiológicos, mas geralmente encontra-se no septo primário de células em divisão, e na parede celular associada a glucanos e glicoproteínas, sendo responsável pela sua rigidez e contribuindo para a sua integridade (Bowman e Free 2006).

Os artrópodes são caracterizados por possuir um exosqueleto e um dos seus principais componentes é a quitina. Nos insectos este polímero encontra-se embebido numa matriz de proteínas, compostos polifenólicos, água e alguns lípidos. A sua proporção relativamente aos outros componentes pode variar na constituição da cutícula, conferindo-lhe diferentes propriedades de resistência e flexibilidade (Vincent e Wegst 2004). No caso dos crustáceos, o exosqueleto é constituído por fibras de quitina

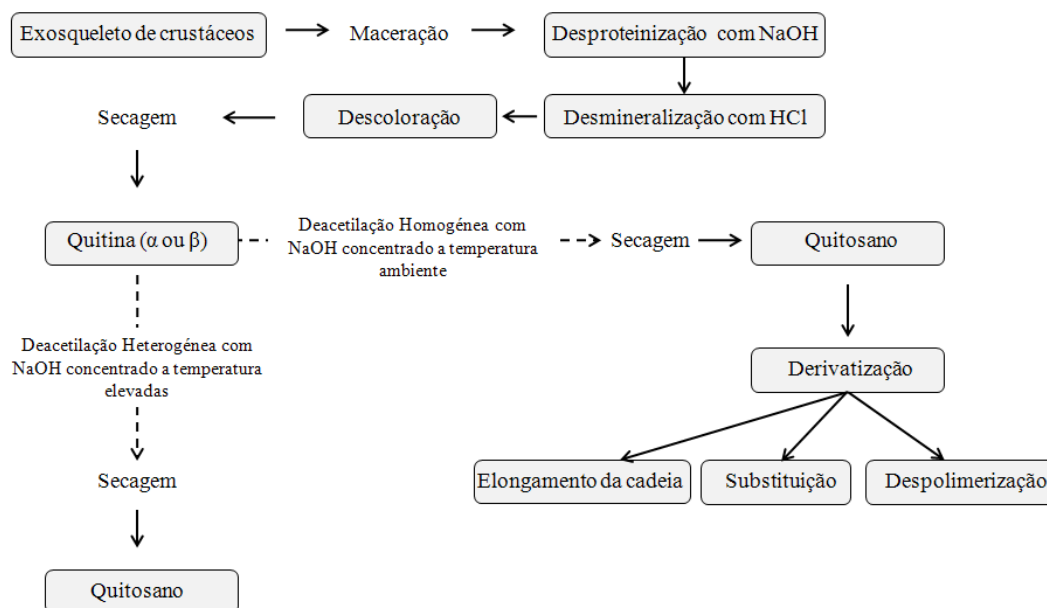
associadas a proteínas e pigmentos, estas fibras encontram-se altamente mineralizadas, geralmente por carbonato de cálcio responsável pela sua rigidez (Chen *et al.* 2008).

### **1.3.3. Produção de Quitina**

Actualmente a produção de quitina e do seu derivado quitosano, é feita a partir dos exosqueletos de camarão e caranguejo descartados pela indústria pesqueira e alimentar, produzidos comercialmente em vários países como a Índia, Japão, Polónia, Noruega e Austrália. Esta produção é economicamente viável sobretudo se for associada à extracção de pigmentos como os carotenóides (Kumar 2000).

O exosqueleto dos crustáceos é constituído principalmente por quitina (15-20%), proteínas (20-40%), carbonato de cálcio (20-50%) e pigmentos como a astaxantina e carotenóides. Como a quitina se encontra associada a outros compostos, são necessários tratamentos agressivos para a extracção e purificação da quitina e quitosano (Fig. 4), para os quais foram desenvolvidos vários métodos de produção em larga escala (Kurita 2006).

O primeiro passo no processo de extracção de quitina é a desmineralização do exosqueleto com ácido clorídrico diluído à temperatura ambiente, seguida da desproteínização a 100°C com hidróxido de sódio ou hidróxido de potássio (estes dois primeiros passos podem ser feitos pela ordem inversa), e por último os pigmentos são retirados (descoloração) com permanganato de potássio ou peróxido de hidrogénio ou ainda hipoclorito de sódio. Para a produção de quitosano, a quitina previamente extraída é deacetilada com um tratamento de hidróxido de sódio concentrado, com o objectivo de obter um produto com um grau de acetilação não superior a 40% (Tharanathan e Kittur 2003).



**Figura 4.** Diagrama esquemático do processo de fabricação de quitina, quitosano e seus derivados (adaptado de Hayes *et al.* (a) 2008).

O preço comercial de quitina e quitosano varia com o seu grau de pureza e deacetilação. Em pequenas quantidades, o preço da quitina ronda os 50 euros por cada 100g podendo atingir os 95 euros por grama (quitina purificada). Por seu lado o valor de quitosano  $\geq 75\%$  deacetilado é de cerca de 115 euros por 100 g (Lista de preços da Sigma-Aldrich, Inc.)

O processo químico de fabricação destes polímeros a partir de cutícula de crustáceos apresenta duas grandes desvantagens: (i) a grande produção de resíduos químicos, pois para produzir 1 kg de quitosano 70% deacetilado, são necessários 6,3 kg de HCl e 1,8 kg de NaOH (Kumar 2000); (ii) a dificuldade em obter um produto final com propriedades e

características sempre semelhantes, o que é difícil de atingir quando o material inicial é um produto secundário de outras indústrias (Kim e Mendis 2006).

Várias alternativas têm sido propostas para uma produção controlada e de alta qualidade, como o uso de processos enzimáticos, tanto proteolíticos como quitinolíticos, na extração e purificação de quitina a partir do exosqueleto dos crustáceos (Hayes *et al.* (a) 2008), ou a produção e extração de quitina a partir de culturas *in vitro* de microrganismos como os fungos, que apesar de possuírem menor quantidade de quitina, esta seria homogênea se produzida em condições controladas. Esta produção em larga escala poderia ser economicamente atractiva se combinada com extracções de outros biocompostos (Pochanavanich e Suntornsuk 2002; Beaney *et al* 2005).

#### **1.3.4. Propriedades e Aplicações**

O método utilizado na extração da quitina influencia as suas características e propriedades, com implicação directa nas suas aplicações industriais. As principais características a ter em conta são a sua cristalinidade, grau de acetilação, conteúdo protéico, peso molecular e toxicidade, no entanto para a sua comercialização são necessários testes suplementares para além dos anteriormente mencionados, como a viscosidade, o conteúdo em cinzas, água, lípidos e actividade óptica (Committee on Knowledge Assessment 1999).

Existe uma grande variedade de técnicas que podem ser utilizadas para a caracterização do polímero de quitina, entre as quais, a difracção de raios-x, a espectroscopia de infravermelhos, ressonância magnética nuclear, análise elementar e espectroscopia de absorção atómica de entre as mais utilizadas.

A biocompatibilidade, biodegradabilidade, não toxicidade e actividade hemostática são as principais propriedades que tornam os polímeros de quitina e seus derivados muito atractivos para uma enorme variedade de aplicações (Tab. II), tanto na indústria alimentar, farmacêutica e médica como na área ambiental.

**Tabela II.** Algumas das aplicações alimentares da quitina e derivados (adaptado de Tharanathan e Kittur 2003)

<b>Áreas de Aplicação</b>	<b>Exemplos</b>
Agente antimicrobiano	Bactericida, Fungicida
Produção de biofilmes	Transferência controlada entre alimentos e ambiente. Libertação controlada de substâncias antimicrobiana: antioxidantes e fármacos Controlo enzimático do amadurecimento dos frutos Membranas osmóticas reversas
Aditivo	Clarificação e deacidificação de frutos e sumos Agente estabilizante de cor e textura
Nutrição	Fibra dietética Efeito hipocolesterol Aditivo para rações de animais Agente antigástrico Ingrediente de comida para bebés
Recuperador de materiais sólidos	Purificação de água Floculação por afinidade

### ***Biorremediação***

A biorremediação emprega na maioria das vezes microrganismos para remover ou degradar compostos químicos não desejados. Para tal são adicionados nutrientes e compostos dadores de electrões a estes organismos de forma a promover o seu crescimento. A quitina e seus derivados podem ser adicionados a estas culturas com algumas vantagens, podendo ser utilizados simultaneamente como nutriente e dador de

electrões, para além de que a sua degradação se processa lentamente, tornando possível a sua reutilização várias vezes em cultura (Hayes *et al.* (b) 2008).

A quitina apresenta também boas capacidades adsorventes, tanto a nível de iões metálicos como o chumbo, cádmio e crómio, como também de resíduos colorantes usados na indústria têxtil.

O quitosano como polímero policatiónico possui propriedades coagulantes, o que o torna atractivo e cada vez mais importante no tratamento de águas residuais, nomeadamente em fábricas de processamento de alimentos como o leite. Apesar de ser mais dispendioso do que outros polímeros catiónicos sintéticos, é biodegradável e não tóxico, características importantes a nível ecológico (Kurita 2006).

### ***Industria Alimentar***

O transporte, manutenção e qualidade dos alimentos são prioridades na indústria alimentar, e como tal, alguma investigação tem sido feita nesta área, incluindo na aplicação da quitina e seus derivados como preservantes alimentares, tanto no âmbito antimicrobiano como na maturação e conservação.

O quitosano possui propriedades antimicrobianas em parte devido aos grupos  $\text{NH}_2^+$ , embora não se conheça perfeitamente o seu modo de acção. A actividade antimicrobiana do quitosano usado como conservante das ostras foi comprovada como sendo eficaz contra estirpes de *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Aeromonas* e *Vibrio*, assim como as cenouras conservadas com película de quitosano são mais resistentes ao apodrecimento causado pela *Sclerotinia sclerotiorum* (Hayes *et al.* 2008). Por outro lado, também a maturação dos frutos e vegetais pode ser regulada com a ajuda do polímero de quitosano,

pois uma cobertura com este polímero promove uma maturação enzimática controlada, aumentando não só a duração como a qualidade destes alimentos relativamente a polímeros sintéticos (Srinivasa e Tharanathan 2007).

### ***Indústria farmacológica e médica***

A indústria biomédica é um dos segmentos onde existe maior investimento, o que significa um maior número de estudos científicos, incluindo em polímeros de quitina e derivados, existindo inúmeros estudos que relatam várias aplicações destes polímeros no campo médico.

Estudos recentes revelaram a capacidade de oligómeros de quitosano serem eficazes na redução dos níveis de pressão arterial através da inibição da enzima conversora de angiotensina, a qual está envolvida na regulação periférica da pressão sanguínea. Esta capacidade poderá ter potencial num futuro tratamento da hipertensão, um dos principais factores de risco em doenças cardiovasculares (Park *et al.* 2003). O quitosano tem sido estudado também pela sua capacidade de reduzir os níveis de colesterol no sangue quando adicionado na dieta, testes clínicos preliminares indicaram a redução em 6% de LDL-colesterol e ao mesmo tempo um aumento de 10% nos níveis de HDL-colesterol (Kim e Rajapakse 2005).

Os oligómeros de quitosano têm também demonstrado uma actividade anti-tumoral tanto *in vitro* como *in vivo*, nomeadamente efeitos anti-metastáticos em carcinomas pulmonares de Lewis. Para além disso, a quitina parcialmente deacetilada, assim como a quitina carboxilada, revelaram igualmente actividades contra a progressão tumoral através de uma estimulação dos macrófagos e linfócitos-T (Kim e Mendis 2006).

Byun *et al.* (2005) verificaram que o quitosano e seus oligómeros possuem actividade inibidora da enzima  $\beta$ -secretase, que por sua vez possui um papel importante na ocorrência da doença de Alzheimer através da acumulação no cérebro de peptídeos  $\beta$ -amiloídes, os quais formam agregados fibrilares insolúveis que resultam na morte das células neurais. Estes carboidratos de quitosano são os primeiros a serem descritos com capacidade inibidora desta enzima, capacidade esta que depende do seu peso molecular e grau de deacetilação.

São conhecidas as propriedades hemostáticas da quitina e seus derivados, no entanto, apesar do seu mecanismo de acção permanecer desconhecido, pensa-se que causa a vasoconstrição e a rápida mobilização de glóbulos vermelhos, plaquetas e factores de coagulação para o local do ferimento, sendo também sugerido que estimula a produção de fibroblastos. O sucesso da quitina no tratamento de ferimentos graves permanece controverso, no entanto a sua eficiência no caso de ferimentos ligeiros está bem documentada (Hayes *et al.* 2008). A quitina e o quitosano são ainda utilizados com sucesso como biomaterial para pele artificial e suturas. Exemplo disso são as ligaduras de quitosano utilizadas pelos paramédicos do exército dos EUA para interromper hemorragias instantaneamente, em locais de combate como o Iraque e Afeganistão (Kurita 2006).

A capacidade de formação de filmes, hidrogéis e estruturas tridimensionais por parte da quitina e seus derivados constitui uma ferramenta auxiliar nas suas aplicações, como na produção de estruturas para regeneração óssea em conjunto com outros compostos como o colagénio e hidroxiapatite (Shi *et al.* 2006 e Malafaya 2002), ou a produção de lentes de contacto a partir de quitosano, pois este possui um conjunto de características ideais, tais

como estabilidade mecânica, propriedades ópticas, permeabilidade a gases, compatibilidade imunológica e actividade antimicrobiana (Kumar 2000). A quitina e seus derivados apresentam também aplicações promissoras na área da indústria farmacêutica devido às suas características hidrofílicas, biodegradabilidade, porosidade e não toxicidade, que os tornam atractivos como agentes libertadores de compostos bioactivos de uma maneira controlada, principalmente péptidos, ADN e compostos hidrofílicos. No entanto estes polímeros também possuem limitações, que podem por vezes ser contornadas com derivações e combinações com outros polímeros, como o poli(D,L-lactido-co-glicolido) (PLGA) (Mi *et al.* 2003; Langoth *et al.* 2006 e Xu *et al.* 2008).

#### **1.4. Parasitas de bivalves e gastrópodes do género *Perkinsus***

A infestação por parte do parasita *Perkinsus*, foi pela primeira vez documentada em 1940 no golfo do México, onde foi associado a extensas mortalidades em ostras. Nove anos mais tarde este parasita foi identificado em ostras *Crassostrea virginica* em Chesapeake Bay, EUA, e inicialmente classificado como um fungo e denominado de *Dermocystidium marinus*. No entanto, em 1966 foi reclassificado como *Labyrinthomyxa marina* baseado em características estruturais, e novamente reclassificado em 1978 como *Perkinsus marinus*.

Outros parasitas do género *Perkinsus* foram entretanto descritos em bivalves de outras regiões como o Mediterrâneo, Hawai e Austrália, onde foi identificada uma nova espécie denominada de *Perkinsus olseni* presente no gastrópode marinho *Haliotis rubra* (Goggin e Lester 1987).

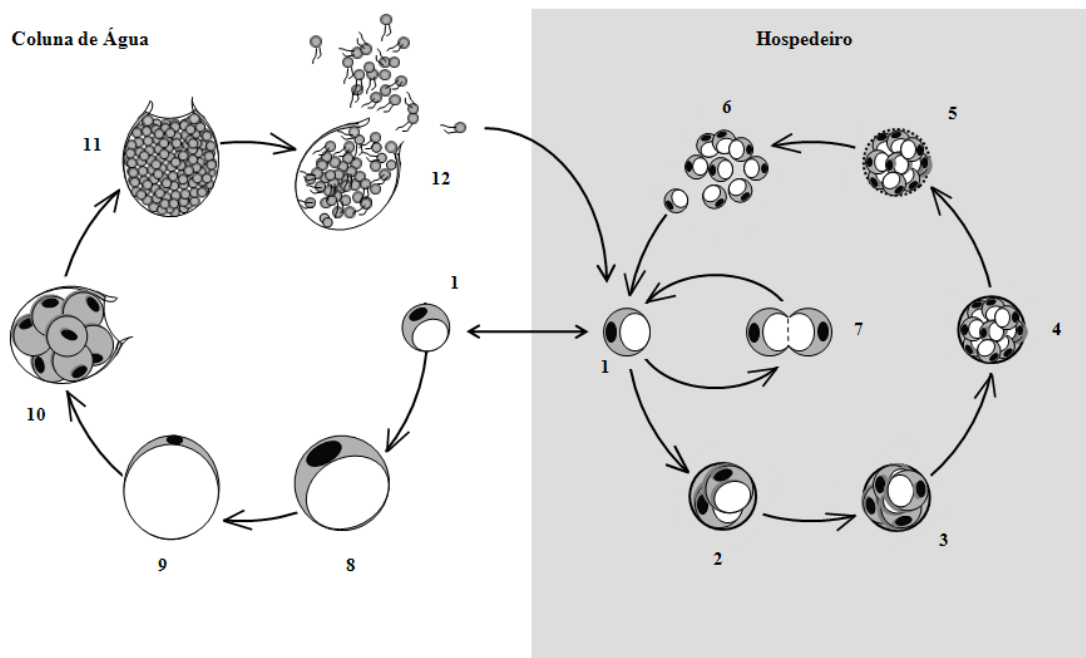
Em Portugal, no final dos anos oitenta, foi identificado um parasita do género *Perkinsus* (*P.*) tendo sido descrito como a principal causa de mortalidade na amêijoia *Ruditapes decussatus*. Este parasita foi identificado por características ultraestruturais como uma nova espécie e denominado *Perkinsus atlanticus* (Azevedo 1989), mas mais tarde, através de ferramentas moleculares, foi re-classificado como pertencendo à mesma espécie anteriormente identificada na Austrália, *Perkinsus olseni* (Murrel *et al.* 2002).

Hoje em dia estão descritas várias espécies deste parasita, nomeadamente *P. marinus*, *P. olseni* (sinon. *P. atlanticus*), *P. chesapeakei* (sinon. *P. andrewsi*), *P. mediterraneus*, *P. qugwadi* (Abollo *et al.* 2006) e mais recentemente *P. honshuensis* (Dungan e Reece 2006) e *P. beihaiensis* (Moss *et al.* 2008).

#### **1.4.1. Ciclo de vida**

O ciclo de vida deste protozoário não é ainda completamente compreendido (Fig. 1-5), mas crê-se que começa com o estadio infeccioso denominado zoósporo (forma livre possuidora de flagelos) ou o estadio trofozóide, libertado de bivalves infectados e moribundos, que passa para a coluna de água e infecta outros bivalves. No interior do hospedeiro, estes são fagocitados (mas não destruídos) pelos hemócitos, através dos quais se disseminam pelos vários tecidos (Schott *et al.* 2003), como as brânquias, glândula digestiva e manto. Os trofozóides, uma vez instalados nos tecidos, multiplicam-se vegetativamente por fissão múltipla (esquizogonia) ou mais raramente por bipartição. A contínua proliferação deste parasita leva eventualmente à lise das células do hospedeiro e em último caso à sua morte (La Peyre 1996). A libertação de trofozóides na coluna de água conduz muitas vezes à sua diferenciação em pré-zoosporângios. Estes aumentam de

tamanho e formam um tubo de descarga, ao mesmo tempo que o seu citoplasma se torna granular e posteriormente começa a sofrer divisões binárias sucessivas, formando centenas de zoósporos biflagelados que são finalmente libertados pelo tubo de descarga (zoosporolação) (Auzoux-Bourdenave *et al.* 1995).



**Figura 1-5.** Representação esquemática do ciclo de vida do parasita *Perkinsus*. Desenvolvimento vegetativo do parasita no hospedeiro (1-7): os trofozóides (1) multiplicam-se por esquizogonia (2-6) ou por bipartição (7). A libertação de trofozóides na coluna de água pode conduzir à diferenciação e posterior zoosporolação (8-12): estes aumentam de tamanho (8) e o seu vacúolo expande-se resultando no estágio pré-zoosporângio ou hipnósporo (9), forma-se posteriormente um tubo de descarga ao mesmo tempo que o citoplasma se torna granular e começa o processo de bipartição (10), várias centenas de pré-zoósporos são então produzidos no zoosporângio (11), que finalmente após maturação são libertados através do tubo de descarga (12).

Este parasita é tolerante a uma variada gama de condições ambientais, no entanto a infecção é favorecida em condições de temperaturas e salinidades elevadas, prevalecendo nos meses de Verão. Estudos com bivalves infectados naturalmente (Ford 1996; Karolus *et al.* 2000; Ngo e Choi 2004) e infectados em laboratório (Chu 1996; Ford *et al.* 2002) demonstraram que existe uma correlação positiva dos níveis de infecção e mortalidade com a temperatura e salinidade. O grau de infecção e prevalência deste parasita parece também estar relacionado com factores de condição do hospedeiro, como o ciclo reprodutivo (Ngo e Choi 2004), infecção por parte de outros patógenos (Tall *et al.* 1999), níveis de stress provocados por poluentes marinhos (Chu *et al.* 2002) e a intensidade de moluscicultura (Leite *et al.* 2004).

#### **1.4.2. Cultura *in vitro* do protozoário *Perkinsus***

A importância do desenvolvimento de técnicas de propagação de parasitas *in vitro* é essencial para o estudo de vários aspectos, como a morfologia, metabolismo, ciclo de vida, interacção parasita-hospedeiro e de compostos com potencial terapêutico. A cultura *in vitro* de parasitas é um processo difícil e exigente, na medida em que estes por vezes possuem um ciclo de vida complexo com o requerimento de condições semelhantes ao ambiente fornecido pelo hospedeiro, o que implica a necessidade de testar uma gama variada de meios de cultura, suplementos nutritivos e parâmetros como a temperatura, osmolaridade e pH (Visvesvara e Garcia 2002).

Durante muito tempo, a falta de um sistema *in vitro* para a propagação do parasita *Perkinsus*, limitou a realização de vários estudos relativos a este protozoário. O desenvolvimento inicial de culturas *in vitro* do parasita *Perkinsus*, só foi atingido com

sucesso em 1993 por três grupos independentes, La Peyre *et al.* (1993), o qual conseguiu a propagação *in vitro* de *P. marinus* isolado de tecidos de ostra *Crassostrea virginica*, recorrendo ao uso de meio de cultura (JL-ODRP-1) com composição semelhante à da hemolinfa de ostra, Kleinschuster e Swink (1993), que isolaram e cultivaram *P. marinus* em meio comercial L-15 modificado a partir de tecidos viscerais de ostra, e Gauthier e Vasta (1993), que iniciaram culturas deste parasita a partir de hemolinfa de ostra e propagadas em meio comercial DMEM:Ham's F-12.

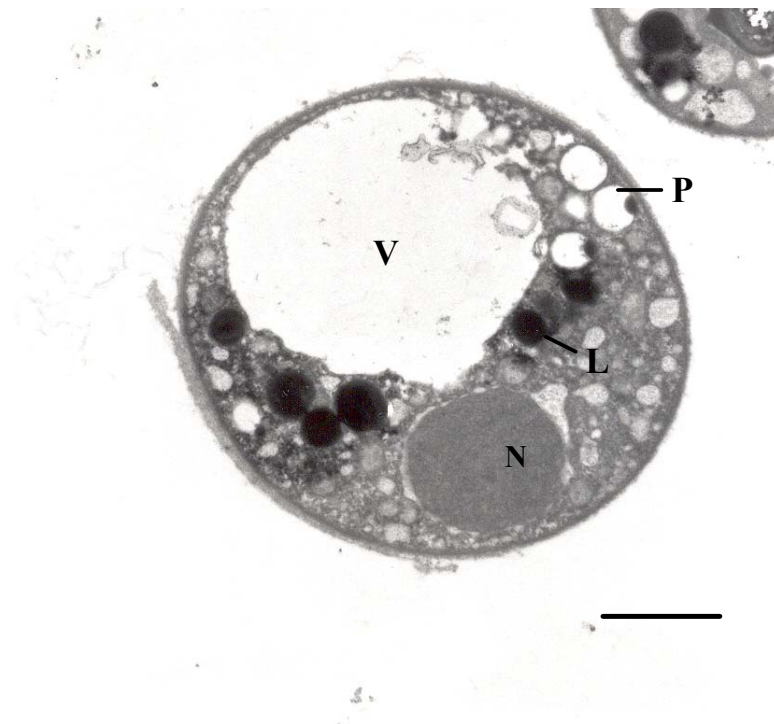
Actualmente encontram-se disponíveis culturas de diferentes espécies deste parasita marinho, nomeadamente *P. marinus*, *P. chesapeaki* (McLaughlin *et al.* 2000), *P. olseni* (Robledo *et al.* 2002), *P. honshuensis* (Dungan e Reece 2006) e *P. mediterraneus* (Casas *et al.* 2008), algumas das quais se encontram em repositórios reconhecidos como o ATCC (American Tissue Culture Collection).

Os sistemas de cultura *in vitro* de *Perkinsus*, apesar de variarem no tipo de meio utilizado e condições de crescimento, como a temperatura, salinidade e pH, são semelhantes relativamente à capacidade de propagação do parasita na ausência de componentes do hospedeiro, conseguindo ao mesmo tempo reproduzir a morfologia e ciclo de vida presentes neste (Fig. 1-5) (Sunila *et al.* 2001).

#### **1.4.3. Caracterização celular do parasita *Perkinsus***

O trofozóide de *Perkinsus* (Fig.1-6) constitui o principal estadio tanto no hospedeiro como na cultura *in vitro*, e é caracterizado em termos gerais por uma morfologia de anel de sinete, com o núcleo acêntrico e nucléolo bem visíveis, o citoplasma granuloso e com vários pequenos vacúolos ou apenas um vacúolo de grandes dimensões, onde estão

presentes por vezes vários vacuoplastos e gotas lipídicas. A célula é rodeada por uma parede celular bem definida com uma espessura variável, com estruturas vesiculares adjacentes semelhantes a lomasomas (Azevedo *et al.* 1990; Coss *et al.* 2001; Sunila *et al.* 2001).



**Figura 1-6.** Trofozóide de *P. olsenii*, com núcleo ecêntrico bem definido (N), um vacúolo de grandes dimensões (V) e várias gotas lipídicas (L), assim como material precursor de vacuoplastos (P). Barra = 1  $\mu$ m. (Microscopia Electrónica de Transmissão efectuada pelo Doutor Carlos Azevedo, Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Porto).

A parede celular está directamente envolvida no reconhecimento parasita-hospedeiro, mas apesar disso, pouco é conhecido acerca da composição, organização e estrutura da parede celular deste parasita. No entanto, foi já identificada uma proteína (PWP-1) de

alto peso molecular (233 kDa) como o seu principal componente proteico. Esta apresenta ligações disulfídicas a outros componentes da parede celular, o que parece ser uma das razões para a sua resistência relativamente à lise química e mecânica (Montes 2002). Estudos com lectinas revelaram ainda que os principais glicoconjugados na superfície da parede celular do *Perkinsus*, possuem os sacarídeos glucose-manose e N-acetil-glucosamina como os seus principais componentes, e em menor quantidade galactose e N-acetil-galactosamina (Gauthier *et al.* 2004). A quitina, um polímero de N-acetil-glucosamina, parece ser um dos constituintes da matriz da parede celular do protozoário *Perkinsus*, facto que é confirmado pela presença, no parasita, dos genes que codificam as enzimas responsáveis pela biossíntese deste polímero (Leite RB, Afonso R e Cancela ML, resultados não publicados).

#### **1.4.4. O parasita *Perkinsus*: potencialidades biotecnológicas**

O protozoário marinho do género *Perkinsus*, à semelhança de outros microrganismos marinhos, possui características com potencialidades biotecnológicas, tais como: **1)** a conhecida capacidade de síntese de isoprenóides (Graugovel *et al.* 2007), uma classe de metabolitos secundários importante a nível biotecnológico (Mijts e Schmidt-Dannert 2003) e a síntese de uma grande variedade de lípidos (Lund *et al.* 2007). **2)** A produção e excreção de factores de virulência, como enzimas proteases (Faisal *et al.* 1999; Xue *et al.* 2006), que constituem um dos grandes grupos de enzimas industriais (Najafi *et al.* 2005), **3)** a capacidade de sobrevivência e proliferação numa variada gama de osmolaridades (La Peyre *et al.* 2006) e temperaturas, assim como a produção de proteínas “*heat shock*” (Tirard *et al.* 1997), as quais poderão ter aplicações médicas (Jindal 1996). **4)** O facto do

seu crescimento poder ser efectuado em sistemas *in vitro* num meio de cultura definido sem o suplemento de componentes do hospedeiro, **5)** a capacidade de ser transfectado (Fernández-Robledo *et al.* 2008) e **6)** não possuir qualquer patogenicidade para os humanos.

### **1.5. Objectivos**

Este estudo teve como objectivo principal extrair e caracterizar a quitina presente na parede celular do parasita *Perkinsus olseni*, e verificar o seu potencial de aproveitamento biotecnológico.

Com o intuito de cumprir este objectivo, foram delineadas quatro tarefas principais:

1. Optimizar a cultura de *P. olseni*, relativamente a aspectos fundamentais para o crescimento da cultura *in vitro*, nomeadamente o suplemento de FBS, a temperatura, osmolaridade e tipo de inóculo, e ainda o efeito do volume e agitação no crescimento em larga escala deste parasita.
2. Extracção da quitina presente na parede celular do *Perkinsus olseni*.
3. Caracterização da quitina extraída, através de espectroscopia de infravermelho, análise elementar, difracção de raios-x, <sup>13</sup>C RMN do estado sólido.
4. Estudo da biocompatibilidade da quitina extraída através da proliferação *in vitro* de culturas celulares de peixe e mamífero.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. Manutenção e Otimização da Cultura *In Vitro* de *Perkinsus olseni*

A cultura de *P. olseni* utilizada neste trabalho foi desenvolvida em colaboração com o laboratório do Prof. Vasta do Centro de Biotecnologia Marinha da Universidade de Maryland (USA) por Robledo *et al* a partir de amêijoas *Ruditapes decussatus* infectadas, recolhidas na Ria Formosa, Algarve, Portugal (Robledo *et al.* 2002). Esta cultura foi mantida em condições semelhantes à cultura de *Perkinsus marinus*, nomeadamente, DMEM/Ham's F12 (1:2) (Gibco, Invitrogen Corp.) dissolvido em água salgada artificial (Instant Ocean, Spectrum Brands Inc.) com uma osmolaridade final de 925 mmol/kg, em tampão Hepes 50 mM e carbonato de sódio 3,6 mM (Sigma Aldrich), suplementado com 5% de soro fetal bovino (FBS), 100 U/ml de penicilina G e sulfato de estreptomicina (Gibco, Invitrogen Corp.), a pH 6,6 e mantida numa incubadora (Sanyo MIR-135 Incubator) a 28°C sem adição de CO<sub>2</sub> (Gauthier J.D. e Vasta G.R., 1995; Robledo *et al.*, 2002). Neste trabalho, para a optimização da cultura de *P. olseni* foram testados vários parâmetros, como a temperatura, osmolaridade, suplemento de FBS e inóculo inicial.

### 2.2. Determinação do Crescimento de *P. olseni*

Vários métodos para determinação do crescimento celular *in vitro* de *Perkinsus* foram adaptados com sucesso (Gauthier J.D. e Vasta G.R., 1995). Um desses métodos, caracterizado pela sua simplicidade e rapidez, foi utilizado neste trabalho,

nomeadamente, a leitura da densidade óptica com um espectrofotómetro Helios  $\gamma$  (ThermoElectron Corp.) a 600 nm, calculada a partir da relação:

$$\text{OD}_{600} \times 16.8 - 0.7 = n^{\circ} \text{ células} \times 10^6/\text{ml}$$

**Equação. 1**

### **2.3. Extracção de Quitina**

A extracção da quitina presente em células de *P.olseni* foi feita através de dois métodos distintos, um com o solvente orgânico dimetilacetamida + 5% de cloreto de lítio (DMAC/LiCl 5%), no qual a quitina é solúvel, e o outro com um tratamento alcalino com variáveis de temperatura e concentração de NaOH, mantendo constante o tempo de reacção.

### **2.4. Caracterização da Quitina Extraída**

#### **2.4.1. Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)**

O espectro de infravermelho foi registado num espectrofotómetro Mattson Research Series 1. As amostras foram preparadas em cápsulas de KBr numa concentração de 2% (m/m), e os espectros foram obtidos com uma resolução de  $4 \text{ cm}^{-1}$ , num total de 10 varrimentos.

#### **2.4.2. Difraccão de raios-x**

Os difractogramas de raios-x da quitina foram obtidos num difractómetro PW1710-Philips com fenda da divergência automática e monocromador (Universidade do Minho), com varrimento entre 4 e 40°.

#### **2.4.3. <sup>13</sup>C-RMN no estado sólido**

O espectro de RMN de <sup>13</sup>C foi obtido num espectrómetro Bruker 400 MHz equipado com “cross-polarization and magic-angle-spinning”.

#### **2.4.4. Análise elementar**

As percentagens relativas de carbono, nitrogénio, hidrogénio e enxofre presentes na quitina extraída foram determinadas com um Carlo Erba Elementar Analyser E. A. 1108, e comparadas com quitina comercial (Sigma Aldrich).

#### **2.4.5. Quantificação de proteína**

A quantificação de proteína residual presente nas amostras de quitina, foi determinada após hidrólise destas com 3M de NaOH a 90°C durante 3h. O sobrenadante foi então utilizado para determinação da proteína através do método de Bradford segundo o protocolo *Bio-Rad Protein Assay* (Bio-Rad, Portugal). Para a recta de calibração foram utilizadas várias concentrações de albumina do soro bovino (BSA, Pierce), e a proteína representada como percentagem relativa ao peso inicial das amostras de quitina.

#### **2.4.6. Quantificação de acetilglucosamina**

A determinação de acetilglucosamina presente nas amostras de quitina, foi baseada num método de Morgan-Elson adaptado a microplacas (Bulik *et al.* 2003). Sucintamente, amostras de 25 mg de quitina foram suspensas em 100  $\mu$ l de tampão fosfato salino (PBS) pH 6.0, ao qual, foi adicionado 5  $\mu$ l de quitinase de *Trichoderma viride* (5 mg/ml em PBS) (Sigma Aldrich) e seguidamente incubadas a 37°C durante 24h. Após incubação, 10  $\mu$ l do sobrenadante foi adicionado a 10  $\mu$ l de borato de sódio pH 9 e aquecido a 99,9°C num termociclador (Biometra Trio-Thermoblock), durante 10 minutos. Logo após arrefecer até à temperatura ambiente, foram adicionados a cada amostra 100  $\mu$ l de solução DMAB (10g de *p*-dimetilaminobenzaldeído em 12,5 ml de ácido clorídrico fumante e 85.5 ml de ácido acético glacial) diluída 1:10 com ácido acético glacial. As amostras foram de seguida incubadas a 37°C durante 20 minutos. No final, foram transferidos 75  $\mu$ l de amostra para placas de 96 poços e a absorvância registada a 595 nm. Para a recta de calibração foram usadas várias concentrações de acetilglucosamina (Sigma Aldrich).

#### **2.5. Análise Estatística**

Neste trabalho os dados foram avaliados pela análise de variância (ANOVA) e a diferença de médias calculada pelo teste conservador de Tukey ( $\alpha = 0,05$ ). Para tal foi utilizado o software SigmaStat 3.5.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Otimização da Cultura *In Vitro* de *Perkinsus olseni*

Para a otimização da cultura de *P. olseni*, as células foram aclimatadas ao meio ou condição experimental durante 10 dias, após o qual as células foram lavadas com meio de cultura sem suplemento de FBS, e inóculadas em quadruplicado em frascos de cultura celular de 25 cm<sup>2</sup> (Sarstedt Lda) com 5 mL de meio experimental.

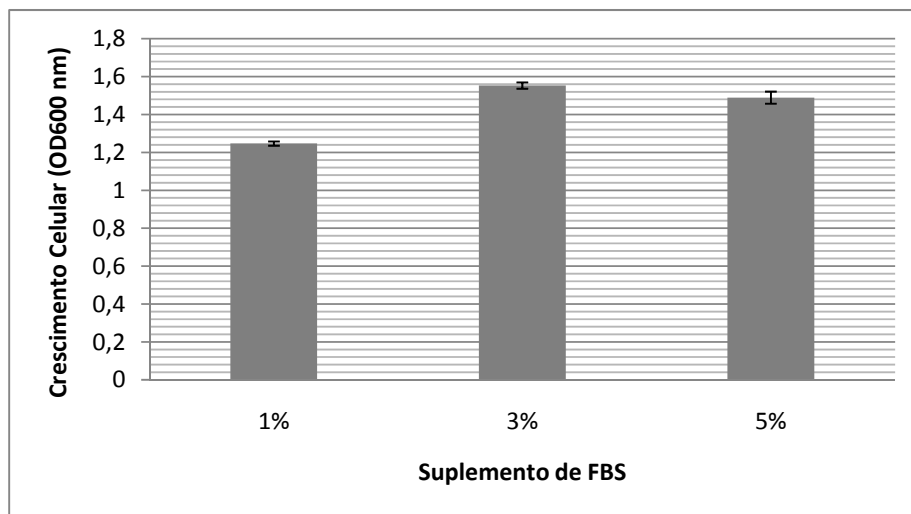
Após um período de incubação de 8 a 10 dias, foi determinado o crescimento celular obtido através de três leituras da densidade óptica a 600 nm (OD<sub>600</sub>) por cada frasco de cultura.

##### 3.1.1. Suplemento de FBS

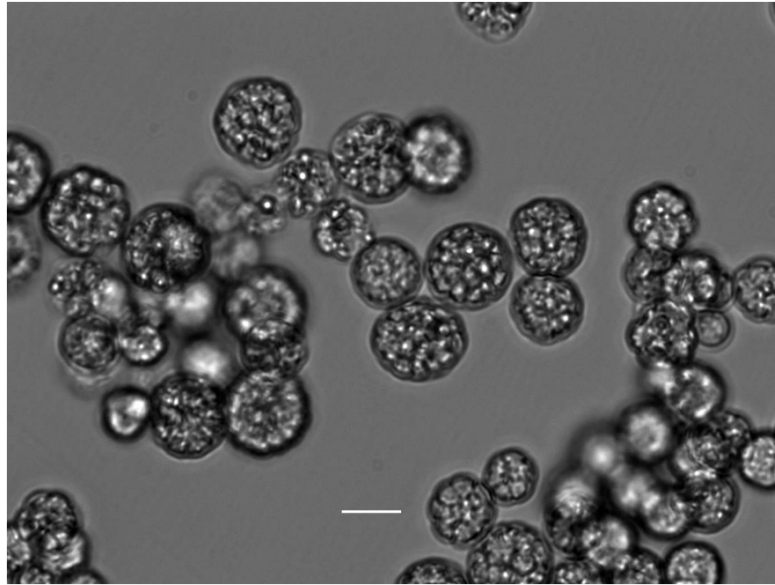
Foram testadas diferentes proporções de suplemento de FBS ao meio de cultura, nomeadamente 1, 3 e 5% no meio DMEM:Ham's F12 (1:2) em culturas com inóculo inicial igual a 0,2 unidades de OD<sub>600</sub> ( $\approx 2,7 \times 10^6$  células/ml) e incubadas durante 8 dias a 28°C. Após 8 dias, a cultura de *P. olseni* apresentou valores de crescimento celular elevados com os diferentes suplementos de FBS (Fig.3-1), no entanto, estes valores foram significativamente mais elevados com 3% de FBS relativamente às outras percentagens testadas ( $p < 0,05$ ). O suplemento com 5% apresentou um valor de crescimento aproximado mas mais baixo relativamente a 3%, mas significativamente mais elevado do que o suplemento de apenas 1% de FBS ( $p < 0,05$ ).

Esta cultura *in vitro* de *P. olsenii*, revelou um crescimento óptimo com um suplemento de apenas 3% de FBS, ao contrário de outras culturas deste parasita em que é requerido no mínimo 5% deste suplemento para um crescimento otimizado (La Peyre 1996).

A morfologia das células suplementadas com 3% e 5% de FBS permaneceu a mesma, ou seja, células individualizadas com tamanhos entre 4 e 10  $\mu\text{m}$ , e com alguns aglomerados de células resultantes da divisão celular. Pelo contrário, com um suplemento de 1%, a cultura celular apresentou características muito próprias, apresentando-se quase exclusivamente em aglomerados celulares (Fig. 3-2), apesar de manterem o tamanho usual.



**Figura 3-1.** Efeito do suplemento de FBS no crescimento (8 dias) *in vitro* de *P. olsenii*, com inóculo inicial de 0,2 unidades de OD<sub>600</sub> ( $\pm$  DesvPad, n = 4)

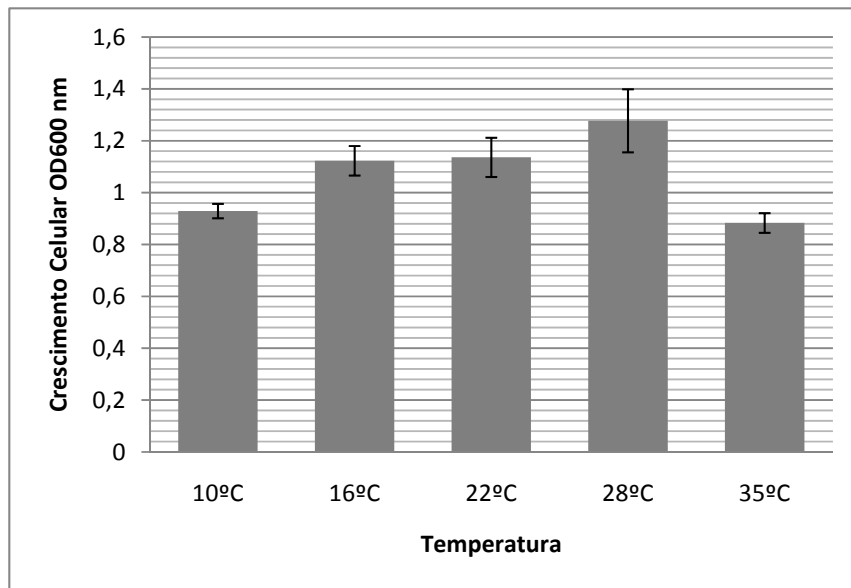


**Figura 3-2.** Cultura de *P. olseni* em meio DMEM:Ham's F12 (1:2), suplementado com 1% FBS, a 28°C e osmolaridade de 925 mmol/kg (ampliação x 4000). Barra = 15  $\mu$ m.

### 3.1.2. Temperatura

O efeito da temperatura no crescimento celular, foi determinado pela incubação durante 8 dias de culturas de *P. olseni* expostas a temperaturas de 10, 16, 22, 28 e 35°C em meio DMEM:Ham's F12 (1:2), suplementado com 5% FBS, com inóculo inicial igual a 0,1 unidades de OD<sub>600</sub> (Fig. 3-3).

Verificou-se um aumento do crescimento de *P. olseni* entre 10 e 28°C, sofrendo um decréscimo a 35°C para valores semelhantes obtidos à temperatura de 10°C. O crescimento mais elevado foi atingido entre as temperaturas de 16 e 28°C ( $p > 0,05$ ). Estes resultados mostram que existe uma tolerância relativa à temperatura no crescimento deste parasita entre os 16 e 28°C, muito semelhante à cultura de *P. olseni* obtida e caracterizada por Ordás e Figueras (1998).



**Figura 3-3.** Efeito da temperatura no crescimento (8 dias) *in vitro* de *P. olseni*, com inóculo inicial de 0,1 unidades de OD<sub>600</sub> ( $\pm$  DesvPad, n = 4)

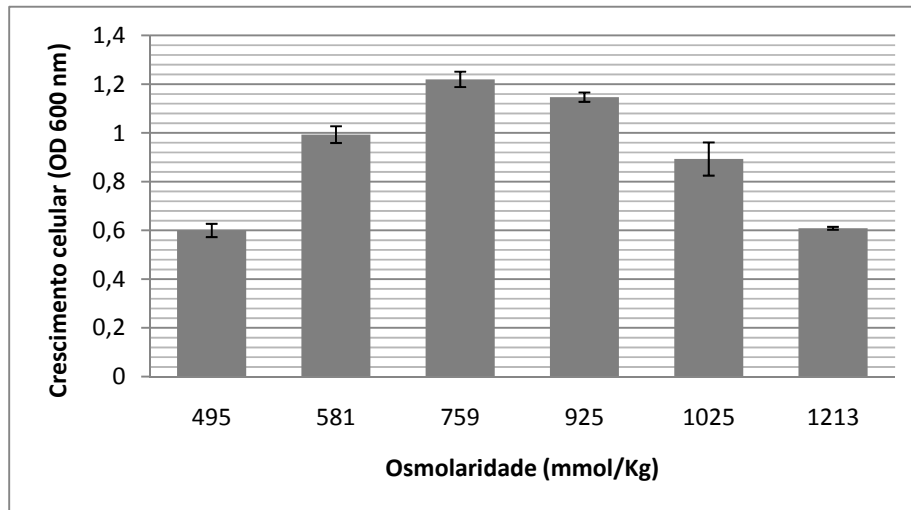
As diferentes condições de temperatura testadas não afectaram a morfologia das células de *Perkinsus olseni* relativamente à temperatura de 28°C, temperatura rotineiramente utilizada para crescimento *in vitro* deste parasita.

### 3.1.3. Osmolaridade

O efeito da osmolaridade do meio de cultura no crescimento celular *in vitro*, foi determinado através da incubação durante 8 dias, de culturas de *P. olseni* em meio DMEM:Ham's F12 (1:2), suplementado com 5% FBS, a 28°C, com as diferentes osmolaridades de 495, 581, 759, 925, 1025 e 1213 mmol/kg (osmómetro VAPRO 5520, Wescor, Inc.), e um inóculo inicial igual a 0,1 unidades de OD<sub>600</sub>.

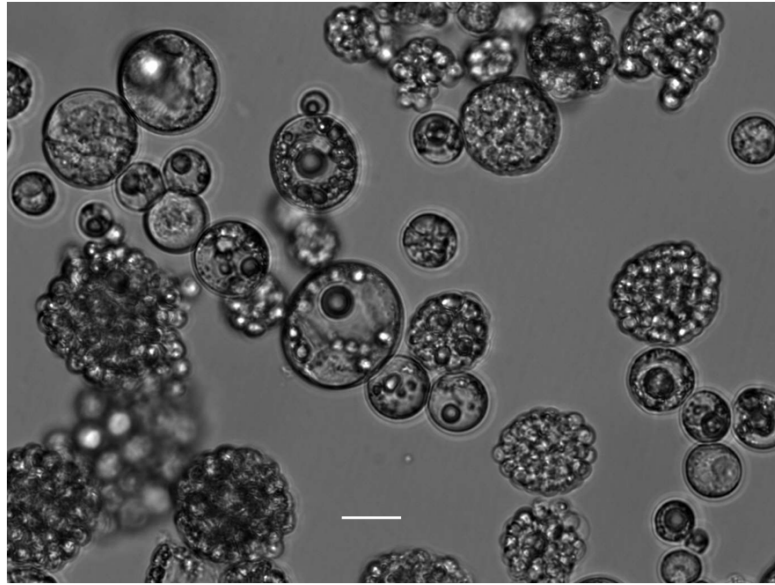
Os resultados obtidos revelaram que ocorreu crescimento celular de *P. olseni* em toda a gama de osmolaridades testadas (Fig. 3-4), atingindo os níveis mais elevados a 759

mmol/kg ( $\pm 25\%$  salinidade), aproximadamente o dobro do crescimento registado tanto a 495 mmol/Kg ( $\pm 16\%$  salinidade) como a 1213 mmol/Kg ( $\pm 40\%$  salinidade), o valor mais baixo e mais elevado de osmolaridade testado, respectivamente.



**Figura 3-4.** Efeito da osmolaridade do meio no crescimento (8 dias) *in vitro* de *P. olsenii*, com inóculo inicial de 0,1 unidades de OD<sub>600</sub> ( $\pm$  DesvPad, n = 4)

A morfologia das células foi afectada na cultura com meio de menor osmolaridade (495 mmol/kg), apresentando um tamanho médio celular superior (20-40  $\mu\text{m}$ ) ao das restantes condições testadas (Fig. 3-5). Resultados semelhantes de aumento celular a menores salinidades foram também observados por La Peyre *et al* (2006).



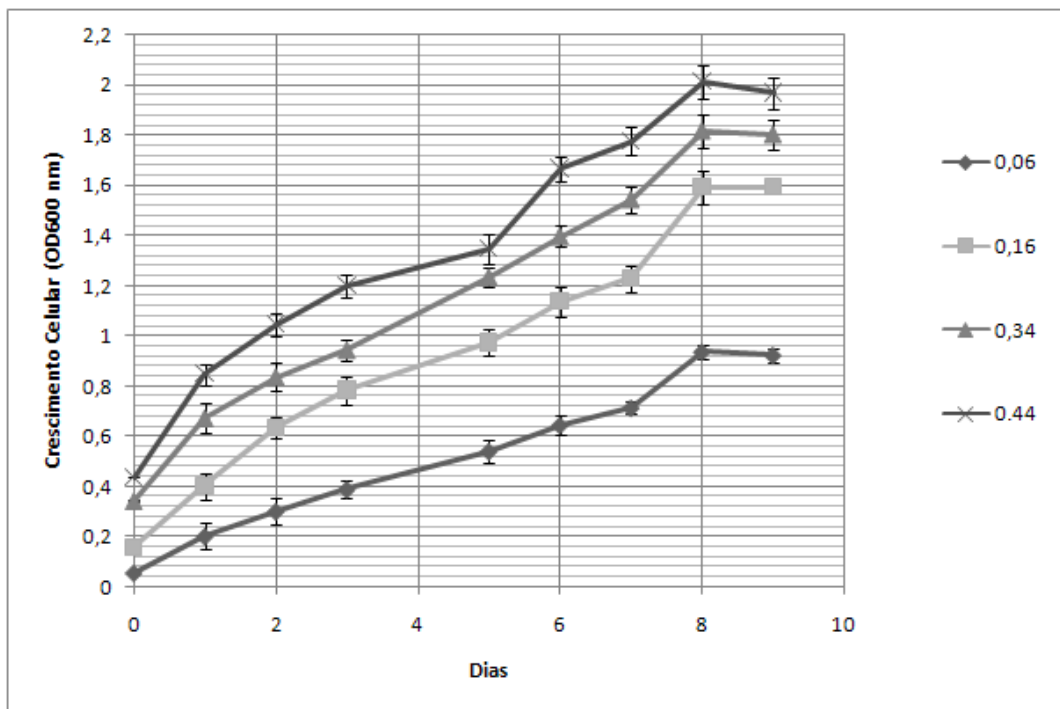
**Figura 3-5.** Cultura de *P. olseni* em meio DMEM:Ham's F12 (1:2), suplementado com 5% FBS, a 28°C e osmolaridade de 495 mmol/kg (ampliação x 4000). Barra = 15  $\mu$ m.

#### 3.1.4. Inóculo

Para a determinação do efeito do inóculo inicial no crescimento celular, foram efectuadas curvas de crescimento (9 dias) de *P. olseni* em meio de cultura com 4 inóculos iniciais diferentes, 0,06, 0,16, 0,34 e 0,44 unidades de OD<sub>600</sub>.

Os resultados obtidos, revelaram que o inóculo inicial influencia o crescimento final após 8 dias (Fig. 3-6), pois quanto maior o inóculo inicial maior o crescimento *in vitro* de *P. olseni*. A curva de crescimento com o inóculo mais elevado (0,44 OD<sub>600</sub>) apresentou um crescimento pouco acentuado até aos 5 dias, após o qual aumentou linearmente até aos 8 dias. Todas as outras curvas de crescimento apresentaram um aumento linear até aos 8 dias, após o qual, decresceram ou mantiveram-se em estado estacionário.

Estes resultados contrariam o estudo efectuado por Ordás e Figueras (1998) em *Perkinsus olseni* isolados na Galiza, Espanha, no qual o crescimento celular não depende do inóculo inicial, no entanto, vão ao encontro dos resultados obtidos por Gauthier e Vasta (1995) em *Perkinsus marinus*.



**Figura 3-6.** Efeito do inóculo inicial na curva de crescimento *in vitro* de *P. olseni*, antes da optimização do meio e condições de cultura ( $\pm$  DesvPad,  $n = 4$ )

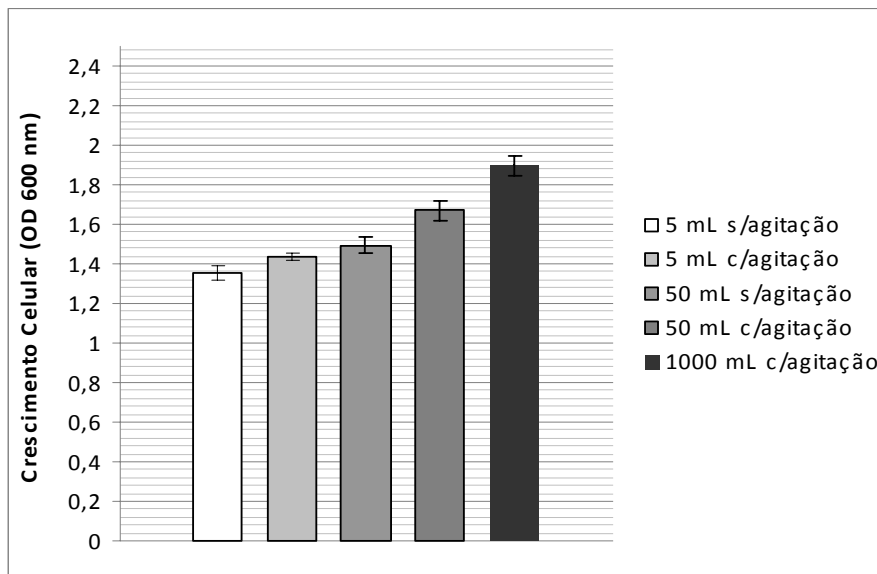
### 3.1.5. Cultura em larga escala

A capacidade de aumento de produção *in vitro* de *P. olseni*, foi determinada pelo crescimento durante 8 dias de um inóculo inicial de parasitas igual a 0,2 unidades de OD<sub>600</sub>, em frascos de cultura com 5 e 50 ml de meio com ou sem agitação (140 rpm) e garrafas com 1000 ml de meio com agitação (140 rpm).

Os resultados obtidos revelaram que, quer a agitação, quer o volume, são factores que influenciam o crescimento deste parasita (Fig. 3-7). No entanto, verificou-se que o efeito da agitação no crescimento em volumes pequenos (5 ml) não é significativo ( $p > 0,05$ ) e o efeito do crescimento em volumes maiores sem agitação (50 ml, sem agitação) é compensado pelo efeito da agitação em volumes menores (5 ml) ( $p > 0,05$ ).

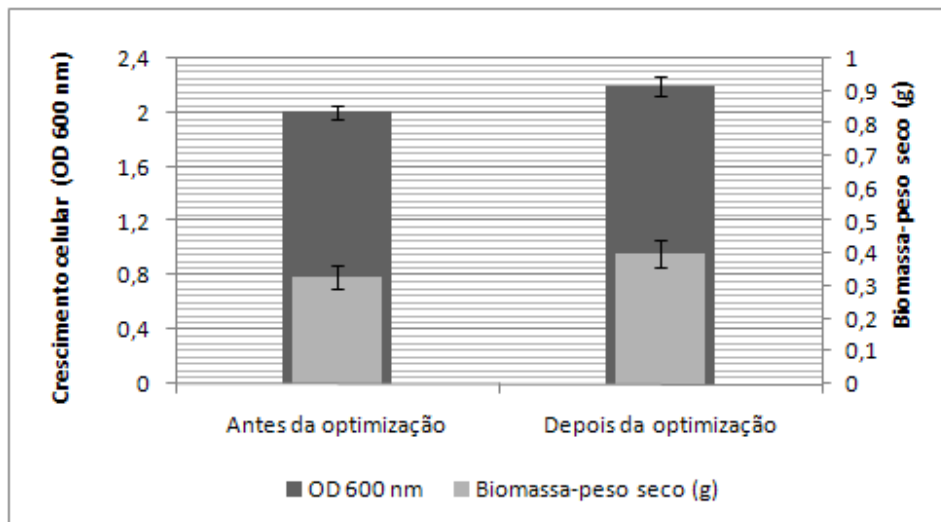
O efeito de cada uma das variáveis em separado parece ser semelhante, mas quando os dois factores foram considerados em simultâneo o efeito final no crescimento é maior do que o somatório dos resultados obtidos com cada um destes factores individualmente.

O crescimento de *P. olsenii* é portanto possível em larga escala com a ajuda de factores tais como a agitação a 140 rpm e um aumento de volume de cultura.



**Figura 3-7.** Efeito do volume e agitação na produção *in vitro* em larga escala de *P. olsenii*. Inóculo inicial de 0,2 unidades de OD<sub>600</sub> e agitação a 140 rpm ( $\pm$  DesvPad, n = 3).

Após testar todos os parâmetros de otimização, comparou-se o crescimento celular e a biomassa produzida antes (28 °C, 5% FBS e 925 mmol/Kg) e depois da otimização (28 °C, 3% FBS e 759 mmol/Kg), ambos com um inóculo inicial de 0,4 de densidade óptica (OD<sub>600</sub>), a 140 rpm e 1000 ml de volume. Os resultados obtidos (Fig. 3-8) revelaram um aumento significativo do crescimento celular ( $p < 0,05$ ), obtendo-se um aumento de cerca de 9% depois da otimização. Ao mesmo tempo, houve um aumento médio da biomassa, apesar de este não ser significativo ( $p > 0,05$ ), com uma produtividade média de 0,0021g/L/h.



**Figura 3-8.** Crescimento celular e biomassa (peso seco), antes e depois da otimização da cultura *in vitro* de *P. olsenii* ( $\pm$  DesvPad, n = 3)

### 3.2. Extração de Quitina

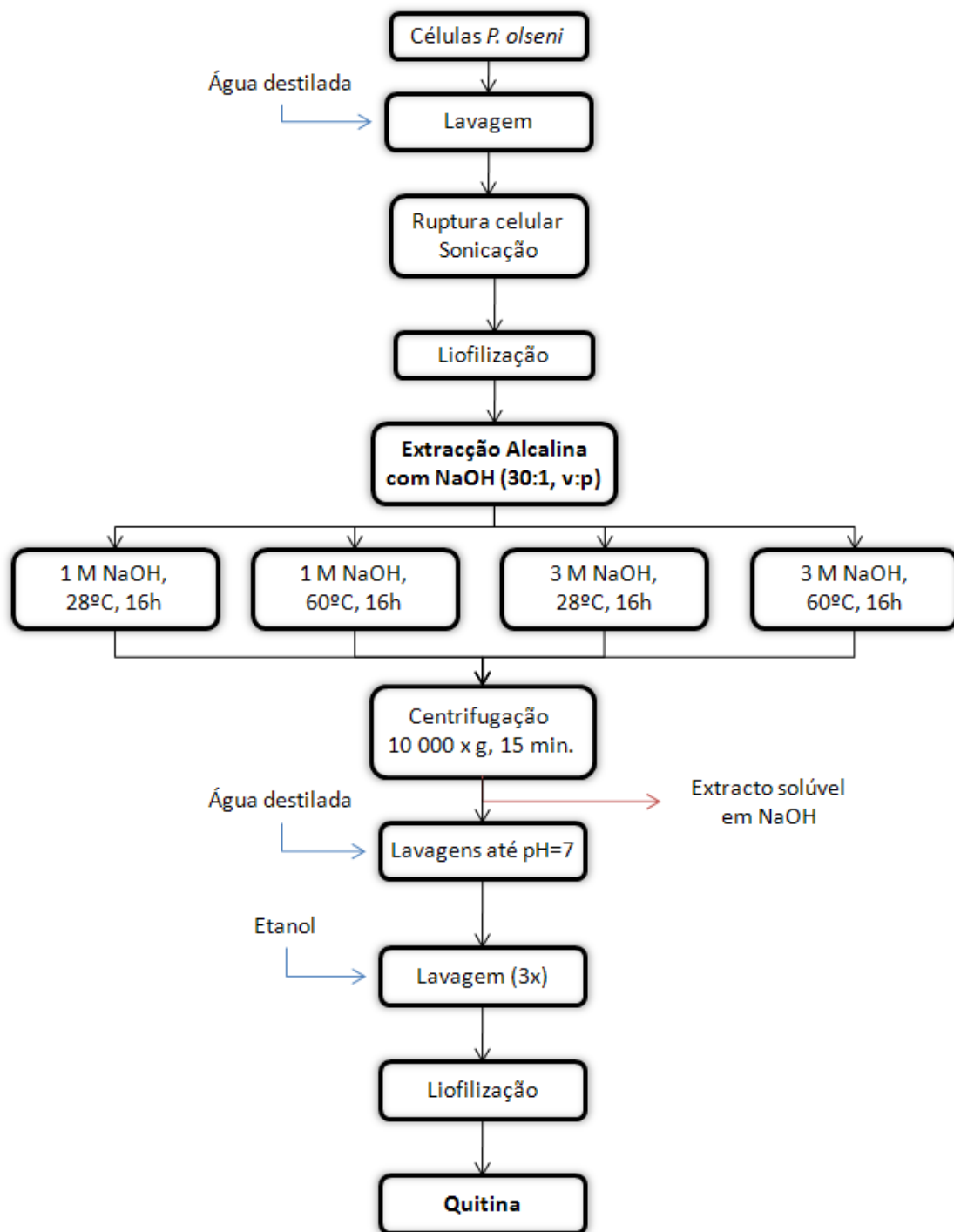
Na extração da quitina presente no *P. olsenii* foram utilizados dois métodos distintos, um alcalino e um outro com solvente orgânico.

A extracção alcalina de quitina representada esquematicamente na figura 3-9, envolveu uma desproteínização com NaOH, a diferentes temperaturas durante 16h, seguida de uma neutralização com água destilada e posterior lavagem com etanol.

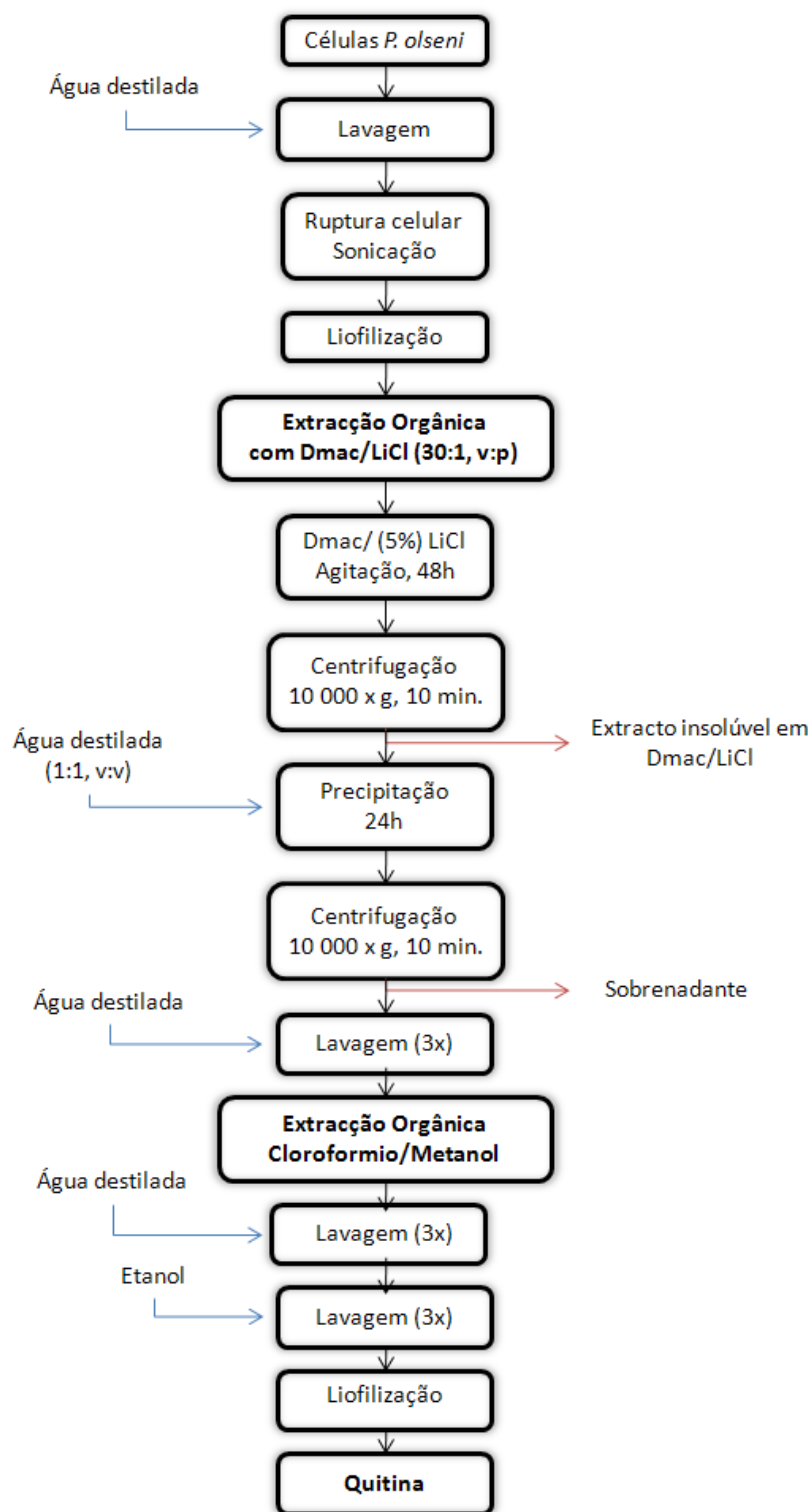
A extracção com o solvente orgânico, de acordo com o esquema da figura 3-10, foi caracterizada por uma solubilização em DMAC/5%LiCl e posterior precipitação com água destilada, seguida de uma extracção com clorofórmio/metanol para retirar os lípidos contaminantes, sendo o produto final submetido a várias lavagens com água destilada e etanol.

No final de cada extracção o produto obtido foi liofilizado (Braun Christ Alfa 1-4), pesado e quantificado em termos percentuais relativamente ao peso seco das células homogenizadas (Tab. III).

Ao observar os resultados obtidos, verificou-se uma grande discrepância entre os dois métodos utilizados, pois a quantidade obtida pelo método do solvente orgânico (DMAC/5%LiCl), com cerca de 25% relativamente à biomassa inicial foi muito superior ao do método alcalino (NaOH), com quantidades que variaram dos 2 até aos 10% conforme o processo utilizado.



**Figura 3-9.** Representação esquemática da extracção de quitina de *P. olseni* pelo método alcalino.



**Figura 3-10.** Representação esquemática da extracção de quitina de *P. olseni* pelo método de solvente orgânico

Na extracção alcalina a quantidade de produto final obtido variou com as condições de extracção testadas, com resultados semelhantes a 1M de NaOH independentemente da temperatura e a 3M de NaOH a 28°C ( $p > 0,05$ ). Por outro lado, em condições de 3M de NaOH a 60°C, a quantidade de quitina isolada foi a mais baixa de todos os processos de extracção, com apenas 2% de produto final.

**Tabela III.** Percentagem do produto obtido em cada um dos processos de extracção relativamente ao peso seco inicial das células homogenizadas.

<b>Processo de Extracção</b>	<b>Produto final (%)<sup>a</sup></b>
1 M NaOH, 28°C	9,4 ± 0,95
1 M NaOH, 60°C	8 ± 0,79
3 M NaOH, 28°C	7,8 ± 0,12
3 M NaOH, 60°C	2,1 ± 0,21
DMAC/LiCl	25,4 ± 1,3

<sup>a</sup> Valores Médios ± desvio padrão (n = 3).

### **3.3. Caracterização da Quitina Isolada de *P. olseni***

#### **3.3.1 Análise por espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier**

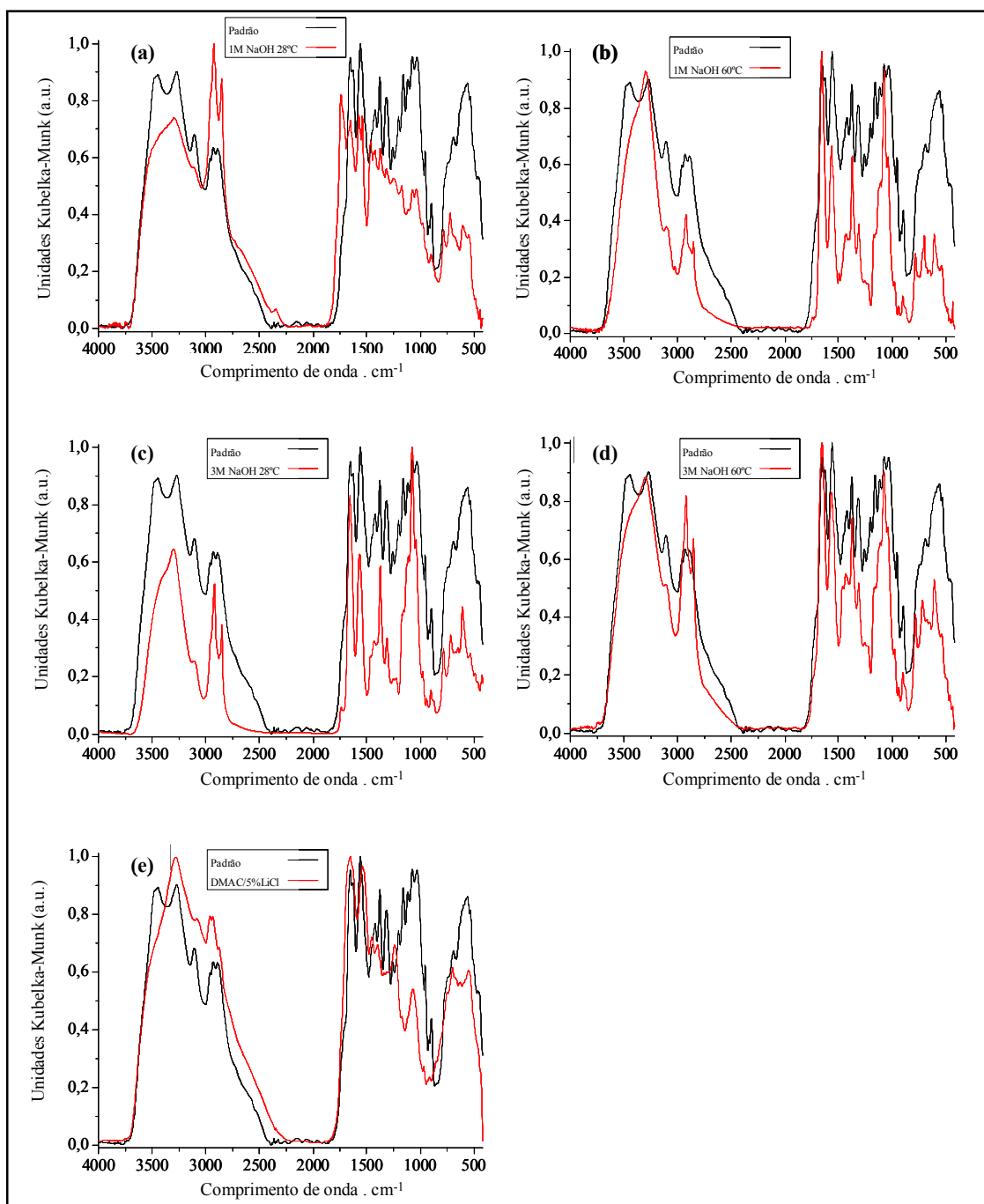
A análise por espectroscopia de infravermelhos foi utilizada para uma caracterização inicial da quitina extraída pelos diferentes métodos utilizados.

A quitina comercial (Sigma) usada como padrão, apresentou um espectro característico das quitinas (Fig. 3-11), com absorvâncias típicas em 3447  $\text{cm}^{-1}$ , correspondente às pontes de hidrogénio intramoleculares O(3)H---O(5) do anel, 3272 e 3108  $\text{cm}^{-1}$ ,

característicos do grupo NH da amida, 1653 e 1625  $\text{cm}^{-1}$ , típicas das vibrações da amida I ( $\nu\text{C=O}$ ), 1559  $\text{cm}^{-1}$ , correspondente à vibração da amida II ( $\delta\text{NH}$  amida II) e a banda 1377  $\text{cm}^{-1}$ , relativa à deformação simétrica de  $-\text{CH}_3$  (ver anexo I).

Os espectros obtidos para a quitina extraída de *P. olseni* variaram segundo o método de extração (Fig. 3-11), mas todos eles apresentaram absorvâncias típicas de quitina, revelando, no entanto, discrepâncias de intensidade e posição de algumas bandas de absorção, tanto em relação ao padrão como também entre as diferentes amostras. Destacaram-se em todas as amostras a presença de uma fraca resolução de absorção a 3447  $\text{cm}^{-1}$  ( $\nu\text{OH}$ ) e a existência de apenas uma absorvância relativa à amida I (1653  $\text{cm}^{-1}$ ), comparativamente à quitina comercial usada como padrão (ver anexo I).

O espectro da quitina extraída com 1M de NaOH a 28°C (Fig. 3-11, **(a)**), revelou uma clara contaminação na amostra através da presença de uma absorvância a 1733  $\text{cm}^{-1}$ , característica dos grupos carboxílicos, e também pela intensidade muito elevada das absorvâncias entre 2750 e 3000  $\text{cm}^{-1}$ , características de grupos  $-\text{CH}$ ,  $-\text{CH}_2$  e  $-\text{CH}_3$ . As bandas na região de 1600-600  $\text{cm}^{-1}$  nesta amostra revelam diferenças de intensidade e localização relativamente à amostra de quitina comercial. Estes elementos deixaram de ser observados quando a extração foi efectuada em condições mais extremas, quer de temperatura, quer de concentração de NaOH (Fig. 3-11, **(b)**, **(c)** e **(d)**) (ver anexo I).



**Figura 3-11.** Espectros de FTIR de quitina comercial (Sigma Aldrich) e amostras de quitina de *P. olsenii* extraídas por diferentes métodos: (a) 1M NaOH a 28°C; (b) 1M NaOH a 60°C; (c) 3M NaOH a 28°C; (d) 3M NaOH a 60°C e (e) extração com DMAC/5% LiCl.

Os espectros das restantes amostras de quitina de *P. olsenii* extraídas por métodos alcalinos (Fig. 3-11, **(b)**, **(c)** e **(d)**) são muito semelhantes entre si e a quitina comercial, variando apenas na intensidade das absorções (ver anexo I).

O espectro obtido para a amostra de quitina extraída com Dimetilacetamida/5% LiCl (Fig. 3-11, **(e)**) revelou a presença das bandas de absorção a 1653 e 1556  $\text{cm}^{-1}$  típicas de uma amostra de quitina, observando-se no entanto uma ausência de absorção a 1316 e 1036  $\text{cm}^{-1}$  e uma banda muito fraca em 1074  $\text{cm}^{-1}$  (ver anexo I). Estes resultados parecem indicar que estamos na presença de uma amostra de quitina não totalmente purificada.

Após análise dos espectros obtidos para as diferentes amostras de quitina extraídas de *P. olsenii*, decidiu-se continuar a caracterização de apenas duas amostras de quitina: (i) uma obtida pelo método alcalino (3M NaOH a 60°C), e designada por **qAlc**, sendo a sua escolha baseada na semelhança com a quitina comercial. (ii) A outra amostra obtida foi a extraída com DMAC/5%LiCl (**qDMAC**), apesar da evidência de não ser uma amostra completamente pura, foi seleccionada por ser a extracção menos agressiva, possibilitando a caracterização de compostos agregados à quitina presente em *Perkinsus olsenii*.

### 3.3.2. Análise elementar

Com o intuito de verificar a composição elementar das amostras de quitina, foi quantificado percentualmente o carbono, o nitrogénio, o hidrogénio e o enxofre presentes na quitina comercial, nas amostras qAlc e qDMAC. Estas foram depois comparadas com os valores teóricos para uma amostra de quitina totalmente acetilada (Tab. IV).

Os valores obtidos para a amostra qAlc foram bastante semelhantes aos obtidos para a quitina comercial. O conteúdo em nitrogénio, tanto da quitina comercial como da amostra

qAlc, foram mais baixos do que os valores teóricos para uma quitina totalmente acetilada. Como o nível de nitrogénio nas amostras é também indicador de proteínas residuais, o valor experimental destas duas amostras implica uma quantidade mínima ainda presente. No entanto obteve-se 1% de enxofre presente na amostra de quitina comercial, o que parece indicar algumas contaminações. Por outro lado a amostra de quitina qDMAC revelou valores de carbono e nitrogénio bastante mais elevados que os valores teóricos, indicando uma forte presença de outros compostos.

**Tabela IV.** Valores das percentagens de carbono, nitrogénio, hidrogénio e enxofre presentes na quitina comercial e na quitina isolada de *P. olsenii*.

Quitina	C%	N%	H%	S%
<b>Merck index <sup>a</sup></b>	47,29	6,89	6,45	0,00
<b>Comercial</b>	44,30	6,09	6,80	0,97
<b><i>P. olsenii</i> qDMAC</b>	49,45	11,49	7,88	0,44
<b><i>P. olsenii</i> qAlc</b>	44,60	5,43	7,80	0,00

<sup>a</sup> Valores teóricos dado pelo Merck index para uma quitina totalmente acetilada

### 3.3.3. Quantificação de proteína e acetilglucosamina

A quantificação da proteína residual presente nas amostras de quitina revelou que ambas as amostras possuíam uma percentagem de proteínas igual ou inferior a 6%. A amostra qDMAC, com uma percentagem de proteína de 5,75%, foi a que apresentou os níveis mais elevados, seguida da amostra qAlc com 0,76%, e por último a quitina comercial com 0,46% (Tab.V).

Os resultados mostram que a extracção de qAlc é eficiente na remoção das proteínas presentes na parede celular do parasita *P. olsenii*. Por outro lado o solvente orgânico

dimetilacetamida apresentou uma grande capacidade de solubilizar proteínas em conjunto com a quitina.

**Tabela V.** Percentagem de proteína e monossacarídeos de acetilglucosamina presentes em cada uma das amostras de quitina.

Quitina	Proteínas residuais (%) <sup>a</sup>	Acetilglucosamina (%) <sup>a</sup>
Comercial	0,46 ± 0,02	12 ± 0,10
<i>P. olsenii</i> qDMAC	5,75 ± 0,09	0,9 ± 0,06
<i>P. olsenii</i> qAlc	0,76 ± 0,05	1,2 ± 0,01

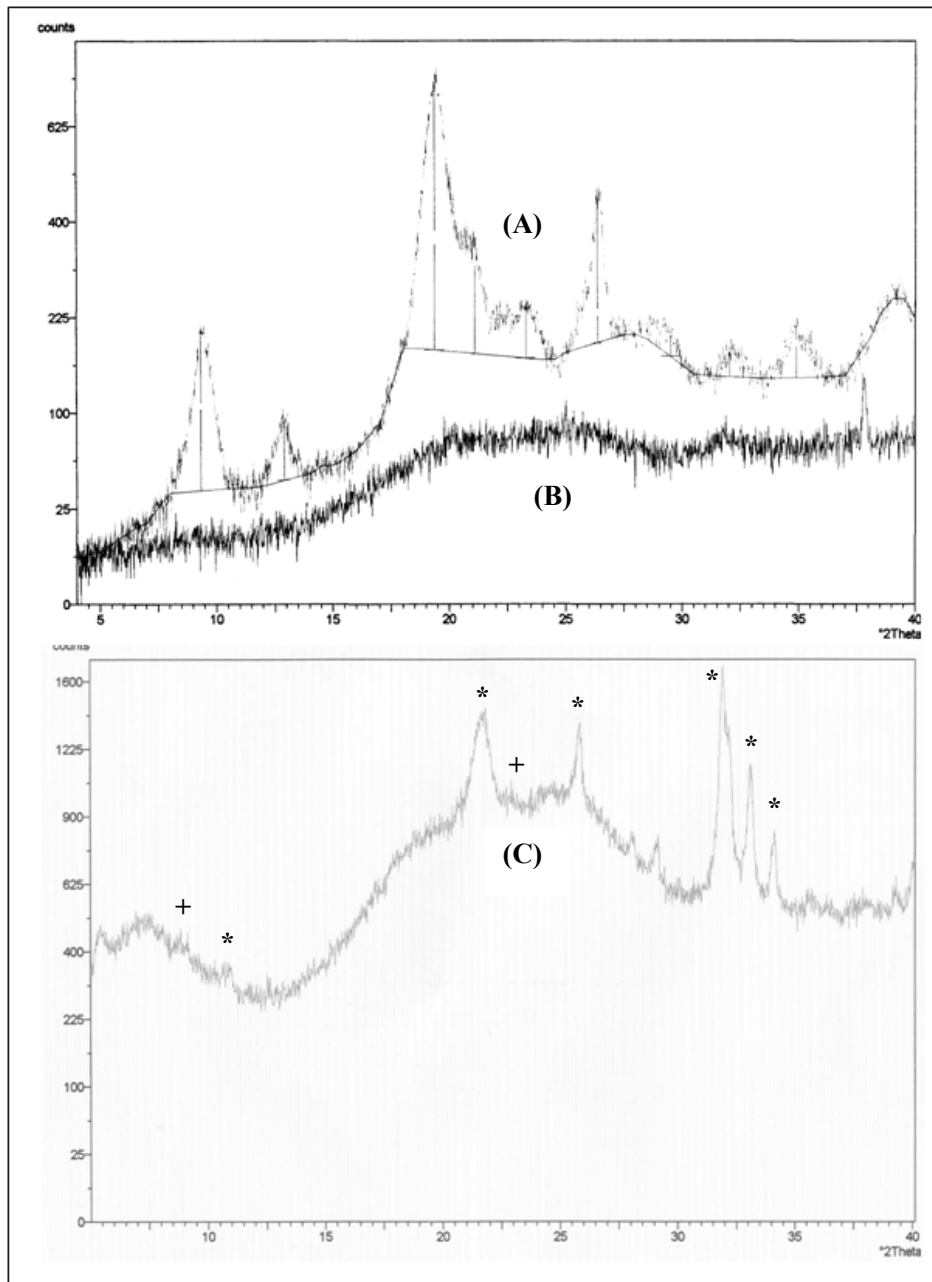
<sup>a</sup> Valores Médios ± desvio padrão (n = 3).

Os resultados obtidos relativamente ao conteúdo de acetilglucosamina, após hidrólise das amostras de quitina isolada de *P. olsenii* com quitinase, foram muito baixos em comparação com os obtidos para a quitina comercial (Tab. V), provavelmente devido a um impedimento da ligação da enzima ao substrato por parte de outros compostos, ligados de forma covalente à quitina presente nas amostras.

### 3.3.5 Análise por difracção de raios-x

A difracção de raios-x é usada para determinar o espaçamento entre os átomos de um composto cristalino, pois quando um feixe de raios-x atinge a superfície de um cristal num determinado ângulo  $\theta$ , uma parte é dispersa em função dos espaçamentos regulares interatómicos, os quais, são usados para determinar a estrutura do composto (Braun 1987; Skoog *et al.* 1998).

Esta técnica tem sido utilizada para determinar o grau de cristalinidade dos polímeros de quitina (Webster *et al.* 2006), assim como para distinguir os diferentes tipos de quitina ( $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ ) (Cárdenas *et al.* 2004; Jang *et al.* 2004).



**Figura 3-12.** Difratogramas de raios-x das amostras: (A) quitina comercial; (B) *P. olseni* qDMAC; (C) *P. olseni* qAlc. (\*: hidroxiapatite; +: quitina).

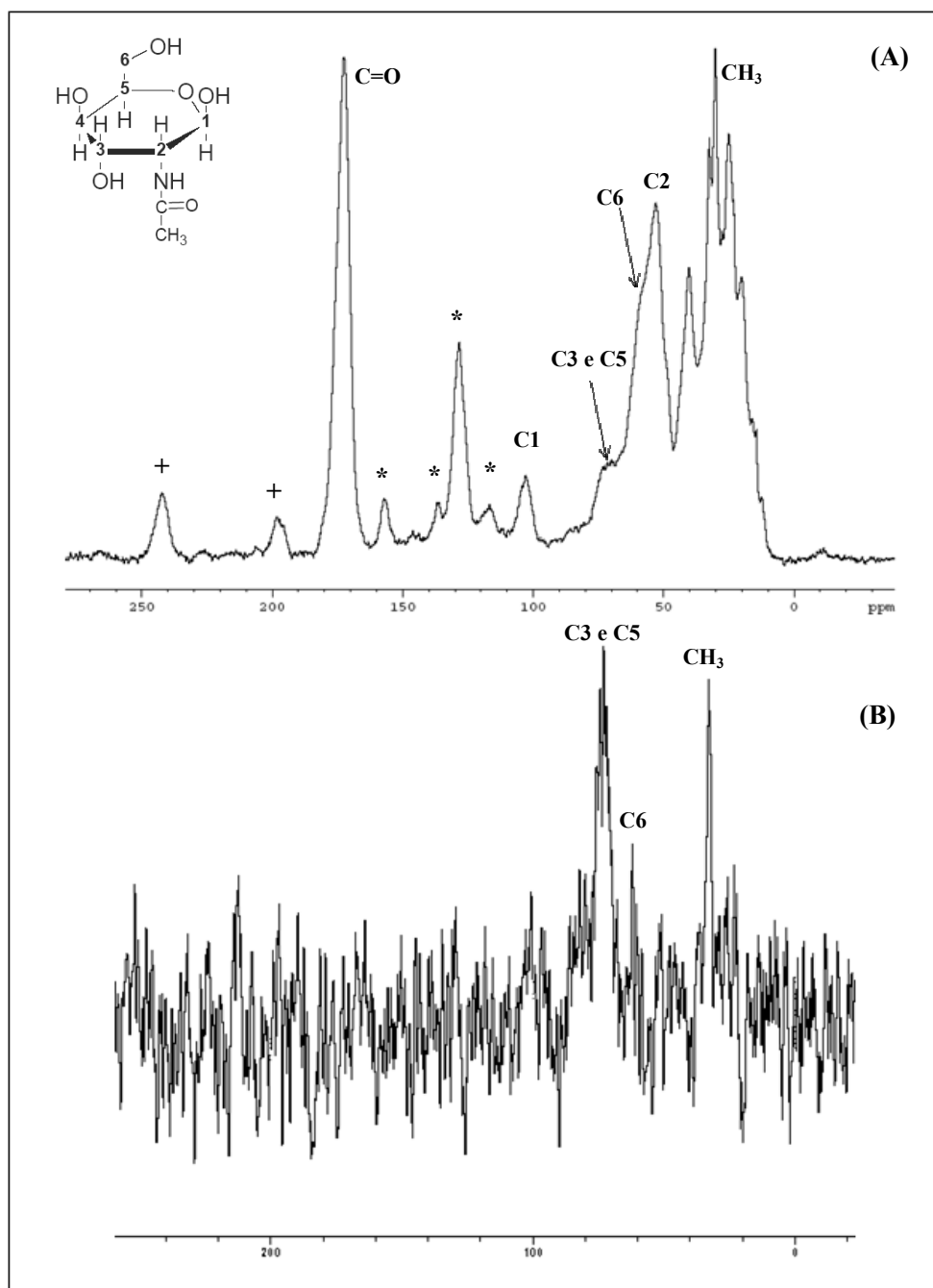
O difratograma de raios-x da amostra qDMAC de *P. olseni* (Fig. 3-12, (B)), revelou a total ausência de cristalinidade comparada com a amostra de quitina comercial (Fig. 3-12,

(A)), que apresentou as quatro principais dispersões típicas de  $\alpha$ -quitina (9.4, 19.2, 21.1 e 23.2°). A amostra qDMAC revelou assim ser de natureza amorfa sem qualquer estrutura regular rígida.

O perfil de raios-x obtido para a amostra qAlc (Fig. 3-12, (C)) apresentou diferenças significativas em relação à amostra qDMAC, revelando a existência de uma maior cristalinidade. No entanto, esta parece ser devida à presença de hidroxiapatite, um composto que não se encontra referenciado como constituinte da parede celular do parasita *P. olsenii*, e como tal considerado um contaminante na amostra. Por outro lado, as dispersões típicas de quitina encontram-se muito fracas ou inexistentes, confirmando os resultados obtidos na amostra qDMAC em que a amostra de quitina apresentou características amorfas.

### 3.3.6. Análise por $^{13}\text{C}$ RMN do estado sólido

A técnica de  $^{13}\text{C}$  RMN do estado sólido é conhecida pela sua sensibilidade a mudanças relativas à ordem estrutural de um composto e tem sido utilizada para identificação e caracterização da quitina (Jang *et al.* 2004). No espectro da amostra qDMAC (Fig. 3-13, (A)) foram obtidos a maior parte dos picos característicos da quitina (Tab. VI), no entanto os carbonos C2, C3 e C5 apenas apareceram como pequenos “ombros” e o carbono C4 praticamente não foi detectado, uma indicação da amorficidade da amostra.



**Figura 3.13.** Espectros de  $^{13}\text{C}$  RMN em estado sólido das amostras: (A) *P. olseni* qDMAC e (B) *P. olseni* qAlc. (\*: sinais típicos de carbonos aromáticos; +: artefactos da rotação da amostra).

O sinal obtido para o carbono do grupo carbonilo foi mais forte do que o esperado, uma indicação da presença de outros compostos com grupos carbonilo para além da quitina, tais como proteínas e lípidos.

Para além do grupo carbonilo, outros dos picos obtidos foram também indicadores da presença de compostos adicionais na amostra, nomeadamente carbonos aromáticos.

**Tabela VI.** Sinais de  $^{13}\text{C}$  RMN do estado sólido obtidos para a quitina de caranguejo, qDMAC e qAlc.

	Quitina de Caranguejo <sup>a</sup>	qDMAC	qAlc
C=O	172,6	172,6	ND
C1	103,9	103,8	ND
C2	54,5	52,5	ND
C3	72,9	72	72,5
C4	82,7	ND	ND
C5	75,4	72	72,9
C6	60,4	ND	60,5
CH <sub>3</sub>	22,5	24,4	26,3

<sup>a</sup> Valores publicados por Jang *et al.* 2004

ND: Não determinado

O espectro obtido para a amostra qAlc (Fig. 3-13, **(B)**) foi bastante diferente do obtido na amostra qDMAC, apresentando uma enorme falta de resolução devido a uma grande mobilidade molecular, que deverá estar relacionada com uma desorganização estrutural. No entanto, alguns sinais destacaram-se, aparentemente relativos aos carbonos C3, C5, C6 e ao grupo metilo (Tab. VI).

#### 4. DISCUSSÃO

Existem várias metodologias para a cultura *in vitro* do protozoário marinho *Perkinsus*, todas elas com capacidade de propagação deste parasita semelhante à que ocorre no hospedeiro, existindo no entanto diferenças significativas na composição nutritiva e parâmetros de cultura.

Existem dois tipos de meios nutritivos utilizados na cultura de *Perkinsus*: um deles é formulado para mimetizar a composição do plasma de ostra e designado por JL-ODRP, enquanto o outro tipo é baseado em meios comerciais como o DME:Ham's F-12 (Gauthier e Vasta 1995), Leibovitz's L-15 (Kleinschuster e Swink 1993), NCTC-135 e RPMI-1640 (Dungan e Hamilton 1995), suplementados com diferentes concentrações de FBS ou em alternativa com fetuína (Gauthier *et al.* 1995).

Neste estudo optou-se pela utilização de meio de cultura do tipo comercial (DME:Ham's F-12 1:2) pela facilidade de preparação e menor variação da composição entre dois lotes diferentes. A escolha do meio DME:Ham's F-12 (1:2) em detrimento dos outros tipos de meio comercial, foi feita com base em estudos anteriores, que revelaram um crescimento mais elevado de *Perkinsus marinus* neste tipo de meio (Dungan e Hamilton 1995) e nesta proporção (Gauthier e Vasta 1995).

A optimização do crescimento da cultura de *P. olsenii* levada a cabo neste trabalho, incidiu assim sobre as condições de cultura em meio DME:Ham's F-12 (1:2), em particular o suplemento de FBS, a temperatura, osmolaridade e efeito do inóculo inicial. Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram que o crescimento *in vitro* da cultura de *P. olsenii* isolada de bivalves da Ria Formosa (Algarve, Portugal) (Robledo *et al.*

2002), é otimizado com um suplemento de apenas 3% de FBS, a uma temperatura de 28°C e com uma osmolaridade de cerca de 760 mmol/kg ( $\pm$  26‰ salinidade).

Ao contrário de estudos efectuados anteriormente em *P. marinus* (Gauthier e Vasta 1995), o crescimento de *P. olsenii* foi mais elevado com suplemento de FBS inferior a 5%, revelando por isso um menor requerimento nutritivo ou de factores de crescimento encontrados no soro fetal bovino. Este resultado revela que esta cultura de *P. olsenii* apresenta a vantagem de manter os níveis de crescimento elevados com um menor suplemento o que diminui os custos de propagação deste microorganismo e reduz os problemas associados ao uso desta mistura nutritiva complexa, como durante o isolamento e identificação de compostos sintetizados por este parasita.

O estudo do efeito da temperatura no crescimento da cultura de *P. olsenii* demonstrou que este parasita é bastante tolerante à temperatura, pelo facto de a sua propagação ser possível em temperaturas que vão desde os 10 até aos 35°C, com um crescimento máximo a 28°C, estes resultados vão ao encontro dos obtidos para outra cultura *in vitro* de *P. olsenii* isolado no norte de Espanha por Ordás e Figueras (1998), e a cultura de *P. marinus* estudada por Dungan e Hamilton (1995), apresentando no entanto maior tolerância que a cultura de *P. marinus* isolada por Gauthier e Vasta (1995) que revelou um decréscimo acentuado de propagação a temperaturas inferiores a 20°C, apesar da temperatura óptima ser a mesma. Esta tolerância *in vitro* parece reflectir a tolerância *in vivo*, já que as temperaturas da água na região da Ria Formosa, apresentam valores que variam de 16 a 19°C no Inverno e entre 18 e 28°C nos meses de Verão (Newton e Mudge 2003), confirmando a maior incidência de infecção nos meses de Verão os quais apresentam temperaturas ideais para a proliferação do parasita *P. olsenii*. Também as

relativamente elevadas temperaturas no Inverno nesta região podem explicar a prevalência de infecções mesmo que em níveis muito baixos (Leite *et al.* 2004).

A osmolaridade revelou-se um dos factores mais críticos na propagação de *P. olseni*, já que apesar desta ocorrer em toda a gama de osmolaridades testadas (495-1213 mmol/kg), a sua proliferação sofreu um decréscimo para metade em osmolaridades de 495( $\pm$  17‰ salinidade) e 1213 mmol/kg ( $\pm$  40‰ salinidade) relativamente ao valor óptimo de 756 mmol/kg ( $\pm$  26‰ salinidade). Estes resultados estão de acordo com os obtidos por La Peyre *et al.* (2006) em que o crescimento da cultura de *P. olseni* diminuiu drasticamente tanto a 15‰ de salinidade como a 35‰, enquanto o seu crescimento era óptimo a 25‰ de salinidade. No entanto difere dos resultados obtidos para a cultura de *P. olseni* isolado por Ordás e Figueras (1998) a qual obteve níveis de crescimento semelhantes entre os 15 e 40‰ de salinidade. Em estudos com culturas *in vitro* de *P. marinus* a salinidade óptima variou entre 17 e 34‰ (Dungan e Hamilton 1995), 18 e 36‰ (Gauthier e Vasta 1995) e entre 15 e 35‰ (La Peyre *et al.* 2006).

A cultura de *Perkinsus olseni* isolada de amêijoas oriundas da Ria Formosa (Algarve, Portugal) e utilizada neste trabalho apresentou uma menor tolerância osmótica que a cultura de *P. olseni* isolada de amêijoas oriundas da Ria de Pontevedra (Galiza, Espanha), o que é de algum modo imprevisível pelo facto de que ambas as regiões possuem valores de salinidade relativamente semelhantes, sendo provável uma adaptação a condições de cultura *in vitro*, pois a cultura de *P. olseni* utilizada neste estudo foi iniciada e mantida em condições de osmolaridade de cerca de 925 mmol/kg (Robledo *et al.* 2002), ou uma adaptação local *in vivo*, já que esta espécie de *Perkinsus* se encontra bastante dissiminada em várias partes do mundo, afectando diferentes bivalves.

Verificou-se também que o inóculo inicial apresentou uma correlação positiva com a densidade final de células de *P. olseni*, apesar de diminuir ao mesmo tempo a taxa específica de crescimento ao longo dos oito dias que demorou a cultura a atingir a fase estacionária. A proliferação deste parasita parece ser assim afectada pelo meio condicionado e/ou as interacções intercelulares. Resultados semelhantes foram obtidos por Gauthier e Vasta (1995) para a espécie *P. marinus*, mas por outro lado Ordás e Figueras (1998) não observaram qualquer efeito do inóculo na densidade final do *P. olseni* isolado em Espanha, provavelmente por terem testado apenas inóculos iniciais extremamente baixos e muito semelhantes (OD = 0.042 e 0.048).

A cultura *in vitro* de *P. olseni*, após optimização, apresentou características morfológicas semelhantes às células presentes no hospedeiro, nomeadamente células no estadio trofozóide de dimensões entre os 4 e os 10  $\mu\text{m}$  e células no estadio esquizonte (células em divisão). Na optimização da cultura *in vitro* de *P. olseni* verificou-se que tanto a osmolaridade como o suplemento de FBS revelaram ter efeitos na morfologia celular para além dos efeitos na proliferação, nomeadamente na osmolaridade mais baixa testada (495 mmol/kg), onde as células apresentaram dimensões bastante superiores (20 a 40  $\mu\text{m}$ ) às apresentadas em condições mais elevadas de osmolaridade. Esta adaptação poderá ser uma resposta ao stress osmótico, e foi verificada em outros estudos de *P. olseni* (La Peyre 1996; La Peyre *et al.* 2006). As culturas *in vitro* suplementadas com 1% de FBS, a percentagem mais baixa testada, apresentavam-se quase exclusivamente em aglomerados celulares, mantendo no entanto as dimensões normais. Este fenómeno poderá ser uma consequência da falta de algum dos componentes constituintes do soro fetal bovino responsável por uma resposta membranar, muito provavelmente a glicoproteína fetuína

que demonstrou ser importante para a proliferação de *Perkinsus marinus in vitro* (Gauthier *et al.* 1995).

Após a optimização da proliferação da cultura *in vitro*, procedeu-se à tentativa de produção em larga escala em modo descontínuo e verificou-se o efeito da agitação e volume nesta mesma produção. A produção em larga escala de células em suspensão pode ser efectuada em vários sistemas relativamente simples, nomeadamente frascos com agitação externa, frascos com agitação interna e garrafas rotativas (Sigma-Aldrich - Fundamental Techniques in Cell Culture A laboratory Handbook), a escolha dependendo maioritariamente do tipo de células que se pretende produzir. Neste estudo optou-se por utilizar frascos com agitação externa por não requerer um sistema autónomo dispendioso e ao mesmo tempo evitar os problemas inerentes à agitação interna, como o calor produzido pela agitação e a possibilidade de lise celular. O efeito da agitação e do volume foi previamente avaliado, revelando que existe um efeito somatório destas duas variáveis, demonstrando a sua igual importância na proliferação deste parasita. O efeito do volume faz-se sentir principalmente pelo aumento de meio nutritivo disponível ao qual se adiciona a agitação, que é responsável pela distribuição homogénea dos nutrientes. A produção em larga escala em frascos de 2000 ml foi conseguida, com uma densidade final superior em relação a frascos de cultura estacionários, no entanto os resultados obtidos ficaram muito aquém dos apresentados para a propagação em larga escala de cultura de *P. marinus* (Gauthier e Vasta 1995), com valores de densidade óptica até 3.5 unidades, o equivalente a cerca de  $58 \times 10^6$  células/ml. As células de *P. olseni* adaptaram-se perfeitamente ao crescimento em larga escala., com uma produção máxima conseguida após a optimização de cerca de  $33 \times 10^6$  cells/ml, o que significou um aumento de 9%

relativamente ao crescimento pré-otimização, e representando um acréscimo de 20% relativamente à biomassa produzida com um total de 400 mg/L (peso seco).

O primeiro passo para a extracção dos componentes alcalino-insolúveis (AI) presentes na parede celular do protozoário *P. olsenii* consistiu em homogenizar as células. Este procedimento foi efectuado por sonicação, método eficaz para proceder à lise da parede celular (Shokri *et al.* 2008), apesar da existência de estudos que indicam que este método pode degradar os polímeros de quitina em algumas condições (Kjartansson *et al.* 2006). O homogenizado foi então submetido ao processo de extracção alcalino com NaOH com diferentes concentrações e a diferentes temperaturas, mantendo no entanto constante o tempo de reacção de 16h, pretendendo-se verificar qual a extracção menos agressiva e ao mesmo tempo mais eficaz. Os resultados obtidos revelaram que a percentagem de produto obtido (AI) relativamente à biomassa inicial foi decrescendo à medida que as condições se tornavam mais agressivas: (1 M, 28°C) > (1 M, 60°C) > (3 M, 28°C) > (3 M, 60°C), indicando que a concentração de NaOH é o parâmetro com maior influência na extracção, estando de acordo com resultados obtidos em extracções efectuadas em crustáceos (Chen *et al.* 2004). A quantidade de produto final (AI) obtido pelo método de extracção alcalino atingiu um máximo de aproximadamente 9% e um mínimo de 2%, comparável ao obtido no fungo *M. rouxii* por Synowiecki e Al-Khateeb (1997), mas no entanto muito inferior aos valores obtidos por Wu *et al.* (2005), tanto para micélios de *M. rouxii* ( $\pm 13\%$ ) como para *A. niger* ( $\pm 24\%$ ).

Para além do método de extracção alcalino foi utilizado um método por solvente orgânico, nomeadamente o sistema dimetilacetamida/LiCl 5%, um reconhecido solvente dos polímeros de quitina e celulose (Poirier e Charlet 2002), já utilizado em extracções

directas de quitina em crustáceos (Teng *et al.* 2001). O produto obtido com esta extracção representou cerca de 25% da biomassa inicial de *P. olsenii*, valor bem mais elevado relativamente aos obtidos pelo método alcalino, o que levou a concluir de imediato que estariam presentes outros compostos para além da quitina.

Com o intuito de identificar e caracterizar a quitina presente nas amostras extraídas da parede celular do parasita *P. olsenii*, assim como avaliar a eficácia da extracção, recorreu-se a técnicas frequentemente utilizadas para classificar a quitina quanto ao tipo e qualidade, sendo estas características fundamentais para avaliar a sua possível utilização biotecnológica.

A primeira técnica utilizada foi a espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), reconhecida pela sua capacidade de identificação e distinção entre os tipos  $\alpha$  e  $\beta$ -quitina.

Os resultados obtidos demonstraram que a extracção alcalina com 1M de NaOH a 28°C foi a menos eficaz, pois revelou uma forte presença de lípidos e proteínas, indicando que nestas condições permaneceram na amostra bastantes compostos constituintes da parede celular para além da quitina. Seria portanto necessário utilizar em conjunto outras extracções, nomeadamente clorofórmio/metanol um passo recomendado por Chaussard e Domard (2004). Quando se aumentou a temperatura para 60°C, as absorvâncias típicas das proteínas e lípidos desapareceram, revelando claramente as absorvâncias típicas do polímero de quitina, 1653  $\text{cm}^{-1}$ , 1556  $\text{cm}^{-1}$ , 1420  $\text{cm}^{-1}$ , 1377  $\text{cm}^{-1}$  e 1316  $\text{cm}^{-1}$ . No entanto, a absorvância a 3447  $\text{cm}^{-1}$  relativa às pontes de hidrogénio intramoleculares praticamente não existe, o mesmo se obtendo quando se aumentou a concentração de NaOH para 3M mas mantendo a temperatura a 28°C.

Quando se aumentou conjuntamente a concentração NaOH e a temperatura (3M e 60°C), os resultados foram mais semelhantes aos obtidos para a quitina comercial, apesar da absorvância a 3447 cm<sup>-1</sup> nunca aparecer completamente mesmo nestas condições, mantendo-se visivelmente como um “ombro” da absorvância a 3272 cm<sup>-1</sup>. Outra particularidade desta extracção alcalina, foi ter-se obtido uma absorvância a 1316 cm<sup>-1</sup> mais intensa do que a 1420 cm<sup>-1</sup> ao contrário do obtido para as outras extracções alcalinas. Se tivermos em conta que para Brugnerotto *et al.* (2001) o rácio destas absorvâncias ( $A_{1320}/A_{1420}$ ) é considerado um bom indicador do grau de acetilação, pode-se concluir que o método de extracção alcalino mais agressivo provocou alguma degradação no polímero de quitina, resultando num produto bastante deacetilado.

A absorvância única a 1653 cm<sup>-1</sup> observada nas amostras, ao invés do duplete 1653 cm<sup>-1</sup> e 1625 cm<sup>-1</sup> típico da  $\alpha$ -quitina, parece indicar que estamos na presença de outro tipo de quitina, nomeadamente  $\beta$ -quitina (Noishiki *et al.* 2003, Cárdenas *et al.* 2004).

Quando se efectuou a extracção da quitina com o solvente dimetilacetamida/LiCl 5% (DMAC/LiCl 5%), o espectro obtido foi muito semelhante ao da extracção alcalina nas condições menos agressivas (1M NaOH, 28°C), sem no entanto aparecerem algumas das absorvâncias típicas de proteínas e lípidos. No entanto, desapareceram também algumas absorvâncias típicas da quitina, muito provavelmente por interferências de outros compostos extraídos conjuntamente, o que vai de encontro ao facto de ter sido a amostra com maior peso percentual relativamente à biomassa inicial. Teng *et al.* (2001) pelo contrário, obtiveram uma extracção extremamente eficaz da quitina presente em micélio e exosqueleto de camarão com este solvente orgânico, obtendo resultados muito semelhantes aos obtidos com a quitina comercial.

Para o prosseguimento da caracterização da quitina presente em *P. olseni* foram então seleccionadas as amostras extraídas quer com solução 3M de NaOH a 60°C, quer com o solvente orgânico DMAC/LiCl 5%, a primeira por ter apresentado os resultados mais coerentes com os obtidos para a quitina de caranguejo comercial e apenas com um passo de extracção, e a segunda porque o processo de extracção garantia a integridade dos polímeros de quitina, ao contrário da extracção alcalina. A análise elementar das amostras confirmou os resultados obtidos por infravermelho, demonstrando que a amostra qDMAC extraída com o solvente orgânico era constituída por outros compostos para além da quitina, pelo facto de tanto a sua percentagem em nitrogénio como de carbono ser bastante mais elevada do que a percentagem teórica para uma quitina totalmente acetilada. Como a percentagem de nitrogénio é considerada um bom indicador relativamente à presença de proteínas (Majtán *et al.* 2007), considerou-se que a amostra qDMAC continha uma percentagem de proteínas na sua composição. Para além disso, a análise elementar a esta amostra revelou a presença de enxofre, um elemento que não se encontra na quitina. Por outro lado, os resultados obtidos para a amostra qAlc extraída com solução alcalina demonstraram uma percentagem de nitrogénio mais baixa do que os valores teóricos, o que parecia indicar a ausência de proteínas nesta amostra.

Quando se efectuou a quantificação das proteínas presentes nas amostras, verificou-se que a amostra qDMAC possuía a maior percentagem de proteínas, com um valor de 5,75%. Apesar de ser um valor relativamente elevado, ainda fica aquém dos resultados de Teng *et al.* (2001), que obtiveram valores entre 10 e 15% de proteína residual nas amostras de quitina de fungos extraídas pelo mesmo processo, embora os mesmos autores tenham obtido valores inferiores a 5% em amostras de quitina derivada de crustáceos. As

proteínas presentes na amostra qDMAC são muito provavelmente proteínas não ligadas covalentemente à quitina, pois esta torna-se insolúvel em dimetilacetamida quando ligada a outros compostos (Poirier e Charlet 2002).

A amostra qAlc obteve um resultado de apenas 0,76% de proteínas, um pouco mais elevado do que a amostra de quitina comercial com um valor de 0,46%, valores que estão de acordo com a percentagem de proteínas residuais obtidas em amostras de quitina extraída de crustáceos e de fungos por métodos alcalinos (Percot *et al.* 2003, Synowiecki e Al-Khateeb 1997). Estes resultados demonstram que, apesar de estas duas amostras terem apresentado baixas percentagens de nitrogénio, isso não significa necessariamente a completa ausência de proteínas. Estas, ao contrário da extracção com o solvente orgânico, deverão ser na sua maioria proteínas ligadas covalentemente à quitina, pois são as mais difíceis de serem retiradas (Poirier e Charlet 2002).

As amostras foram posteriormente avaliadas, quanto ao seu conteúdo em quitina, através da quantificação dos monossacarídeos de acetilglucosamina obtidos após hidrólise enzimática com quitinase. Os resultados revelaram a presença de dez vezes mais acetilglucosamina nas amostras de quitina comercial do que nas amostras extraídas de *P. olseni*. Este resultado pode ser devido a, nomeadamente, (i) a afinidade da quitinase não ser a mesma para as diferentes quitinas, pois poderá ser influenciada pelo grau de amorficidade e acetilação (Zhang *et al.* 2000), (ii) influência directa de outros compostos presentes na actividade da enzima, ou (iii) simplesmente a percentagem de quitina ser diferente nas amostras.

A difracção de raios-x da amostra qDMAC revelou que esta era amorfa, isto é, não apresentou qualquer padrão típico de cristalinidade da quitina, o que indica uma falta de

organização estrutural. O aumento do grau de amorficidade da quitina tem sido observado com um aumento do grau de deacetilação (Chen *et al.* 2004), muito pelo facto de o grupo carbonilo presente na quitina ser importante na organização estrutural através da formação de pontes de hidrogénio. O grau elevado de deacetilação da quitina presente na amostra poderá ser uma das razões para os resultados obtidos. No entanto, não se poderá colocar de lado o efeito de outros compostos presentes na amostra como as proteínas. Os resultados de raios-x para a amostra qAlc foram inesperados no sentido que se obteve difracções típicas do composto hidroxiapatite, e como não existe nenhuma descrição deste composto no parasita *P. olsenii*, concluiu-se que foi o resultado de uma contaminação de cálcio e fosfato durante o processo de extracção. No estudo efectuado por Wan *et al.* (1998) foi preparado um composto de quitina com apatite, que após análise de difracção de raios-x demonstrou a presença de sinais típicos tanto de apatite como de quitina, resultados que não foram obtidos para a amostra qAlc visto que os sinais de difracção da quitina eram muito alargados, indicando a falta de cristalinidade por parte da quitina nesta amostra, em concordância com os resultados obtidos para a amostra qDMAC.

A espectroscopia de  $^{13}\text{C}$ -RMN do estado sólido tem provado ser uma mais valia para a análise de biopolímeros insolúveis sem levar à sua destruição (Delepierre e Lecroisey 2001). Quando esta técnica foi utilizada nas amostras obtidas de *P. olsenii*, o resultado obtido para a amostra qDMAC revelou a existência da grande maioria dos sinais típicos dos carbonos da estrutura da quitina. O sinal correspondente ao grupo C=O foi mais intenso do que o esperado, facto que confirma a presença de proteínas na amostra (Zhang *et al.* 2000), corroborado pelos sinais obtidos a 156 e 116 ppm correspondentes aos

grupos da tirosina e arginina (Jang *et al.* 2004) e por outro sinal obtido a 129 ppm e correspondente a grupos aromáticos. As absorvâncias dos carbonos 1, 3 e 5 apresentaram-se muito fracas, o que parece indicar uma restrição estrutural nestas posições, muito provavelmente devido à presença de outros compostos. O sinal relativo ao carbono 6 revelou apenas um ombro do sinal do carbono 2, e a absorvância correspondente ao C4 é quase inexistente, o que parece confirmar um grau de deacetilação elevado (Kittur *et al.* 2003, Chen *et al.* 2004).

Os resultados de RMN para a amostra qAlc, revelaram uma elevada mobilidade molecular por parte desta, tornando quase ilegível o espectro obtido, provavelmente devido à presença de cálcio e fosfato. No entanto, parecem destacar-se os sinais correspondentes ao C3, C5, C6 e CH<sub>3</sub>, sendo os três primeiros os que apresentaram menor resolução na amostra qDMAC, o que parece confirmar o maior constrangimento estrutural e conseqüentemente menor mobilidade molecular destes carbonos na estrutura da quitina extraída de *P. olseni*.

Os testes toxicológicos *in vitro* propostos como um dos objectivos, não foram efectuados devido aos resultados terem demonstrado que as amostras de quitina extraídas continham impurezas, que influenciariam necessariamente os resultados toxicológicos.

## 5. CONCLUSÕES

Neste estudo conseguiu-se efectuar uma optimização do crescimento *in vitro* de *P. olseni* em meio DME:Ham's F-12 (1:2), com um suplemento de 3% de FBS, 760 mmol/kg de osmolaridade, a 28°C e a partir de um inóculo inicial de  $6 \times 10^6$  células/ml. Este crescimento é possível em larga escala por método descontínuo, com uma produtividade volumétrica de 0,0021g/L/h.

O métodos utilizados para a extracção da quitina presente na parede celular do protozoário *P. olseni* não foram completamente eficazes, na extracção com o solvente DMAC/LiCl 5% isolaram-se outros componentes da parede celular conjuntamente com a quitina, nomeadamente proteínas e compostos aromáticos. A extracção alcalina (3M NaOH, 60°C durante 16h) apesar de eficiente na extracção das proteínas, foi um processo demasiado agressivo que poderá ter degradado a estrutura da quitina (deacetilação).

A caracterização das amostras de quitina através da análise elementar, quantificação de proteína residual e acetilglucosamina, análise por difracção de raios-x e espectroscopia de RMN  $^{13}\text{C}$  do estado sólido, revelou que os polímeros de quitina presentes na parede celular de *P. olseni* apresentam uma estrutura amorfa do tipo- $\beta$ , e apesar de não se ter conseguido calcular o grau de deacetilação, aparentemente este, apresenta-se elevado.

O aproveitamento biotecnológico da quitina de *Perkinsus olseni* não está assim posta de parte, pois apesar das pequenas quantidades obtidas, a  $\beta$ -quitina é menos comum do que a forma  $\alpha$ , encontrando-se apenas em poucos organismos e apresenta propriedades mais interessantes a nível biotecnológico, nomeadamente a capacidade de intercalar pequenas moléculas como a água, capacidade de ser convertida para a forma  $\alpha$  (Saito *et al.* 2000) e

o facto de ser mais reactiva (Lamarque *et al.* 2004). No entanto é preciso obter uma quitina com um grau de pureza mais elevado para melhor a caracterizar, nomeadamente calcular com exactidão o grau de acetilação, peso molecular e finalmente proceder a testes toxicológicos *in vitro*.

## 6. PERSPECTIVAS FUTURAS

A quitina presente em *P. olseni* necessitará futuramente de uma melhor caracterização, para tal terá que se efectuar uma optimização da sua extracção, que passará por uma extracção com o solvente DMAC/LiCl 5% complementada com um tratamento alcalino menos agressivo.

O grau de acetilação, o peso molecular e a confirmação da cristalinidade são características fundamentais da quitina para se verificar a sua potencialidade biotecnológica. Se esta se confirmar será necessária a realização de estudos toxicológicos *in vitro* e posteriormente *in vivo*.

## 7. BIBLIOGRAFIA

- Abollo, E., Casas, S.M., Ceschia, G., Villalba, A.,** 2006. Differential diagnosis of *Perkinsus* species by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism assay. *Molecular and Cellular Probes* 20, 323-329.
- Auzoux-Bordenave, S., Vigario, A.M., Ruano, F., Domart-Coulon, I., Doumenc, D.,** 1995. In vitro sporulation of the clam pathogen *Perkinsus atlanticus* (Apicomplexa, Perkinsea) under various environmental conditions. *Journal of Shellfish Research* 14, 469-475.
- Azevedo, C.,** 1989. Fine structure of *Perkinsus atlanticus* n. sp. (Apicomplexa, Perkinsea) parasite of the clam *Ruditapes decussatus* from Portugal. *J Parasitol* 75, 627-635.
- Azevedo, C., Corral, L., Cachola, R.,** 1990. Fine structure of zoosporulation in *Perkinsus atlanticus* (Apicomplexa: Perkinsea). *Parasitology* 100 Pt 3, 351-358.
- Beaney, P., Lizardi-Mendoza, J., Healy, M.,** 2005. Comparison of chitins produced by chemical and bioprocessing methods. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 80, 145-150.
- Bowman, S.M., Free, S.J.,** 2006. The structure and synthesis of the fungal cell wall. *Bioessays* 28, 799-808.
- Braun, R.D.,** 1987. Introduction to instrumental analysis. International Edition. McGraw-Hill book Company.

- Brugnerotto, J., Lizardi, J., Goycoolea, F.M., Arguelles-Monal, W., Desbrieres, J., Rinaudo, M.,** 2001. An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization. *Polymer* 42, 3569-3580.
- Bulik, D.A., Olczak, M., Lucero, H.A., Osmond, B.C., Robbins, P.W., Specht, C.A.,** 2003. Chitin synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* in response to supplementation of growth medium with glucosamine and cell wall stress. *Eukaryotic Cell* 2, 886-900.
- Byun, H.G., Kim, Y.T., Park, P.J., Lin, X.L., Kim, S.K.,** 2005. Chitooligosaccharides as a novel beta-secretase inhibitor. *Carbohydrate Polymers* 61, 198-202.
- Cardenas, G., Cabrera, G., Taboada, E., Miranda, S.P.,** 2004. Chitin characterization by SEM, FTIR, XRD, and C-13 cross polarization/mass angle spinning NMR. *Journal of Applied Polymer Science* 93, 1876-1885.
- Casas, S.M., Reece, K.S., Li, Y., Moss, J.A., Villalba, A., La Peyre, J.F.,** 2008. Continuous culture of *Perkinsus mediterraneus*, a parasite of the European flat oyster *Ostrea edulis*, and characterization of its morphology, propagation, and extracellular proteins in vitro. *J Eukaryot Microbiol* 55, 34-43.
- Chaussard, G., Domard, A.,** 2004. New aspects of the extraction of chitin from squid pens. *Biomacromolecules* 5, 559-564.
- Chen, C.H., Wang, F.Y., Ou, Z.P.,** 2004. Deacetylation of beta-chitin. I. Influence of the deacetylation conditions. *Journal of Applied Polymer Science* 93, 2416-2422.

- Chen, P.Y., Lin, A.Y.M., McKittrick, J., Meyers, M.A.,** 2008. Structure and mechanical properties of crab exoskeletons. *Acta Biomaterialia* 4, 587-596.
- Chu, F.L.E.,** 1996. Laboratory investigations of susceptibility, infectivity, and transmission of *Perkinsus marinus* in oysters. *Journal of Shellfish Research* 15, 57-66.
- Chu, F.L.E., Volety, A.K., Hale, R.C., Huang, Y.Q.,** 2002. Cellular responses and disease expression in oysters (*Crassostrea virginica*) exposed to suspended field - contaminated sediments. *Marine Environmental Research* 53, 17-35.
- Cohen, E.,** 2001. Chitin synthesis and inhibition: a revisit. *Pest Management Science* 57, 946-950.
- Colwell, R.R.,** 2002. Fulfilling the promise of biotechnology. *Biotechnol Adv* 20, 215-228.
- Committee on Knowledge Assessment, N.R.C.,** 1999. Lighting the way: Knowledge Assessment in Prince Eduard Island. The National Academies Press, Washington,DC.
- Coss, C.A., Robledo, J.A.F., Vasta, G.R.,** 2001. Fine structure of clonally propagated in vitro life stages of a *Perkinsus sp* isolated from the baltic clam *Macoma balthica*. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 48, 38-51.
- Cowan, D.A.,** 1997. The marine biosphere: A global resource for biotechnology - Introductory overview. *Trends in Biotechnology* 15, 129-131.

- Davidson, B.S.**, 1995. New dimensions in natural products research: cultured marine microorganisms. *Current Opinion in Biotechnology*, 284-291.
- Delepierre, M., Lecroisey, A.**, 2001. The interface between microbiology and structural biology as viewed by nuclear magnetic resonance. *Research in Microbiology* 152, 697-705.
- Dungan, C.F., Hamilton, R.M.**, 1995. Use of a Tetrazolium-Based Cell-Proliferation Assay to Measure Effects of in-Vitro Conditions on *Perkinsus marinus* (Apicomplexa) Proliferation. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 42, 379-388.
- Dungan, C.F., Reece, K.S.**, 2006. In vitro propagation of two *Perkinsus spp.* parasites from Japanese Manila clams *Venerupis philippinarum* and description of *Perkinsus honshuensis* n. sp. *J Eukaryot Microbiol* 53, 316-326.
- European Commission**, 2006. Background Paper No10 on Marine biotechnology.
- Faisal, M., Schafhauser, D.Y., Garreis, K.A., Elsayed, E., La Peyre, J.F.**, 1999. Isolation and characterization of *Perkinsus marinus* proteases using bacitracin-sepharose affinity chromatography. *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology* 123, 417-426.
- Fenical, W.**, 1997. New pharmaceuticals from marine organisms. *Trends Biotechnol* 15, 339-341.
- Fernandez-Robledo, J.A., Lin, Z., Vasta, G.R.**, 2008. Transfection of the protozoan parasite *Perkinsus marinus*. *Mol Biochem Parasitol* 157, 44-53.

**Ford, S.E.**, 1996. Range extension by the oyster parasite *Perkinsus marinus* into the northeastern United States: Response to climate change? *Journal of Shellfish Research* 15, 45-56.

**Ford, S.E., Chintala, M.M., Bushek, D.**, 2002. Comparison of in vitro-cultured and wild-type *Perkinsus marinus*. I. Pathogen virulence. *Dis Aquat Organ* 51, 187-201.

**Gauthier, J.D., Vasta, G.R.**, 1993. Continuous in-Vitro Culture of the Eastern Oyster Parasite *Perkinsus marinus*. *Journal of Invertebrate Pathology* 62, 321-323.

**Gauthier, J.D., Feig, B., Vasta, G.R.**, 1995. Effect of fetal bovine serum glycoproteins on the in vitro proliferation of the oyster parasite *Perkinsus marinus*: development of a fully defined medium. *J Eukaryot Microbiol* 42, 307-313.

**Gauthier, J.D., Vasta, G.R.**, 1995. In-Vitro Culture of the Eastern Oyster Parasite *Perkinsus marinus* - Optimization of the Methodology. *Journal of Invertebrate Pathology* 66, 156-168.

**Gauthier, J.D., Jenkins, J.A., La Peyre, J.F.**, 2004. Flow cytometric analysis of lectin binding to in vitro-cultured *Perkinsus marinus* surface carbohydrates. *J Parasitol* 90, 446-454.

**Genentech, Inc.**, 2008. Corporate Chronology.

<http://www.gene.com/gene/about/corporate/history/timeline.html>

- Goggin, C.L., Lester, R.J.G.,** 1987. Occurrence of Perkinsus-Species (Protozoa, Apicomplexa) in Bivalves from the Great-Barrier-Reef. *Diseases of Aquatic Organisms* 3, 113-117.
- Grauvogel, C., Reece, K.S., Brinkmann, H., Petersen, J.,** 2007. Plastid isoprenoid metabolism in the oyster parasite *Perkinsus marinus* connects dinoflagellates and malaria pathogens--new impetus for studying alveolates. *J Mol Evol* 65, 725-729.
- Gronning, T., Dobos, E., Dhal-Hilstad, I. F., Johanson, O. A., Knell, M., Olsen, D. S.,** 2004. Case Study on Biotech Innovation Systems Norway Vol.2: Marine biotechnology. Center for technology, innovation and culture, University of Oslo.
- Hayes, M., Carney, B., Slater, J., Bruck, W.,** (a) 2008. Mining marine shellfish wastes for bioactive molecules: chitin and chitosan-Part A: Extraction Methods. *Biotechnology Journal* 3, 1-12
- Hayes, M., Carney, B., Slater, J., Bruck, W.,** (b) 2008. Mining marine shellfish wastes for bioactive molecules: chitin and chitosan-Part B: Applications. *Biotechnology Journal* 3, 1-12
- Hoover, C.A., Slattery, M., Marsh, A.G.,** 2007. A functional approach to transcriptome profiling: linking gene expression patterns to metabolites that matter. *Mar Biotechnol (NY)* 9, 411-419.
- Hulse, J.H.,** 2004. Biotechnologies: past history, present state and future prospects. *Trends in Food Science & Technology* 15, 3-18.

- Jang, M.K., Kong, B.G., Jeong, Y.I., Lee, C.H., Nah, J.W.,** 2004. Physicochemical characterization of alpha-chitin, beta-chitin, and gamma-chitin separated from natural resources. *Journal of Polymer Science Part a-Polymer Chemistry* 42, 3423-3432.
- Jindal, S.,** 1996. Heat shock proteins: Applications in health and disease. *Trends in Biotechnology* 14, 17-20.
- JRC European Commission,** 2007. Life Science and Biotechnology. <http://ec.europa.eu/dgs/jrc/index.cfm?id=1640&lang=en>
- Karolus, J., Sunila, I., Spear, S., Volk, J.,** 2000. Prevalence of *Perkinsus marinus* (Dermo) in *Crassostrea virginica* along the Connecticut shoreline. *Aquaculture* 183, 215-221.
- Kim, S.K., Mendis, E.,** 2006. Bioactive compounds from marine processing byproducts - A review. *Food Research International* 39, 383-393.
- Kim, S.K., Rajapakse, N.,** 2005. Enzymatic production and biological activities of chitosan oligosaccharides (COS): A review. *Carbohydrate Polymers* 62, 357-368.
- Kittur, F.S., Kumar, A.B.V., Tharanathan, R.N.,** 2003. Low molecular weight chitosans - preparation by depolymerization with *Aspergillus niger* pectinase, and characterization. *Carbohydrate Research* 338, 1283-1290.

- Kjartansson, G.T., Zivanovic, S., Kristbergsson, K., Weiss, J.,** 2006. Sonication-assisted extraction of chitin from shells of fresh water prawns (*Macrobrachium rosenbergii*). Journal of Agricultural and Food Chemistry 54, 3317-3323.
- Kleinschuster, S.J., Swink, S.L.,** 1993. A Simple Method for the in-Vitro Culture of Perkinsus-Marinus. Nautilus 107, 76-78.
- Kumar, M.,** 2000. A review of chitin and chitosan applications. Reactive & Functional Polymers 46, 1-27.
- Kurita, K.,** 2006. Chitin and chitosan: functional biopolymers from marine crustaceans. Mar Biotechnol (NY) 8, 203-226.
- La Peyre, M., Casas, S., La Peyre, J.,** 2006. Salinity effects on viability, metabolic activity and proliferation of three *Perkinsus* species. Dis Aquat Organ 71, 59-74.
- La Peyre, J.F., Faisal, M., Burreson, E.M.,** 1993. In vitro-Propagation of the Protozoan *Perkinsus marinus*, a Pathogen of the Eastern Oyster, Crassostrea-Virginica. Journal of Eukaryotic Microbiology 40, 304-310.
- La Peyre, J.F.,** 1996. Propagation and in vitro studies of *Perkinsus marinus*. Journal of Shellfish Research 15, 89-101.
- Lamarque, G., Viton, C., Domard, A.,** 2004. Comparative study of the first heterogeneous deacetylation of alpha- and beta-chitins in a multistep process. Biomacromolecules 5, 992-1001.

- Langoth, N., Kahlbacher, H., Schoffmann, G., Schmerold, I., Schuh, M., Franz, S., Kurka, P., Bernkop-Schnurch, A.,** 2006. Thiolated chitosans: design and in vivo evaluation of a mucoadhesive buccal peptide drug delivery system. *Pharm Res* 23, 573-579.
- Leite, R.B., Afonso, R., Cancela, M.L.,** 2004. Perkinsus sp infestation in carpet-shell clams, *Ruditapes decussatus* (L), along the Portuguese coast. Results from a 2-year survey. *Aquaculture* 240, 39-53.
- Lund, E.D., Chu, F.L., Soudant, P., Harvey, E.,** 2007. Perkinsus marinus, a protozoan parasite of the eastern oyster, has a requirement for dietary sterols. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 146, 141-147.
- Majtan, J., Bilikova, K., Markovic, O., Grof, J., Kogan, G., Simuth, J.,** 2007. Isolation and characterization of chitin from bumblebee (*Bombus terrestris*). *International Journal of Biological Macromolecules* 40, 237-241.
- Malafaya, P.B., Silva, G.A., Baran, E.T., Reis, R.L.,** 2002. Drug delivery therapies I - General trends and its importance on bone tissue engineering applications. *Current Opinion in Solid State & Materials Science* 6, 283-295.
- McLaughlin, S.M., Elsayed, E.E., Faisal, M.,** 2000. Analysis of extracellular proteins of two Perkinsus spp. isolated from the softshell clam *Mya arenaria* in vitro. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 126, 587-598.
- Mi, F.L., Shyu, S.S., Lin, Y.M., Wu, Y.B., Peng, C.K., Tsai, Y.H.,** 2003. Chitin/PLGA blend microspheres as a biodegradable drug delivery system: a new delivery system for protein. *Biomaterials* 24, 5023-5036.

**Mijts, B.N., Schmidt-Dannert, C.,** 2003. Engineering of secondary metabolite pathways. *Current Opinion in Biotechnology* 14, 597-602.

**Montes, J.F., Durfort, M., Llado, A., Garcia-Valero, J.,** 2002. Characterization and immunolocalization of a main proteinaceous component of the cell wall of the protozoan parasite *Perkinsus atlanticus*. *Parasitology* 124, 477-484.

**Moss, J.A., Xiao, J., Dungan, C.F., Reece, K.S.,** 2008. Description of *Perkinsus beihaiensis* n. sp., a new *Perkinsus* sp. parasite in oysters of Southern China. *J Eukaryot Microbiol* 55, 117-130.

**Muller, W.E., Bohm, M., Batel, R., De Rosa, S., Tommonaro, G., Muller, I.M., Schroder, H.C.,** 2000. Application of cell culture for the production of bioactive compounds from sponges: synthesis of avarol by primmorphs from *Dysidea avara*. *J Nat Prod* 63, 1077-1081.

**Murrell, A., Kleeman, S.N., Barker, S.C., Lester, R.J.G.,** 2002. Synonymy of *Perkinsus olseni* Lester & Davis, 1981 and *Perkinsus atlanticus* Azevedo, 1989 and an update on the phylogenetic position of the genus *Perkinsus*. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* 22, 258-265.

**Najafi, M.F., Deobagkar, D., Deobagkar, D.,** 2005. Potential application of protease isolated from *Pseudomonas aeruginosa* PD100. *Electronic Journal of Biotechnology* 8, 197-203.

- Newton, A., Mudge, S.M.,** 2003. Temperature and salinity regimes in a shallow, mesotidal lagoon, the Ria Formosa, Portugal. *Estuarine Coastal and Shelf Science* 57, 73-85.
- Ngo, T.T.T., Choi, K.S.,** 2004. Seasonal changes of Perkinsus and Cercaria infections in the Manila clam *Ruditapes philippinarum* from Jeju, Korea. *Aquaculture* 239, 57-68.
- Noishiki, Y., Takami, H., Nishiyama, Y., Wada, M., Okada, S., Kuga, S.,** 2003. Alkali-induced conversion of beta-chitin to alpha-chitin. *Biomacromolecules* 4, 896-899.
- Ordas, M.C., Figueras, A.,** 1998. In vitro culture of *Perkinsus atlanticus*, a parasite of the carpet shell clam *Ruditapes decussatus*. *Diseases of Aquatic Organisms* 33, 129-136.
- Park, P.J., Je, J.Y., Kim, S.K.,** 2003. Angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activity of hetero-chitooligosaccharides prepared from partially different deacetylated chitosans. *J Agric Food Chem* 51, 4930-4934.
- Percot, A., Viton, C., Domard, A.,** 2003. Optimization of chitin extraction from shrimp shells. *Biomacromolecules* 4, 12-18.
- Pochanavanich, P., Suntornsuk, W.,** 2002. Fungal chitosan production and its characterization. *Lett Appl Microbiol* 35, 17-21.
- Poirier, M., Charlet, G.,** 2002. Chitin fractionation and characterization in N,N-dimethylacetamide/lithium chloride solvent system. *Carbohydrate Polymers* 50, 363-370.

- Pomponi, S.A.**, 1999. The bioprocess-technological potential of the sea. *Journal of Biotechnology* 70, 5-13.
- Ratledge, C and Kristiansen, B.**, 2001. *Basic Biotechnology*. Second edition. Cambridge University Press, UK.
- Renn, D.**, 1997. Biotechnology and the red seaweed polysaccharide industry: Status, needs and prospects. *Trends in Biotechnology* 15, 9-14.
- Robledo, J.A., Nunes, P.A., Cancela, M.L., Vasta, G.R.**, 2002. Development of an in vitro clonal culture and characterization of the rRNA gene cluster of *Perkinsus atlanticus*, a protistan parasite of the clam *Tapes decussatus*. *J Eukaryot Microbiol* 49, 414-422.
- Saito, Y., Okano, T., Gaill, F., Chanzy, H., Putaux, J.L.**, 2000. Structural data on the intra-crystalline swelling of beta-chitin. *Int J Biol Macromol* 28, 81-88.
- Schott, E.J., Pecher, W.T., Okafor, F., Vasta, G.R.**, 2003. The protistan parasite *Perkinsus marinus* is resistant to selected reactive oxygen species. *Experimental Parasitology* 105, 232-240.
- Shi, C., Zhu, Y., Ran, X., Wang, M., Su, Y., Cheng, T.**, 2006. Therapeutic potential of chitosan and its derivatives in regenerative medicine. *J Surg Res* 133, 185-192.
- Shokri, H., Asadi, F., Khosravi, A. R.**, 2008. Isolation of beta-glucan from the cell wall of *Sacharomyces cerevisiae*. *Natural Product Research* 22, 414-421.

- Sigma-Aldrich**, 2008. Sigma-Fundamental Techniques in Cell Culture a laboratory Handbook.[http://www.sigmaaldrich.com/Area\\_of\\_interest/life\\_science/cell\\_culture/key\\_resources/ECACC\\_Handbook.html](http://www.sigmaaldrich.com/Area_of_interest/life_science/cell_culture/key_resources/ECACC_Handbook.html)
- Skoog D. A., Hollen F.J., Nieman T.A.**, 1998. Principles of instrumental analysis. Saunders College Publishing, Harcourt Brace College publishers.
- Srinivasa, P.C., Tharanathan, R.N.**, 2007. Chitin/chitosan - Safe, ecofriendly packaging materials with multiple potential uses. Food Reviews International 23, 53-72.
- Sunila, I., Hamilton, R.M., Dungan, C.F.**, 2001. Ultrastructural characteristics of the in vitro cell cycle of the protozoan pathogen of oysters, *Perkinsus marinus*. J Eukaryot Microbiol 48, 348-361.
- Synowiecki, J., AlKhateeb, N.**, 1997. Mycelia of *Mucor rouxii* as a source of chitin and chitosan. Food Chemistry 60, 605-610.
- Tall, B.D., La Peyre, J.F., Bier, J.W., Miliotis, M.D., Hanes, D.E., Kothary, M.H., Shah, D.B., Faisal, M.**, 1999. *Perkinsus marinus* extracellular protease modulates survival of *Vibrio vulnificus* in eastern oyster (*Crassostrea virginica*) hemocytes. Applied and Environmental Microbiology 65, 4261-4263.
- Teng, W.L., Khor, E., Tan, T.K., Lim, L.Y., Tan, S.C.**, 2001. Concurrent production of chitin from shrimp shells and fungi. Carbohydr Res 332, 305-316.
- Tharanathan, R.N., Kittur, F.S.**, 2003. Chitin--the undisputed biomolecule of great potential. Crit Rev Food Sci Nutr 43, 61-87.

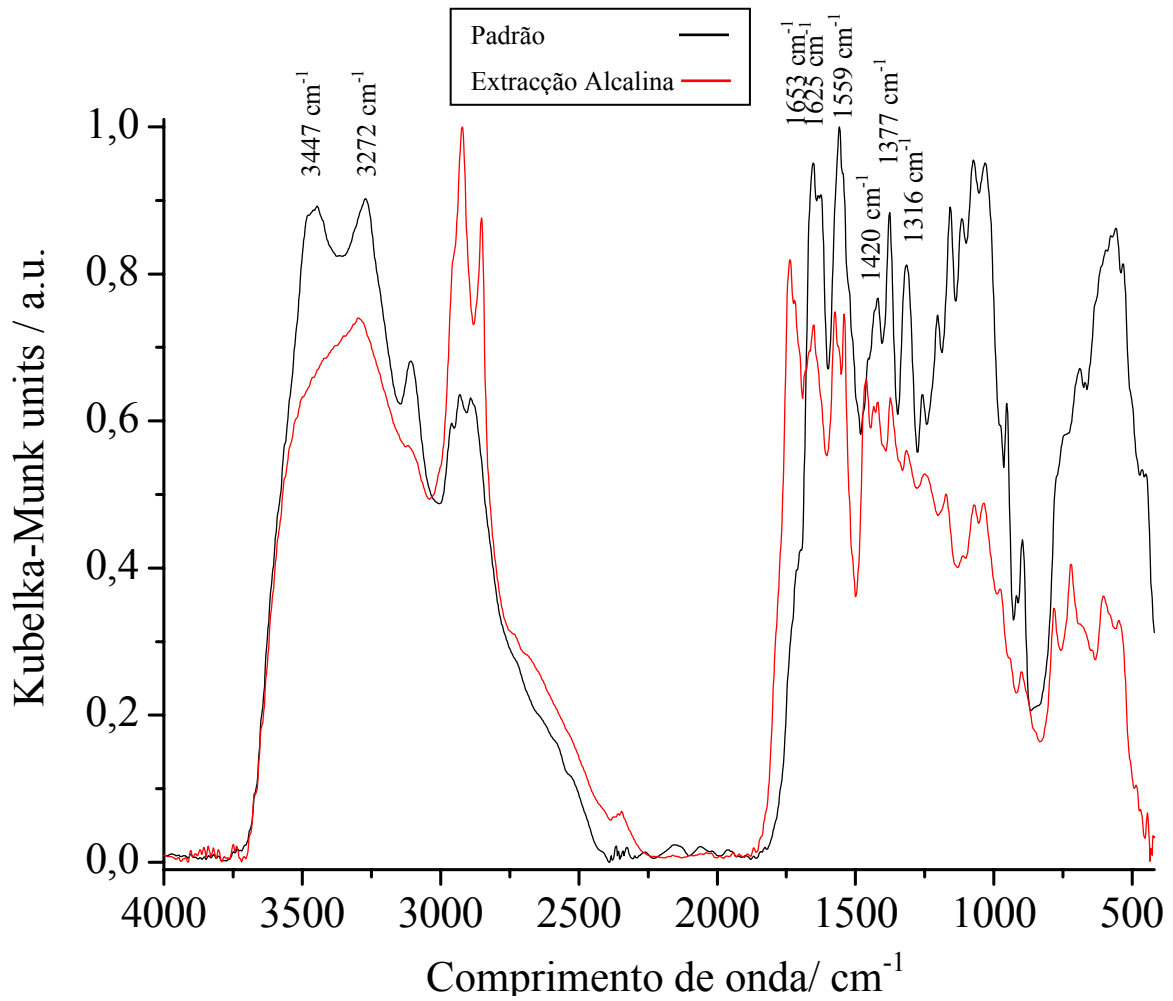
- Tirard, C.T., Grossfeld, R.M., Levine, J.F., Kennedy-Stoskopf, S.,** 1997. Effect of osmotic shock on protein synthesis of oyster hemocytes in vitro. *Comparative Biochemistry and Physiology a-Physiology* 116, 43-49.
- US, Department of State,** 2007. Science and Technology Cooperation.  
<http://www.state.gov/g/oes/stc/>
- Vincent, J.F.V., Wegst, U.G.K.,** 2004. Design and mechanical properties of insect cuticle. *Arthropod Structure & Development* 33, 187-199.
- Visvesvara, G.S., Garcia, L.S.,** 2002. Culture of protozoan parasites. *Clinical Microbiology Reviews* 15, 327-
- Wan, A.C., Khor, E., Hastings, G.W.,** 1998. Preparation of a chitin-apatite composite by in situ precipitation onto porous chitin scaffolds. *J Biomed Mater Res* 41, 541-548.
- Webster, A., Osifo, P.O., Neomagus, H., Grant, D.M.,** 2006. A comparison of glycans and polyglycans using solid-state NMR and X-ray powder diffraction. *Solid State Nuclear Magnetic Resonance* 30, 150-161.
- Weiner, R.M.,** 1997. Biopolymers from marine prokaryotes. *Trends in Biotechnology* 15, 390-394.
- Wijffels, R.H.,** 2007. Potencial of sponges and microalgae for marine biotechnology. *Trends in Biotechnology* 26, 26-31.

- Wu, T., Zivanovic, S., Draughon, F.A., Conway, W.S., Sams, C.E., 2005.** Physicochemical Properties and Bioactivity of Fungal Chitin and Chitosan. *J. Agric. Food Chem.* 53, 3888-3894.
- Xu, X., Capito, R.M., Spector, M., 2008.** Plasmid size influences chitosan nanoparticle mediated gene transfer to chondrocytes. *J Biomed Mater Res A* 84, 1038-1048.
- Xue, Q.G., Waldrop, G.L., Schey, K.L., Itoh, N., Ogawa, M., Cooper, R.K., Losso, J.N., La Peyre, J.F., 2006.** A novel slow-tight binding serine protease inhibitor from eastern oyster (*Crassostrea virginica*) plasma inhibits perkinsin, the major extracellular protease of the oyster protozoan parasite *Perkinsus marinus*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 145, 16-26.
- Zaborsky, O.R., 1999.** Marine bioprocess engineering: the missing link to commercialization. *Journal of Biotechnology* 70, 403-408.
- Zhang, M., Haga, A., Sekiguchi, H., Hirano, S., 2000.** Structure of insect chitin isolated from beetle larva cuticle and silkworm (*Bombyx Mori*) pupa exuvia. *International Journal of Biological Macromolecules* 27, 99-105.



# Anexo I

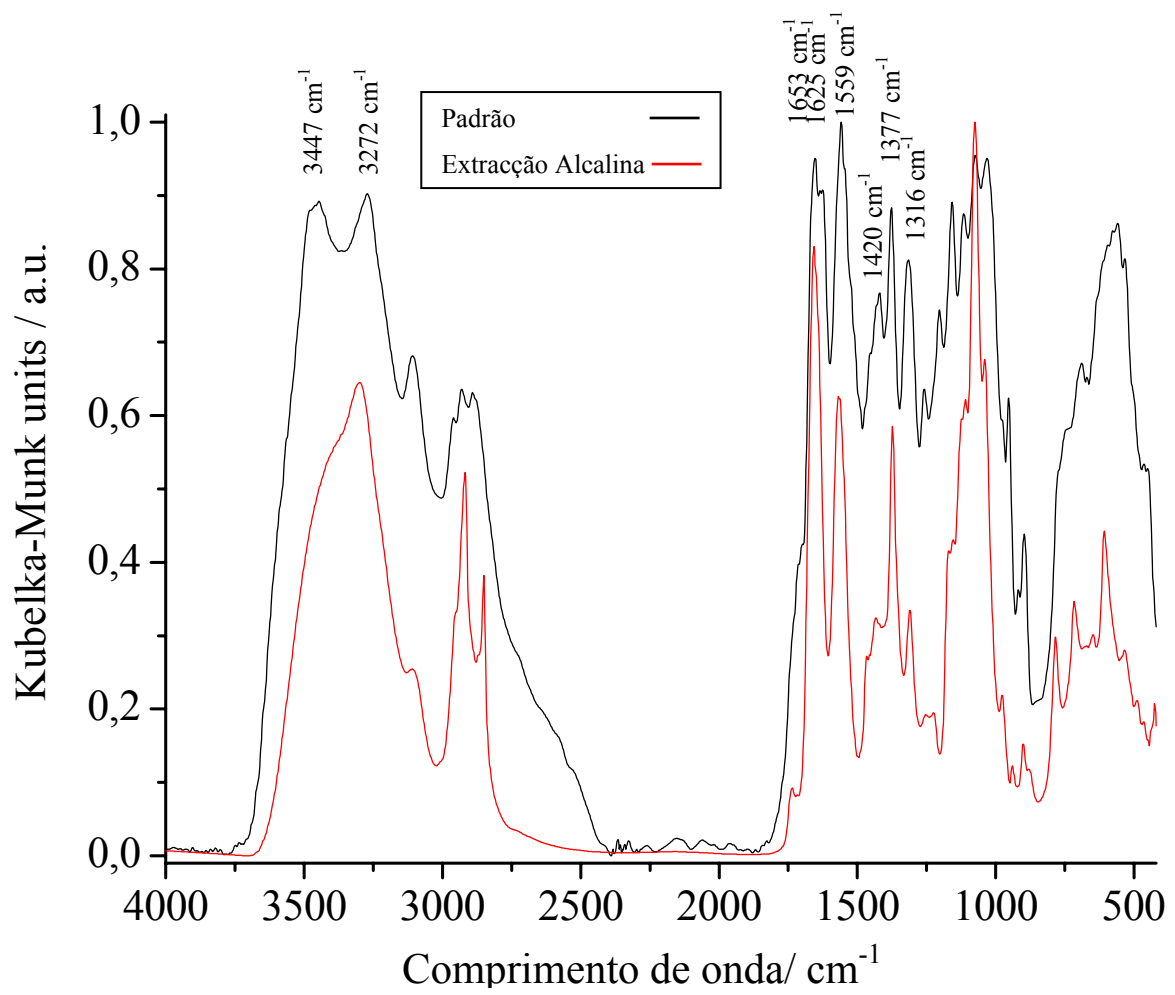
**Espectro de Infravermelho obtido para quitina extraída com 1M NaOH a 28 °C**



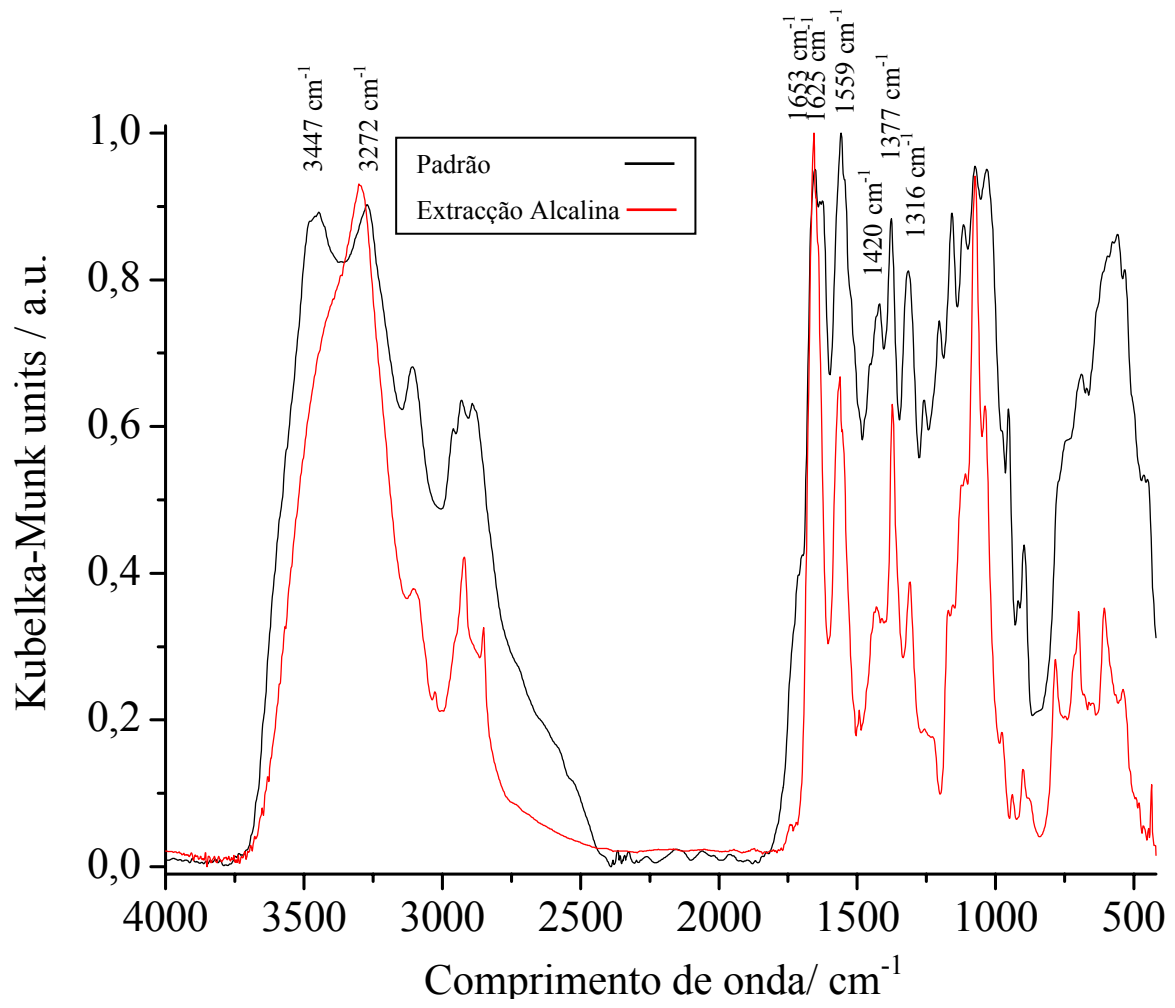
**Atribuição de bandas do espectro da quitina comercial usada como padrão**

Frequência cm <sup>-1</sup>	Atribuição	Frequência cm <sup>-1</sup>	Atribuição
3447	$\nu$ OH	1032	$\nu$ CO
3272	$\nu_a$ NH	954	
3108	$\nu_s$ NH	879	
2931	$\nu_a$ CH	689	
2891	$\nu_s$ CH	560	
1653	$\nu$ C=O (amide I)		
1625			
1559	$\delta$ NH (amide II)		
1420	$\delta_a$ CH <sub>2</sub>		
1377	$\delta_s$ CH <sub>3</sub>		
1316	$\omega_a$ CH <sub>2</sub>		
1259			
1204			
1159	$\nu$ COC		
1116			
1074	$\nu$ CO		

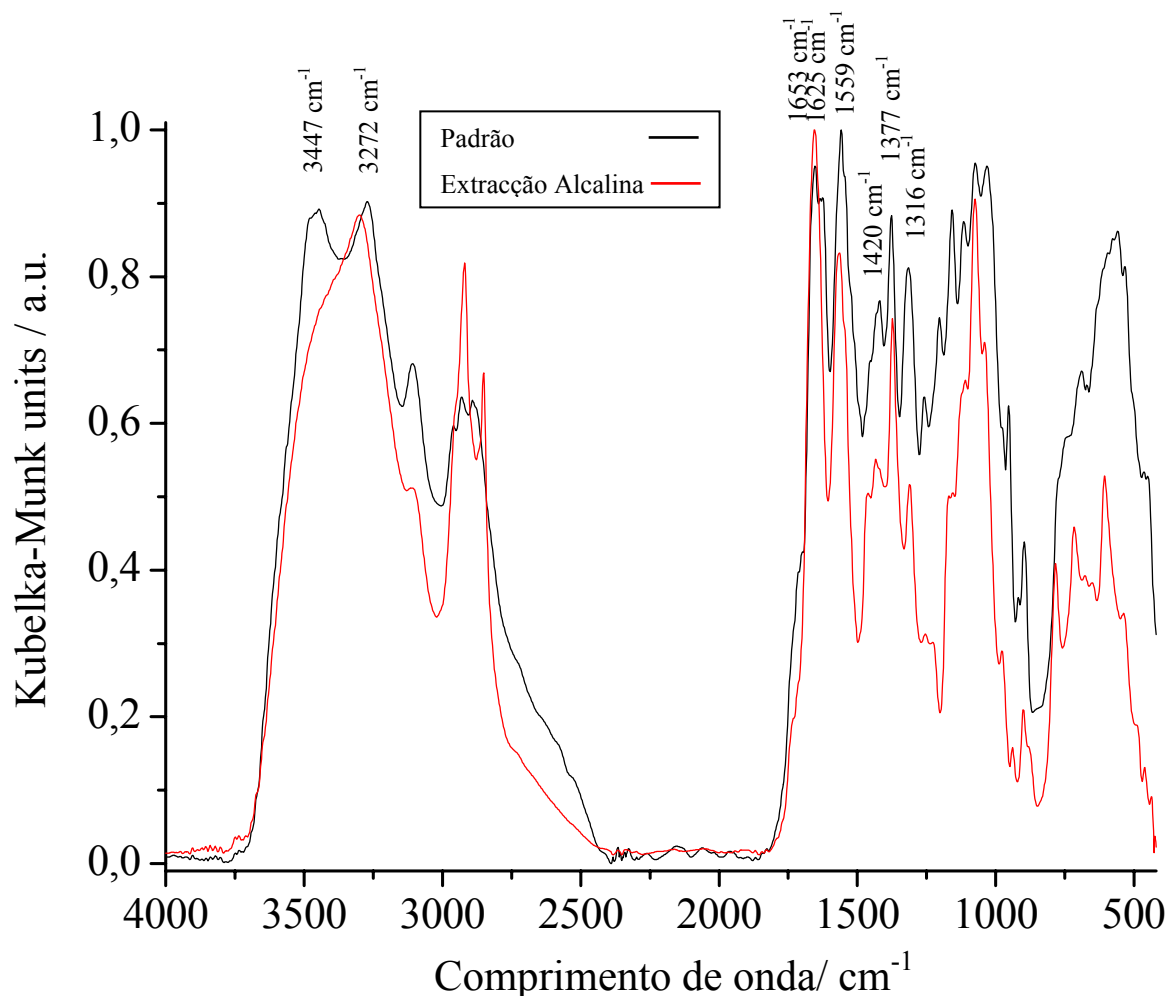
### Espectro de Infravermelho obtido para quitina extraída com 1M NaOH a 60 °C



**Espectro de Infravermelho obtido para quitina extraída com 3M NaOH a 28 °C**



Espectro de Infravermelho obtido para quitina extraída com 3M NaOH a 60 °C



Espectro de Infravermelho obtido para quitina extraída com solvente  
Dimetilacetamida/ 5% LiCl

