

DIOGO RICARDO BAZAN DUCATTI

**OLIGOSSACARÍDEOS OBTIDOS POR HIDRÓLISE  
REDUTIVA PARCIAL DE POLISSACARÍDEOS DE ALGAS  
VERMELHAS: ESTUDOS DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA  
NUCLEAR**

Dissertação apresentada como requisito parcial á obtenção do grau de Mestre, pelo Curso de Pós-Graduação em Ciências – Área Bioquímica, do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

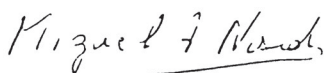
Orientador: Prof. Dr. Miguel Daniel Nosedá

CURITIBA  
2005

DIOGO RICARDO BAZAN DUCATTI

OLIGOSSACARÍDEOS OBTIDOS POR HIDRÓLISE REDUTIVA  
PARCIAL DE POLISSACARÍDEOS DE ALGAS VERMELHAS  
ESTUDOS DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

Dissertação aprovada como requisito final para a obtenção do grau de Mestre no Curso de Pos-Graduação em Ciências (Bioquímica), Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora



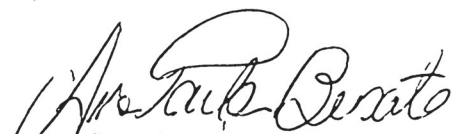
Prof<sup>o</sup> Dr Miguel Daniel Nosedá (Orientador)  
Dpto de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR



Prof<sup>o</sup> Dr Philip Albert James Gorin  
Dpto de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR



Prof<sup>o</sup> Dr<sup>a</sup> Joana Lea Meira Silveira  
Dpto de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR



Prof<sup>o</sup> Dr<sup>a</sup> Ana Paula Busato  
Faculdade Evangelica do Parana

Curitiba, 15 de fevereiro de 2005

**Orientador:**  
**Prof. Dr. Miguel Daniel Nosedá**

**Co-orientadora:**  
**Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Maria Eugênia Duarte Nosedá**

Aos meus pais: Flaminio e Deize pelo incentivo e carinho durante todos estes anos.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu irmão Danilo (Dan), pelo companheirismo e amizade durante todos estes anos, antes e pós Curitiba.

Aos meus tios: Euclides A. Biazus e Manoel P. Bazan por terem possibilitado novas oportunidades.

Aos meus primos irmãos: Rafa, Vini, Samuca e Diego pela amizade e companheirismo.

Agradeço aos meus orientadores professores Miguel D. Nosedá e Maria Eugênia R. Duarte pela amizade e ensinamentos desde a iniciação científica.

Aos meus colegas do laboratório: Alan, Adriano, Rosi, Juliana, Marco, Paula, Lu, Sérgio, Reinaldo, Robson, Alexandre, Fran, Taina pelas conversas, brincadeiras e ajuda no dia a dia.

Aos meus colegas dos laboratórios vizinhos: Ana, Lauro, Thales, Ricardo, Fernanda, Carol, Fhernanda, Reis, Vassoler, Elaine, Marcelinho e Andréa pelos cafés, materiais emprestados, conversas e brincadeiras.

Aos colegas de mestrado: Ana, Lauro, Gus, Marcelo, Tati, Geruza, Graciele, Ju, Pati e Giovana pela agradável convivência durante os créditos.

A galera do futebol: Stefan, Humberto, Valter, Thiago, Guilherme, Miguel, Alan, Marcelo, Gus, Luciano, Marco, Rafael e Leo pelas quartas-feiras de futebol arte.

Ao auxílio financeiro do CNPq, bolsa e taxa de bancada, e Pronex Carboidratos.

As bibliotecárias pela ajuda com os artigos.

“Hoje me sinto mais forte  
Mais feliz quem sabe.  
Só levo a certeza  
De que muito pouco eu sei.  
Eu nada sei...”

Almir Sater/Renato Teixeira

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	iv
LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE ABREVIATURAS	viii
RESUMO	x
1. INTRODUÇÃO	01
1.1 Galactanas de algas vermelhas	01
1.2 Oligossacarídeos	04
1.3 Atividade biológica	13
1.3.1 Atividade anticoagulante	13
1.3.2 Atividade antiangiogênica	14
1.3.3 Atividade antiviral	15
1.4 Justificativa do Trabalho	16
1.4.1 <i>Gracilaria domingensis</i> (Kutzing) Sonder	17
1.4.2 <i>Eucheuma denticulatum</i> (N.L. Burman) F.S. Collins e Hervey	18
2. OBJETIVO	21
2.1 Objetivos gerais	21
2.2 Objetivos específicos	21
3. MATERIAIS E MÉTODOS	22
3.1 Materiais de trabalho	22
3.1.2 Extração e purificação dos polissacarídeos de <i>E. denticulatum</i> e <i>G. domingensis</i>	22
3.2 Tratamento alcalino	23
3.3 Hidrólise redutiva parcial	23
3.4 Purificação dos oligossacarídeos	23
3.4.1 Diálise fechada	23
3.4.2 Cromatografia de troca aniônica	24
3.4.3 Cromatografia de troca catiônica	24
3.4.4 Cromatografia de exclusão	25

3.4.5 Cromatografia de camada delgada preparativa	25
3.4.6 Extração com solvente orgânico	26
3.5 Métodos analíticos	26
3.5.1 Detecção de carboidratos	26
3.5.2 Detecção da 4-metil-morfolina	26
3.5.3 Cromatografia de camada delgada analítica	27
3.6 Ressonância magnética nuclear	27
3.6.1 Ressonância magnética nuclear monodimensional	27
3.6.1.1 Ressonância magnética nuclear de próton	27
3.6.1.1 Ressonância magnética nuclear de carbono-13	28
3.6.1.3 Ressonância magnética nuclear de carbono-13 DEPT	28
3.6.2 Ressonância magnética nuclear bidimensional	28
3.6.2.1 Espectroscopia de correlação homonuclear ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ ) COSY	28
3.6.2.2 Espectroscopia total de correlação homonuclear ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ ) TOCSY	29
3.6.2.3 Espectroscopia de correlação heteronuclear ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ) HMQC	29
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	31
4.1 Hidrólise redutiva parcial das galactanas de <i>Gracilaria domingensis</i>	31
4.2 Análise da fração G-H <sub>2</sub> O, obtida da cromatografia de troca aniônica.	34
4.3 Análises das frações G-1 e G-2 obtidas da cromatografia de troca aniônica.	51
4.4 Análise das frações G-3, G-4, G-5 e G-6 obtidas da cromatografia de troca aniônica.	55
4.5 Extração e tratamento alcalino dos polissacarídeos de <i>E. denticulatum</i> .	58
4.6 Hidrólise redutiva parcial de EHW-I-TA.	63
4.7 Análise da fração NEC-DIAL	65
4.8 Análise da fração NEC-RET	67
4.9 Análise da fração NEC-H <sub>2</sub> O	68
4.10 Análise da fração NEC-005-1	76



4.11 Análise da fração NEC-010-1	77
4.12 Análise das frações NEC-015-1 e 2	84
4.13 Análise da fração NEC-020-1	86
4.14 Análise da fração NEC-025-1	87
4.15 Análise da fração NEC-030-1	94
4.16 Análise da fração NEC-040-1	94
5. CONCLUSÕES	105
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	107

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Degradação enzimática da agarose por $\alpha$ e $\beta$ -agarase	07
Figura 2 - Hidrólise ácida parcial (a) e oxidativa (b) de <i>kappa</i> -carragenana	09
Figura 3 - Hidrólise redutiva parcial das agaranas de <i>Laurencia nipponica</i>	11
Figura 4 - Hidrólise redutiva parcial das agaranas de <i>Acanthophora spicifera</i>	12
Figura 5 - Estruturas repetitivas presente nas agaranas biosintetizadas por <i>Gracilaria domingensis</i>	18
Figura 6 - Estruturas repetitivas presentes nas carragenanas biosintetizadas por <i>Eucheuma denticulatum</i>	20
Figura 7 - Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ de G-HRP. (a) Espectro total (215-5 ppm); (b) ampliação do espectro (110-50 ppm).	32
Figura 8 - Perfil de eluição da cromatografia de troca aniônica (DEAE-Sephadex A25) de G-HRP.	33
Figura 9 - Cromatograma de exclusão da fração G-H <sub>2</sub> O em Sephadex G25.	35
Figura 10 - Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (a) e $^1\text{H}$ (b) de G-H <sub>2</sub> O-1	36
Figura 11 - Espectro de RMN $^1\text{H}$ de G-H <sub>2</sub> O-3.	37
Figura 12 - Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (a) e $^1\text{H}$ (b) de G-H <sub>2</sub> O-5.	39
Figura 13 - Cromatograma de exclusão de G-H <sub>2</sub> O-6 em Bio-Gel P-2.	40
Figura 14 - Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ de G-H <sub>2</sub> O-6A.	42
Figura 15 - Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ de G-H <sub>2</sub> O-6B (a) e estrutura química do agarobiitol (b).	43
Figura 16 - Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ de G-H <sub>2</sub> O-6C (a) e estrutura química do 6 <sup>2</sup> -metil-agarobiitol (b).	44
Figura 17 - Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ de G-H <sub>2</sub> O-6D (a) e estrutura química do agarobiitol 6 <sup>2</sup> -sulfato (b).	46
Figura 18 - Espectro de HMQC ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ) da subfração G-H <sub>2</sub> O-6D (agarobiitol 6 <sup>2</sup> -sulfato).	47
Figura 19 - Cromatograma de exclusão de G-H <sub>2</sub> O-7 em Bio-Gel P-2.	49
Figura 20 - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (a) e $^{13}\text{C}$ (b) de G-H <sub>2</sub> O-7B.	50
Figura 21 - Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ de G-1A.	52
Figura 22 - Cromatografia em camada delgada das subfrações de G-1 e G-2.	53
Figura 23 - Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ de Ag-6S.	54

Figura 24 - Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ de Ag-6S após purificação em CCD.	55
Figura 25 - Esquema de purificação e oligossacarídeos obtidos a partir da hidrólise reductiva parcial das agaranas de <i>G. domingensis</i> .	57
Figura 26 - Esquema de extração dos polissacarídeos de <i>E. denticulatum</i> .	59
Figura 27 - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da fração ECW.	60
Figura 28 - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da fração EHW-I.	60
	61
Figura 29 - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da fração EHW-II.	
Figura 30 - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da fração EHW-I-TA.	63
Figura 31 - Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ da fração NEC-HRP, com ampliação da região entre 170 e 80 ppm.	64
Figura 32. Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ da fração NEC-DIAL.	66
Figura 33 - Cromatograma de troca aniônica da fração NEC-RET em DEAE-Sepharose CL-6B.	68
Figura 34 - Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ da fração NEC-H <sub>2</sub> O.	69
Figura 35 - Perfil de eluição da cromatografia de exclusão da fração NEC-H <sub>2</sub> O em Bio-Gel P-6 DG.	70
Figura 36 - Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ de NEC-H <sub>2</sub> O-1.	71
Figura 37 - Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ de NEC-H <sub>2</sub> O-2.	73
Figura 38 - Cromatograma de exclusão de NEC-H <sub>2</sub> O-2 em Bio-Gel P-2.	73
Figura 39 - Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ de NEC-H <sub>2</sub> O-2A após diálise.	74
Figura 40 - Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ de NEC-H <sub>2</sub> O-2B.	76
Figura 41 - Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ de NEC-010-1.	78
Figura 42. Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ DEPT de NEC-010-1.	79
Figura 43 - Espectro de RMN HMQC ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ) de NEC-010-1.	80
Figura 44 - Espectro de RMN COSY de NEC-010-1.	81
Figura 45 - Estrutura química do dissacarídeo carrabiitol 2 <sup>1</sup> ,4 <sup>2</sup> -disulfato.	82
Figura 46 - Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ de NEC-015-1.	85
Figura 47 - Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ de NEC-015-2.	86
Figura 48 - Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ de NEC-025-1.	88
Figura 49 - Estrutura química do dissacarídeo carratetraitol 2 <sup>1</sup> ,4 <sup>2</sup> ,2 <sup>3</sup> ,4 <sup>4</sup> -disulfato.	88
Figura 50 - Espectro de RMN de HMQC ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ) de NEC-025-1.	90

Figura 51 - Estrutura mostrando a unidade de $\alpha$ -3,6-anidro-D-galactopiranosose 2-sulfato presente nas carragenanas.	90
Figura 52 - Espectro de RMN de COSY de NEC-025-1.	91
Figura 53 - Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (a) e $^1\text{H}$ (b) de NEC-040-1.	95
Figura 54 - Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ de NEC-040-1-TA.	97
Figura 55 - Desulfatação alcalina em monossacarídeo (a) e na unidade de 3,6-anidro-D-galactitol 2-sulfato (b).	97
Figura 56 - Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ DEPT de NEC-040-1-TA.	99
Figura 57 - Espectro de HMQC ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ) de NEC-040-1-TA. Ampliação da região anomérica.	101
Figura 58 - Espectro de COSY de NEC-040-1-TA.	102
Figura 59 – Esquema de purificação e oligossacarídeos obtidos a partir da hidrólise redutiva parcial das carragenanas de <i>E. denticulatum</i> .	104

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Estruturas ideais das carragenanas	03
Tabela 2 - Assinalamento químico dos $^{13}\text{C}$ e $^1\text{H}$ do agarobiitol 6 <sup>2</sup> -sulfato.	48
Tabela 3 - Percentagem de <i>nu</i> e <i>iota</i> carragenana presente nas frações obtidas de <i>E. denticulatum</i> determinadas por RMN de $^1\text{H}$ .	62
Tabela 4 - Assinalamento químico dos $^{13}\text{C}$ e $^1\text{H}$ do carrabiitol 2 <sup>1</sup> ,4 <sup>2</sup> -disulfato.	83
Tabela 5 - Assinalamento químico dos $^{13}\text{C}$ e $^1\text{H}$ do carratetraitol 2 <sup>1</sup> ,4 <sup>2</sup> ,2 <sup>3</sup> ,4 <sup>2</sup> -tetrasulfato.	93

## LISTA DE ABREVIATURAS

- 4-MM: 4-metil-morfolina  
AT-III: antitrombina III  
B-4MM: complexo borano 4-metil-morfolina  
CCD: cromatografia de camada delgada  
CH-II: cofator de heparina II  
CLAE: cromatografia líquida de alta eficiência  
CMV: citomegalovirus  
COSY: *correlation spectroscopy*  
D<sub>2</sub>O: óxido de deutério  
DEPT: *distortionless enhancement by polarization transfer*  
DVB-S: divinil benzeno sulfonado  
EC: eletroforese capilar  
FCF-2: fator de crescimento de fibroblasto 2  
Galp: galactopiranosose  
HMQC: *heteronuclear multiple quantum correlation spectroscopy*  
HRP: hidrólise redutiva parcial  
HSV: vírus do herpes  
Hz: Hertz  
IES-EM: ionização por eletrospray acoplado a espectrometria de massa  
Me<sub>2</sub>SO: dimetilsulfóxido  
°C: grau Celcius  
PI-88: fosfomanopentaose sulfato  
ppm: partes por milhão  
RMN: ressonância magnética nuclear  
rpm: rotações por minuto  
SIDA: síndrome da imune deficiência adquirida  
TFA: ácido trifluoracético  
TOCSY: *total correlation spectroscopy*  
TTPA: tempo de tromboplastina parcial ativada  
G-HRP: hidrolisado obtido a partir dos polissacarídeos de *G. domingensis*.  
G-H<sub>2</sub>O: fração obtida a partir do eluato aquoso da cromatografia de troca aniônica de G-HRP.  
G-H<sub>2</sub>O-1 a 7: frações obtidas da cromatografia de exclusão em Sephadex G25 a partir de G-H<sub>2</sub>O.  
G-H<sub>2</sub>O-6A a D: frações obtidas da cromatografia de exclusão em Bio-Gel P-2 a partir de G-H<sub>2</sub>O-6.  
G-H<sub>2</sub>O-7A a D: frações obtidas da cromatografia de exclusão em Bio-Gel P-2 a partir de G-H<sub>2</sub>O-7.

G-1: fração obtida a partir do eluato do primeiro gradiente de NaCl da cromatografia de troca aniônica de G-HRP.

G-1A a B: frações obtidas da cromatografia de exclusão em Bio-Gel P-2 a partir de G-1.

G-2: fração obtida a partir do eluato do primeiro gradiente de NaCl da cromatografia de troca aniônica de G-HRP.

G-2A a C: frações obtidas da cromatografia de exclusão em Bio-Gel P-2 a partir de G-2.

Ag-6S: agrupamento das frações G-1B, G-2A, G-2B e G-2C.

G-3: fração obtida a partir do eluato do primeiro gradiente de NaCl da cromatografia de troca aniônica de G-HRP.

G-4: fração obtida a partir do eluato de NaCl 0,15M da cromatografia de troca aniônica de G-HRP.

G-5: fração obtida a partir do eluato do segundo gradiente de NaCl da cromatografia de troca aniônica de G-HRP.

G-6: fração obtida a partir do eluato NaCl 0,30 M da cromatografia de troca aniônica de G-HRP.

NEC-HRP: hidrolisado obtido a partir dos polissacarídeos de *E. denticulatum*.

NEC-DIAL: fração não retida pela diálise com membrana capaz de reter moléculas com massa molecular  $\geq 2000$  Da.

NEC-RET: fração retida pela diálise com membrana capaz de reter moléculas com massa molecular  $\geq 2000$  Da.

NEC-H<sub>2</sub>O: fração obtida a partir do eluato aquoso da cromatografia de troca aniônica de NEC-HRP.

NEC-H<sub>2</sub>O-1: fração obtida da cromatografia de exclusão em Bio-Gel P-6 DG a partir de NEC-H<sub>2</sub>O.

NEC-H<sub>2</sub>O-2: fração obtida da cromatografia de exclusão em Bio-Gel P-6 DG a partir de NEC-H<sub>2</sub>O.

NEC-H<sub>2</sub>O-2A: fração obtida da cromatografia de exclusão em Bio-Gel P-2 a partir de NEC-H<sub>2</sub>O-2.

NEC-H<sub>2</sub>O-2B: fração obtida da cromatografia de exclusão em Bio-Gel P-2 a partir de NEC-H<sub>2</sub>O-2.

NEC-005-1: fração obtida a partir do eluato de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,05 M da cromatografia de troca aniônica de NEC-HRP.

NEC-010-1: fração obtida a partir do eluato de  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$  0,10 M da cromatografia de troca aniônica de NEC-HRP.

NEC-015-1: fração obtida a partir do eluato de  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$  0,15 M da cromatografia de troca aniônica de NEC-HRP.

NEC-015-2: fração obtida a partir do eluato de  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$  0,15 M da cromatografia de troca aniônica de NEC-HRP.

NEC-020-1: fração obtida a partir do eluato de  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$  0,20 M da cromatografia de troca aniônica de NEC-HRP.

NEC-025-1: fração obtida a partir do eluato de  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$  0,25 M da cromatografia de troca aniônica de NEC-HRP.

NEC-030-1: fração obtida a partir do eluato de  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$  0,30 M da cromatografia de troca aniônica de NEC-HRP.

NEC-040-1: fração obtida a partir do eluato de  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$  0,40 M da cromatografia de troca aniônica de NEC-HRP.

NEC-040-1-TA: fração NEC-040-1 submetida a tratamento alcalino.



## RESUMO

A obtenção de oligossacarídeos, a partir de polissacarídeos, é um bom método para o estudo da estrutura química fina de biopolímeros, além de fornecer material para diversos estudos como RMN, IES-EM, EC, atividade biológica, entre outros. Neste trabalho foram utilizadas galactanas extraídas de duas algas vermelhas diferentes, *Gracilaria domingensis* e *Eucheuma denticulatum*, para obtenção de oligossacarídeos por hidrólise redutiva parcial. O hidrolisado de *G. domingensis* foi aplicado em coluna de troca aniônica (DEAE-Sephadex A25) e eluído com água destilada e gradiente contínuo de cloreto de sódio (0-0,3M). O eluato aquoso foi purificado por cromatografia de troca catiônica (DVB-S) e cromatografias de exclusão (Sephadex G25 e Bio-Gel P-2), sendo isolados e caracterizados por métodos espectroscópicos (RMN 1D e 2D) os seguintes dissacarídeos: agarobiitol ( $\beta$ -D-galactopiranosose-(1 $\rightarrow$ 4)-3,6-anidro-L-galactitol); 6<sup>2</sup>-O-metil agarobiitol ( $\beta$ -D-galactopiranosose-6-O-metil-(1 $\rightarrow$ 4)-3,6-anidro-L-galactitol) e agarobiitol 6<sup>2</sup>-sulfato ( $\beta$ -D-galactopiranosose-6-sulfato-(1 $\rightarrow$ 4)-3,6-anidro-L-galactitol). As frações obtidas da eluição com gradiente contínuo de cloreto de sódio foram desalificadas por cromatografia de exclusão e/ou extração com solvente orgânico, rendendo principalmente agarobiitol 6<sup>2</sup>-sulfato. Os polissacarídeos, tratados com álcali, de *E. denticulatum* foram submetidos à hidrólise redutiva parcial. O hidrolisado foi primeiramente purificado por cromatografia de troca catiônica (DVB-S) seguida de diálise fechada com membrana capaz de reter moléculas com massa molecular maior ou igual a 2000 Da. O material retido foi cromatografado em coluna de troca aniônica (DEAE-Sepharose CL-6B) e eluído com água destilada e gradiente descontínuo de carbonato de diamônio (0-0,4M). As frações obtidas foram estudadas com auxílio de métodos espectroscópicos, sendo identificado numa delas a presença de unidades de 4,6-O-(1'-carboxietilideno)- $\beta$ -D-galactopiranosose, nunca antes relatada para esta alga. Foi possível isolar dois oligossacarídeos alditóis puros: carrabiitol 2<sup>1</sup>,4<sup>2</sup>-disulfato ( $\beta$ -D-galactopiranosose-4-sulfato-(1 $\rightarrow$ 4)-3,6-anidro-D-galactitol-2-sulfato) e carratetraitol 2<sup>1</sup>,4<sup>2</sup>,2<sup>3</sup>,4<sup>4</sup>-tetrasulfato ( $\beta$ -D-galactopiranosose-4-sulfato-(1 $\rightarrow$ 4)-3,6-anidro- $\alpha$ -D-galactopiranosose-2-sulfato-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-galactopiranosose-4-sulfato-(1 $\rightarrow$ 4)-3,6-anidro-D-galactitol 2-sulfato). A hidrólise redutiva parcial e os processos de purificação utilizados permitiram isolar oligossacarídeos neutros, metilados e sulfatados com elevado grau de pureza. Os dois dissacarídeos obtidos a partir da hidrólise das carragenanas de *E. denticulatum* são de estrutura inédita, sendo pela primeira vez isolados e caracterizados.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 GALACTANAS DE ALGAS VERMELHAS

As algas são classificadas em divisões, numa delas encontramos as algas vermelhas (Rhodophyta). As macroalgas desta divisão são principalmente marinhas, caracterizadas pela presença de clorofila a e ficobilinas. Existem cerca de 4000 espécies de algas vermelhas, sendo a grande maioria de habitat marinho e pouco mais de 100 delas de ambiente de água doce.

De modo semelhante às plantas superiores, as algas marinhas apresentam sua parede celular composta basicamente por uma estrutura cristalina (esqueleto) embebida em uma matriz amorfa. A parede celular da maioria das algas vermelhas inclui um componente interno rígido formado por microfibrilas, que pode ser celulose ou outro polissacarídeo. A matriz é mucilagínosa, composta por polímeros de galactose sulfatada, os quais conferem flexibilidade e textura à alga (RAVEN et al., 1996).

Enquanto a maioria dos polissacarídeos biosintetizados pelas algas estão total ou parcialmente relacionados em sua estrutura com os das plantas terrestres, as galactanas sulfatadas isoladas das Rhodophyta, não apresentam nenhuma similaridade com os polissacarídeos de plantas terrestres.

As galactanas apresentam uma estrutura básica constituída por uma cadeia linear alternada de ( $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-galactopiranoose, denominada unidade A, e unidades de ( $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -galactopiranoose, unidade B. Frequentemente encontra-se nesta última unidade o derivado 3,6-anidro-galactopiranoose. De acordo com a estereoquímica da unidade B, as galactanas podem ser classificadas como: agaranas, onde esta unidade pertence à série L; e carragenanas quando pertence à série D (PAINTER, 1983). Existem ainda galactanas cuja unidade B pode pertencer tanto a série D como L, sendo denominadas de galactanas híbridas (STORTZ e CEREZO, 2000).

A estrutura básica e repetitiva das galactanas é geralmente modificada por diferentes tipos de substituintes, tais como: *O*-sulfato, *O*-metil, *O*-glicosil e 4,6-*O*-(1'-carboxietilideno). Isso torna estes polímeros ainda mais complexos (KNUTSEN et al., 1994).

Considerando os padrões de substituição foram definidos diferentes tipos de carragenanas, denominadas cada uma com uma letra grega. Estes polissacarídeos foram classificados em diferentes grupos, utilizando como critério o padrão de sulfatação da unidade A. Estes nomes - mesmo não seguindo a nomenclatura específica para carboidratos - são utilizados até hoje no comércio, artigos científicos e legislação.

A família *kappa* ( $\kappa$ ) é formada pelas carragenanas que apresentam a unidade A sulfatada em carbono quatro (C-4); a família *lambda* ( $\lambda$ ) em carbono dois (C-2); a família *omega* ( $\omega$ ) em carbono seis (C-6) e a família *beta* ( $\beta$ ) não apresentam a unidade A sulfatada. A substituição na unidade B, por grupos sulfatos e ainda a presença ou não de 3,6-anidrogactose, possibilita uma variabilidade de estruturas presentes em cada família. As estruturas presentes na Tabela 1 representam as chamadas estruturas repetitivas ideais das carragenanas. Entretanto, dificilmente são encontradas na natureza estruturas polissacarídicas totalmente repetitivas e sim estruturas híbridas entre duas ou mais estruturas ideais. Dessa forma este sistema de descrição tem se tornado confuso, não sendo muito adequado para descrever as carragenanas encontradas na natureza.

As agaranas não possuem um sistema de classificação baseado em letras gregas como as carragenanas. A presença de substituintes *O*-metil e 4,6-*O*-(1'-carboxietilideno) é mais freqüente e grupos sulfatos podem estar presentes tanto na unidade A como B (STORTZ e CERESO, 2000).

TABELA 1 - ESTRUTURAS IDEAIS DAS CARRAGENANAS.

Estrutura	Subtipo	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	Cód. Letras <sup>a</sup>
<b>Família Kappa (κ)</b>							
	<i>Kappa</i> (κ)	H	-	-			G4S-DA
	<i>Iota</i> (ι)	SO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	-	-			G4S-DA2S
	<i>Mu</i> (μ)	-	H	SO <sub>3</sub> <sup>-</sup>			G4S-D6S
	<i>Nu</i> (ν)	-	SO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	SO <sub>3</sub> <sup>-</sup>			G4S-D2S,6S
	<i>Omicron</i> (ο)	-	SO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	H			G4S-D2S
<b>Família Lambda (λ)</b>							
	<i>Lambda</i> (λ)	-	SO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	SO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	H	H	G2S-D2S,6S
	<i>Xi</i> (ξ)	-	SO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	H	H	H	G2S-D2S
	<i>Pi</i> (π)	-	SO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	H	Pir.	Pir.	GP,2S-D2S
	<i>Theta</i> (θ)	SO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	-	-	-	-	G2S-DA2S
<b>Família Beta (β)</b>							
	<i>Beta</i> (β)	H	-	-			G-DA
	<i>Alfa</i> (α)	SO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	-	-			G-DA2S
	<i>Gamma</i> (γ)	-	H	SO <sub>3</sub> <sup>-</sup>			G-D6S
	<i>Delta</i> (δ)	-	SO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	SO <sub>3</sub> <sup>-</sup>			G-D2S,6S
<b>Família Omega (ω)</b>							
	<i>Omega</i> (ω)	H	-				G6S-DA
	<i>Psi</i> (ψ)	-	SO <sub>3</sub> <sup>-</sup>				G6S-D6S

<sup>a</sup> De acordo com a definição de KNUTSEN et al. (1994).

KNUTSEN et al. (1994) propuseram uma nomenclatura para carragenanas e agaranas. A unidade A,  $\beta$ -D-galactopiranosose, é sempre identificada pela letra G. A unidade B quando for  $\alpha$ -galactopiranosose, é designada pela letra L ou D, conforme a série enantiomérica que pertençam. A 3,6-anidro-galactopiranosose é denominada de LA, em agaranas, e DA em carragenanas. A posição do substituinte é indicada pelo número do carbono ao qual ele está ligado. Hemi-ester sulfato, metil e 4,6-O-(1'-carboxietilideno) são designados pelas letras S, M e P respectivamente (Tabela 1).

As galactanas de algas vermelhas são alvo de atenção devido ao seu valor econômico. As agaranas são utilizadas pela indústria para confecção de cápsulas, como material para moldes dentários, base para cosméticos, agente antidessecante e espessante pela indústria alimentícia. A agarose purificada é o gel frequentemente utilizado em eletroforese, na experimentação bioquímica, e meio de cultura para bactérias e outros microorganismos (RAVEN et al., 1996). As carragenanas são utilizadas como estabilizante de emulsão, espessante e geleificante principalmente na indústria alimentícia, tendo movimentado em vendas mundiais no ano de 2000 cerca de 310 milhões de dólares (VAN de VELDE et al., 2000).

## 1.2 OLIGOSSACARÍDEOS

Por definição oligossacarídeo é um composto, que através de hidrólise, fornece um pequeno número de unidades monossacarídicas (STANEK et al., 1965). De acordo com o número de unidades presentes, os oligossacarídeos são classificados como dissacarídeos, trissacarídeos, tetrassacarídeos e assim por diante. Exercem várias funções em sistemas biológicos, tais como: estrutural, de reserva, osmoregulação, reconhecimento celular, etc.

Segundo KANDLER e HOPF (1980) oligossacarídeos primários são aqueles sintetizados *in vivo* a partir de um mono ou oligossacarídeo e um doador glicosil, pela ação de uma glicosiltransferase. Os oligossacarídeos secundários são aqueles originários da hidrólise, *in vivo* ou *in vitro*, a partir de oligossacarídeos maiores, polissacarídeos, glicoproteínas ou glicolipídeos.

Oligossacarídeos podem ser obtidos por extração direta de fontes naturais, a partir de hidrólise química ou enzimática de estruturas maiores como polissacarídeos e glicoconjugados e através de síntese química e/ou enzimática.

A síntese química de oligossacarídeos envolve várias etapas e exige a necessidade de proteção e exposição, por grupos adequados, das hidroxilas dos monossacarídeos. ZENG et al. (2003), sintetizaram penta e octassacarídeos apresentando uma cadeia constituída de  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)-galactopirranose com ramificações  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 2) de arabinofuranose. A síntese envolveu várias etapas com a necessidade de proteção e desproteção das hidroxilas de galactose e arabinose com grupos benzoil e acetil.

Na síntese enzimática de oligossacarídeos e glicosídeos principalmente duas classes de enzimas são utilizadas: glicosiltransferases e glicosidasas. Passos de síntese química ainda podem ser combinados com o uso de enzimas (AUGÉ et al., 1999).

O uso de enzimas, em polissacarídeos e glicoconjugados, possibilita a clivagem de ligações específicas sendo uma importante ferramenta para obtenção de oligossacarídeos (KNUTSEN et al., 2001; NOMURA et al., 1998), além de auxiliar no estudo da estrutura química destas moléculas (SAKAMOTO e SAKAI, 1995). A utilização de enzimas permite tanto a clivagem de ligações mais resistentes à hidrólise ácida, quanto à obtenção de oligossacarídeos com unidades extremamente sensíveis à presença de ácidos.

Algumas bactérias de ambiente marinho produzem enzimas que são capazes de degradar galactanas sulfatadas encontradas na matriz extracelular de algas vermelhas. De acordo com a especificidade por agaranas ou carragenanas estas enzimas são denominadas agarases ou carragenases, respectivamente. A atividade de agarases e carragenases é dependente do padrão de substituição do polissacarídeo.

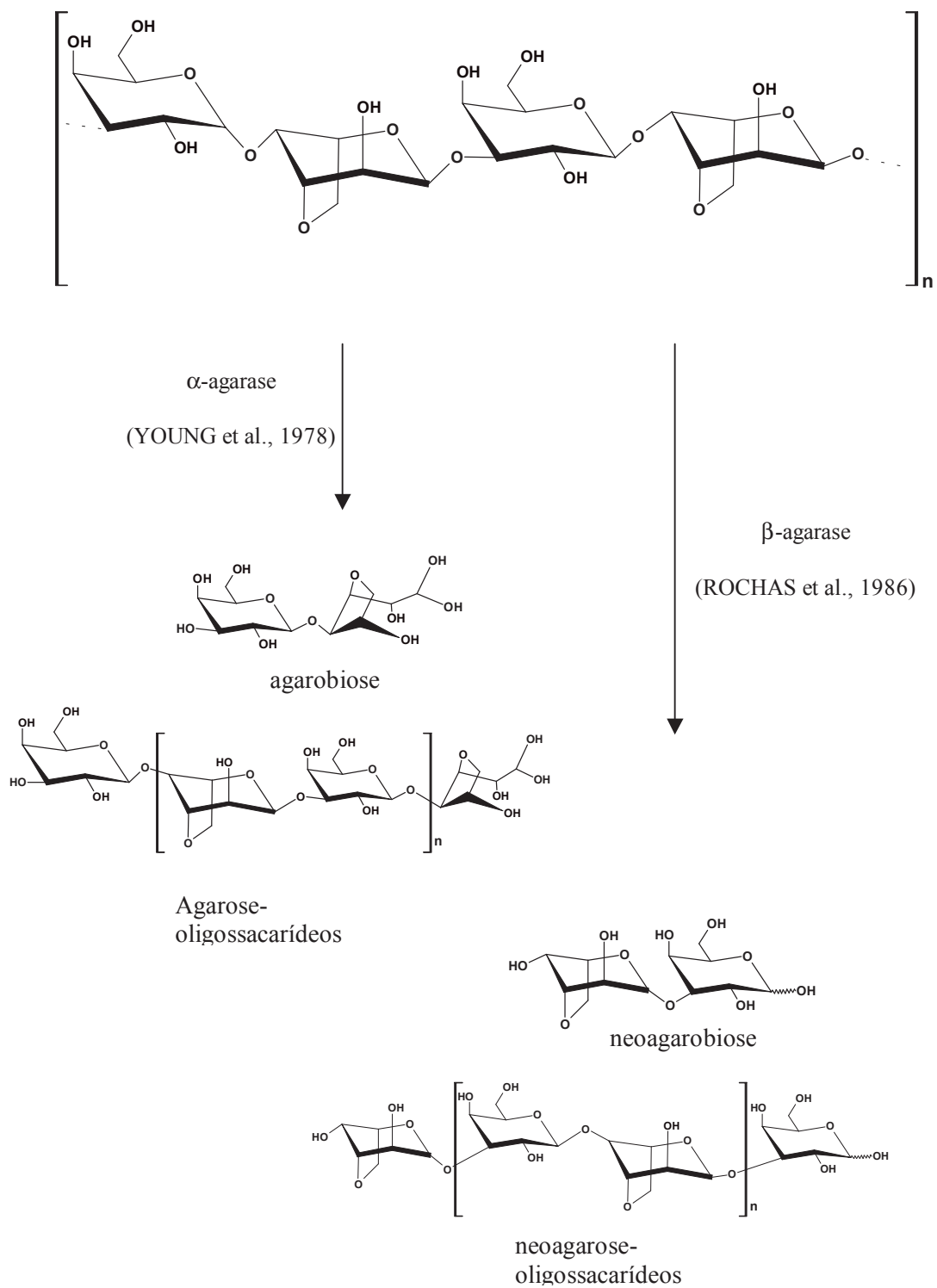
São descritas agarases capazes de catalisar a quebra das ligações  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3) (YOUNG et al., 1978) e  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) (ROCHAS et al., 1986). Muitas destas enzimas já foram purificadas e clonadas, sendo usadas comercialmente em pequena escala. Dois tipos de oligossacarídeos podem ser formados: agarose-oligossacarídeos obtidos a

partir da hidrólise da ligação alfa; neoagarose-oligossacarídeos obtidos a partir da hidrólise da ligação beta (Figura 1).

Muitas carragenases tem sido descritas, entretanto, estas enzimas possuem como substrato principal *kappa*-carragenana ou *iota*-carragenana. A enzima mais caracterizada é a *kappa*-carragenase, isolada de *Alteromonas carragenovora*, que tem como alvo a ligação  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) envolvendo os resíduos de galactopiranosose 4-sulfato (unidade A) e 3,6-anidro-galactopiranosose (unidade B). São formados neocarragenose-oligossacarídeos contendo 3,6-anidro-galactopiranosose como terminal não redutor. Infelizmente nenhuma carragenase esta disponível comercialmente. Até agora, nenhuma enzima capaz de hidrolisar ligações alfa de carragenana foi descrita (De RUITER e RUDOLPH, 1997).

Agarases e carragenases são usadas no estudo químico de galactanas sulfatadas. Os oligossacarídeos obtidos são utilizados em estudos de ressonância magnética nuclear (RMN), de  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$ , fornecendo importantes informações estruturais destes biopolímeros. LAHAYE et al. (1989) utilizaram uma  $\beta$ -agarase, obtida de *Pseudomonas atlantica*, para hidrolisar agaranas extraídas de várias algas do gênero *Gracilaria*. Os oligossacarídeos apresentaram substituição por grupos *O*-sulfato, *O*-metil e 4,6-*O*-(1'-carboxietilideno), sendo utilizados em estudos de RMN de  $^{13}\text{C}$ . EKEBERG et al. (2001) obtiveram uma mistura de oligossacarídeos utilizando *kappa*-carragenase. Os oligossacarídeos foram separados por cromatografia de exclusão e analisados por ionização por electrospray acoplado a espectrometria de massa (IES-EM).

FIGURA 1 - DEGRADAÇÃO DA AGAROSE POR  $\alpha$  E  $\beta$ -AGARASE.





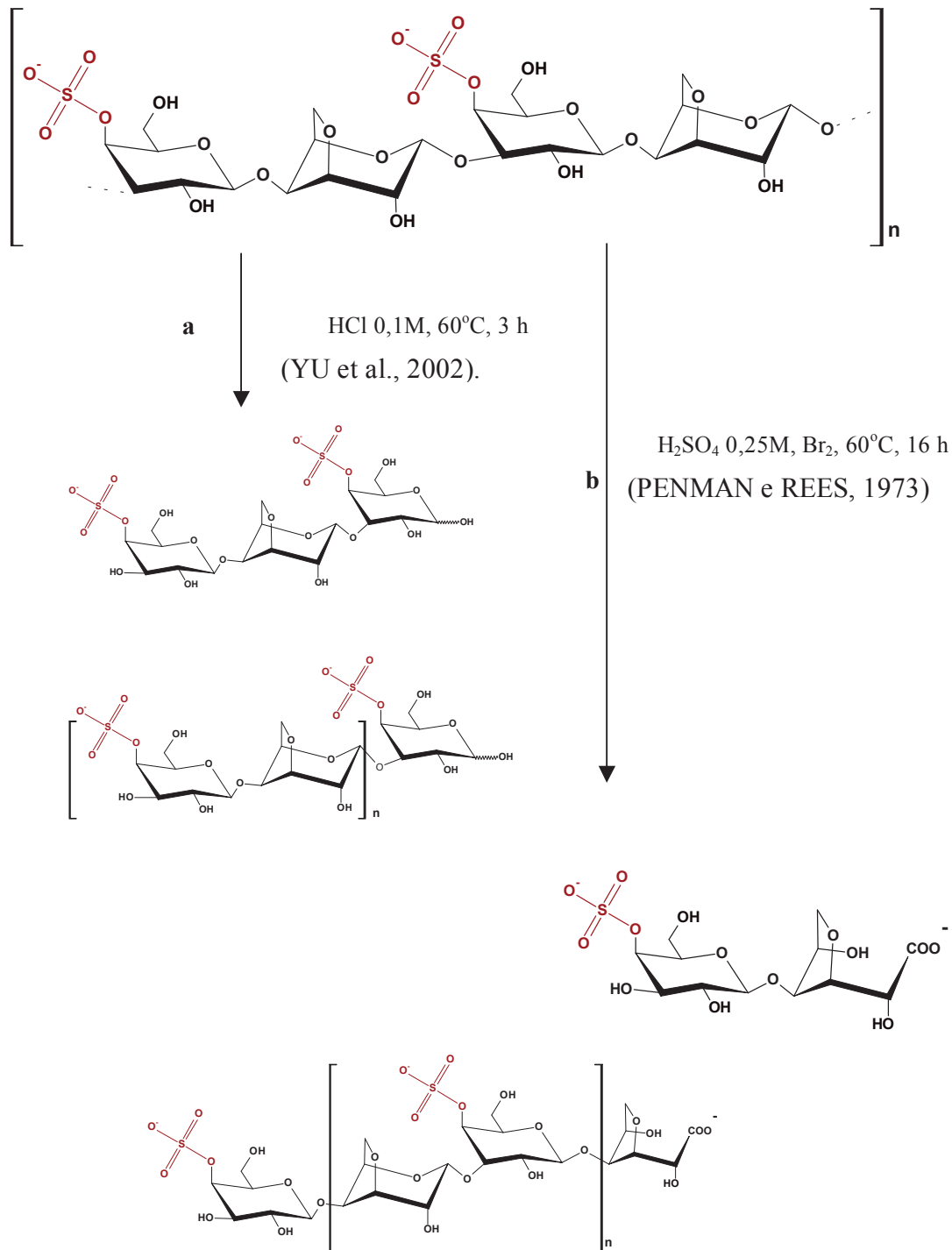
A hidrólise ácida parcial também é um importante método para obtenção de oligossacarídeos. Entretanto, as condições de hidrólise devem ser muito bem controladas, podendo ser determinadas a partir de curvas de hidrólise. Dependendo das condições de hidrólise e da distribuição das ligações glicosídicas mais suscetíveis, a despolimerização parcial pode gerar misturas de oligossacarídeos com massa molecular relativamente baixa e, em alguns casos, fragmentos resistentes (polissacarídeos parcialmente degradados). Neste caso, estes fragmentos podem ser removidos por uso de filtração em gel ou precipitação com solventes, como por exemplo, acetona ou etanol (PAINTER, 1983).

YU et al. (2002) obtiveram oligossacarídeos, a partir de *kappa*-carragenana comercial, através de hidrólise branda com ácido clorídrico (Figura 2a). Os oligossacarídeos foram separados por cromatografia de troca aniônica de alta eficiência e caracterizados por análises de RMN mono e bidimensionais, além de ISE-EM. Os oligossacarídeos apresentaram número ímpar de unidades monossacarídicas (penta, hepta e undecassacarídeos), e todos apresentaram galactopiranosose 4-sulfato como terminal redutor e não redutor.

A hidrólise ácida parcial de galactanas sulfatadas é difícil de se controlar, sendo freqüente a degradação de resíduos de 3,6-anidrogactose e a perda de grupos sulfato. Um modo de reduzir a perda do derivado anidro da galactose é combinar a hidrólise ácida parcial com reações de oxidação ou redução.

PENMAN e REES (1973) hidrolisaram uma *kappa*-carragenana com ácido sulfúrico 0,25M na presença de bromo. Nestas condições ocorre quebra das ligações 3,6-anidro-galactosídicas, mais lábeis, e posterior oxidação pelo bromo dos resíduos de 3,6-anidro-galactose a ácido 3,6-anidro-galactônico (Figura 2b). A mistura oligossacarídica foi separada por cromatografia de troca aniônica e os oligossacarídeos caracterizados utilizando análise de metilação, infravermelho e perfis de migração em cromatografia e eletroforese de papel.

FIGURA 2 - HIDRÓLISE ÁCIDA PARCIAL (a) E OXIDATIVA (b) DE *KAPPA*-CARRAGENANA.

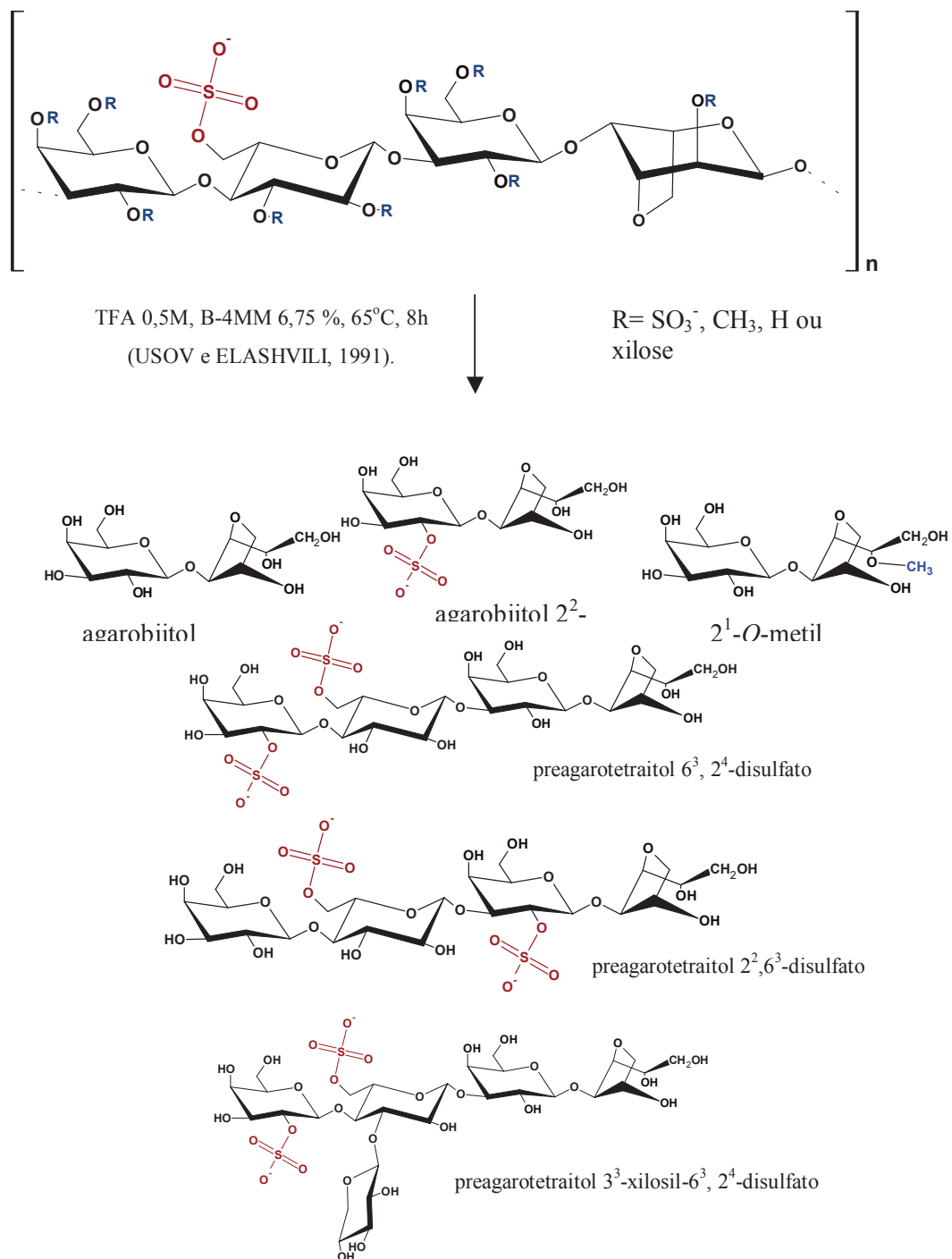


A hidrólise redutiva parcial (HRP) é muito utilizada para análise estrutural de galactanas sulfatadas, sendo introduzida inicialmente por USOV e ELASHVILI (1991), e paralelamente por STEVENSON e FURNEAUX (1991). A HRP utiliza o complexo borano-4-metil-morfolina (B-4MM), um agente redutor estável em meio ácido. Nas condições de hidrólise as ligações  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3) que estiverem envolvendo a 3,6-anidro-galactopiranosose (unidade B) irão se desfazer. Após a clivagem da ligação o B-4MM reduz o carbono anomérico do derivado anidro da galactose, gerando 3,6-anidro-galactitol.

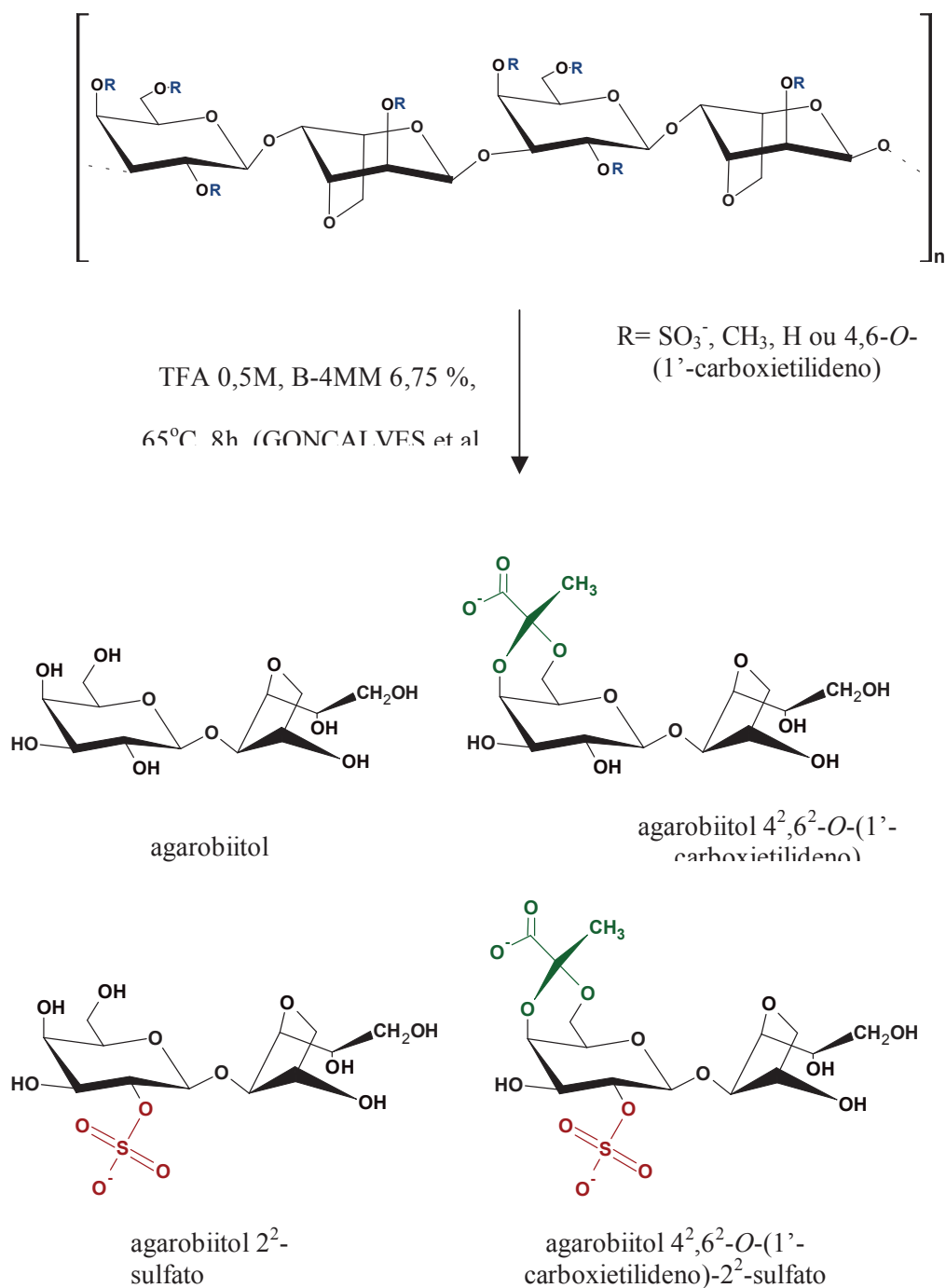
USOV e ELASHVILI (1991), utilizaram a hidrólise redutiva parcial para estudar a agarana sulfatada de *Laurencia nipponica* (Figura 3). A mistura oligossacarídica foi purificada utilizando cromatografia de troca aniônica e fase reversa. Os oligossacarídeos foram caracterizados por espectrometria de massa de íon secundário e RMN de  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$ . Foram obtidos agarobiitol e agarobiitol 2<sup>2</sup>-sulfato como principais componentes, além de tetrassacarídeos alditóis.

GONÇALVES et al. (2002) obtiveram oligossacarídeos alditóis, por HRP, de uma agarana pré-tratada com álcali de *Acanthophora spicifera* (Figura 4). Os oligossacarídeos foram separados por cromatografia de adsorção, troca aniônica e exclusão, sendo caracterizados por IES-EM e RMN mono e bidimensionais. Foram obtidos quatro dissacarídeos alditóis: agarobiitol; agarobiitol 2<sup>2</sup>-sulfato, agarobiitol 4<sup>2</sup>,6<sup>2</sup>-O-(1'-carboxietilideno) e agarobiitol 4<sup>2</sup>,6<sup>2</sup>-O-(1'-carboxietilideno)-2<sup>2</sup>-sulfato, demonstrando que as condições de hidrólise mantêm tanto os grupos sulfatos quanto os 4,6-O-(1'-carboxietilideno).

FIGURA 3 - HIDRÓLISE REDUTIVA PARCIAL DAS AGARANAS DE *Laurencia nipponica*.



**FIGURA 4 - HIDRÓLISE REDUTIVA PARCIAL DAS AGARANAS DE *Acanthophora spicifera*.**



### **1.3 ATIVIDADE BIOLÓGICA**

Estudos têm demonstrado que a diversidade e complexidade estrutural dos carboidratos estão relacionadas com as diversas funções exercidas por essas moléculas em sistemas biológicos. Uma diversidade de estruturas oligossacarídicas são encontradas, ligadas a proteínas e lipídeos, na superfície celular. Muitos estudos têm revelado que estas estruturas estão envolvidas no reconhecimento celular, tendo importante função para o sistema imune. Além disso, tem-se observado a importância dos carboidratos como receptores para toxinas, vírus e hormônios, o que torna estas moléculas alvos para o desenvolvimento de drogas (WITCZAK, 1997).

#### **1.3.1 ATIVIDADE ANTICOAGULANTE**

Heparina, uma glicosaminoglicana sulfatada, vem sendo usada na profilaxia e tratamento de trombose desde 1935. O mecanismo de ação ocorre através do aumento da atividade enzimática da antitrombina-III (AT-III) e cofator de heparina II (CH-II) – proteínas inibidoras de serina-proteases envolvidas na cascata de coagulação. Estudos têm mostrado que a interação entre AT-III e heparina envolve uma seqüência pentassacarídea bem definida e resíduos de lisina da proteína. Entretanto, a heparina mostra algumas desvantagens como extrema diversidade estrutural, problemas com contaminação de patógenos animais e baixa biodisponibilidade. Tratamentos químicos ou enzimáticos são usados para hidrolisar heparina. Estes fragmentos de baixa massa molecular (2 a 8 kDa) também são usados na clínica e apresentam importantes vantagens sobre a heparina, como maior biodisponibilidade e maior tempo de meia vida. Buscando atividade anticoagulante e antitrombótica muitos oligossacarídeos sulfatados vem sendo sintetizados. São exemplos: ácidos lactobiônicos sulfatados e análogos da seqüência pentassacarídica de heparina que ativa AT-III. (ALBAN, 1997).

WALL et al. (2001) sulfataram quimicamente 17 oligossacarídeos e testaram estas moléculas frente ao tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA). Nove dos

oligosacarídeos exibiram atividade anticoagulante significativa, que mostrou ser dependente do tamanho da cadeia oligossacarídica.

Nos últimos anos diversos estudos têm mostrado que a heparina exerce, além de atividades anticoagulantes e antitrombóticas, uma infinidade de outras atividades biológicas. O grande número de cargas negativas no polímero, devido aos grupos sulfato, possibilita interações iônicas com aminoácidos básicos presente em proteínas. São relatadas atividades antiaterosclerótica, sobre a proliferação de células musculares lisas, inibição do complemento, antiinflamatória, angiogênica e antiangiogênica, antiviral e até mesmo regulação de eventos nucleares (LINHARDT e TOIDA, 1997).

Devido a grande diversidade de eventos biológicos que tem a participação de glicosaminoglicanas, a descoberta de novas moléculas que mimetizem ou bloqueiem estas ações tem se tornado um campo bastante promissor.

### **1.3.2 ATIVIDADE ANTIANGIOGÊNICA**

KÄSBAUER et al. (2001) demonstraram que  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-galacto-oligosacarídeos sulfatados quimicamente, contendo entre 5 e 9 unidades monossacarídeas, são potentes inibidores de angiogênese.

Dois oligossacarídeos sulfatados, fosfomanopentaose sulfato (PI-88) - uma mistura de oligossacarídeos formados por 2 a 6 unidades de manose que apresentam um grupo fosfato natural e vários grupos sulfatos obtidos por síntese química - e maltohexose sulfato demonstraram uma importante propriedade antiangiogênica e anti-heparanase. A atividade da fosfomanopentaose sulfato foi estudada em mais detalhes, sendo demonstrado: inibição do crescimento de adenocarcinoma mamário de rato altamente invasivo (13762 MAT), diminuição da vascularidade de tumores e uma potente inibição de metástase carregada por sangue (PARISH et al., 1999). PI-88 esta em fase II de testes clínicos para estabelecer sua eficiência em pacientes com câncer.

FRANCIS et al. (2003) utilizaram a fosfomanopentaose para bloquear a proliferação celular de células musculares lisas, após angioplastia coronariana. Os autores sugerem que a inibição da proliferação celular, em ratos e coelhos, acontece

por dois mecanismos: inibição da enzima heparanase e/ou bloqueio do fator de crescimento de fibroblasto 2 (FCF-2).

### 1.3.3 ATIVIDADE ANTIVIRAL

No começo da década de sessenta foi demonstrado que a heparina e outras substâncias polianiónicas agiam como inibidores do vírus da herpes. Desde a década de oitenta tem-se demonstrado a ação de polissacarídeos sulfatados, obtidos de diversas fontes, sobre vírus envelopados tais como: vírus da herpes (HSV), citomegalovírus (CMV) e vírus da SIDA (síndrome da imune deficiência adquirida) humana (WITVROUW et al., 1997). Desde então, tem-se procurado estruturas menores que possuam atividade biológica.

KATSURAYA et al. (1999) sintetizaram alquil-glicosídeos sulfatados a partir de oligossacarídeos de laminarana, ( $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glucopiranoose, com alta atividade anti-SIDA. Estes glicosídeos foram sintetizados através do tratamento dos oligossacarídeos, previamente peracetilados, com vários alcoóis e ácidos de Lewis como catalisadores. Foi realizada uma sulfatação química e observado o aumento do efeito anti-SIDA com o índice de sulfatação e com a hidrofobicidade proporcionada pelo radical alquila ligado. A entrada do vírus da SIDA na célula é provavelmente inibida devido a interações entre o oligossacarídeo sulfatado e a glicoproteína gp120, rica em cargas positivas e responsável pela adsorção do vírus na superfície celular (URYU et al., 1992).

Os vírus da herpes tipo 1 e 2 (HSV-1 e HSV-2), ligam-se as células através de interações entre glicoproteínas do envelope viral (gB e/ou gC) com o heparan sulfato presente na superfície celular. Após essa primeira interação, uma terceira glicoproteína viral (gD), interage com um ou mais receptores específicos, resultando na fusão do envelope viral com a membrana celular. Foi demonstrado que células - antes resistentes à infecção pelo vírus da herpes - passaram a ser susceptíveis após expressar D-glucosamina-3-O-sulfotransferase. Os vários subtipos existentes desta enzima são responsáveis pela adição de grupos sulfatos na posição OH-3 de glucosamina no



heparan sulfato. Ao modificar o polissacarídeo, criam sítios para ligação de proteínas virais (SHUKLA et al., 1999).

LIU et al. (2002) caracterizaram um octassacarídeo heptasulfatado, obtido de heparan sulfato, que liga a glicoproteína D (gD). Os autores também demonstraram a importância da posição dos grupos sulfatos para a interação oligossacarídeo-proteína, além de fornecer informação estrutural para o desenvolvimento de novas drogas contra o vírus da herpes.

NYBERG et al. (2004) conseguiram inibir a transmissão intercelular do vírus da herpes utilizando PI-88. O efeito observado abre uma nova perspectiva sobre a potencial aplicação de carboidratos sulfatados para o tratamento tópico de lesões provocadas por HSV.

Polissacarídeos sulfatados obtidos de algas marinhas tem mostrado atividade antitumoral (FERNÁNDEZ et al., 1989), antiviral (DUARTE et al. 2004) e anticoagulante (GÜVEN et al., 1991). Dessa forma a obtenção de oligossacarídeos a partir de polissacarídeos naturalmente sulfatados, torna-se um importante campo possibilitando a identificação de estruturas chaves que desempenham a atividade biológica. Os oligossacarídeos podem ser obtidos em grandes quantidades, além de possuir uma estereoquímica bem definida, possibilitando um estudo da estrutura-atividade muito mais específico.

#### **1.4 JUSTIFICATIVA DO TRABALHO**

Um bom método para se estudar a estrutura química das galactanas sulfatadas obtidas de algas vermelhas é através da obtenção de oligossacarídeos. Dessa forma a padronização de metodologias eficientes para a obtenção, purificação e determinação da estrutura química são importantes.

Estudos de RMN mono e bidimensionais utilizando oligossacarídeos fornecem informações importantes, que podem ser usadas no estudo de galactanas complexas. Oligossacarídeos puros podem ser usados, como padrões, no desenvolvimento de novas metodologias analíticas, como por exemplo: em cromatografia líquida de alta

eficiência (CLAE), eletroforese capilar (EC), ionização por electrospray acoplado a espectrometria de massa (IES-EM), entre outras.

Existe ainda a possibilidade de se utilizar oligossacarídeos, neutros ou sulfatados, em síntese química buscando melhorar ou alcançar determinada atividade biológica.

Neste trabalho foram utilizadas galactanas extraídas de duas algas diferentes, *Gracilaria domingensis* e *Eucheuma denticulatum*, para obtenção de oligossacarídeos por hidrólise reductiva parcial.

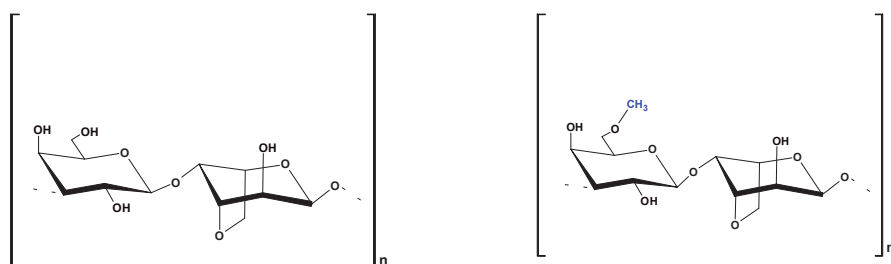
#### 1.4.1 *Gracilaria domingensis* (Kützinger) Sonder

As algas pertencentes ao gênero *Gracilaria* são classificadas dentro da família Gracilariaceae e ordem Gracilariales. Os polissacarídeos extraídos de várias espécies de *Gracilaria* têm sido extensivamente estudados, quanto à estrutura e propriedade, por diversos métodos químicos (TAKANO et al., 1995), enzimáticos e espectroscópicos (LAHAYE et al., 1989). Os principais polissacarídeos produzidos são agaranas neutras, ou ainda substituídas por grupos *O*-sulfato, *O*-metil e 4,6-*O*-(1'-carboxietilideno). As algas deste gênero são uma importante fonte de ágar para indústria (RENN, 1997).

MAZUMDER et al. (2002) determinaram a estrutura da agarana extraída de *G. corticata*. Esta alga biosintetiza agaranas com grupos sulfatos localizados em C-4 das unidades de (→3)-β-D-galactopiranosose e C-6 de (→4)-α-L-galactopiranosose. Foram obtidos extratos contendo agaranas substituídas por 4,6-*O*-(1'-carboxietilideno) e variável grau de metilação, principalmente em C-6 da unidade A e C-2 da unidade B.

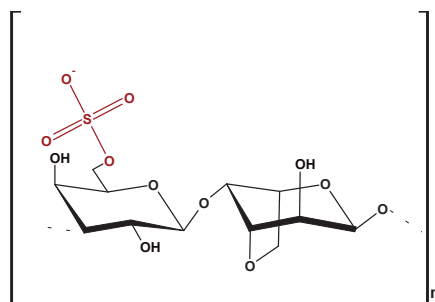
GUIMARÃES (2000) demonstrou que não havia diferença entre as agaranas produzidas por morfotipos vermelhos e verdes de *G. domingensis*. As galactanas foram analisadas por RMN <sup>13</sup>C e composição monossacarídica, tendo se mostrado semelhante às estruturas descritas para esta alga por FERNÁNDEZ et al. (1989) e VALIENTE et al. (1992). *G. domingensis* produz agaranas parcialmente sulfatadas e *O*-metiladas em C-6 da unidade A (Figura 5).

**FIGURA 5 - ESTRUTURAS REPETITIVAS PRESENTES NAS AGARANAS BIOSINTETIZADAS POR *Gracilaria domingensis* (FERNÁNDEZ et al., 1989; VALIENTE et al., 1992; GUIMARÃES, 2000).**



$[(\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-Galp-(1}\rightarrow 4)\text{-}3,6\text{-anidro-}\alpha\text{-L-Galp-(1}\rightarrow)]_n$

$[(\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-Galp-6-O-metil-(1}\rightarrow 4)\text{-}3,6\text{-anidro-}\alpha\text{-L-Galp-}]_n$



$[(\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-Galp-6-sulfato-(1}\rightarrow 4)\text{-}3,6\text{-anidro-}\alpha\text{-L-Galp-(1}\rightarrow)]_n$

#### 1.4.2 *Eucheuma denticulatum* (N.L. Burman) F.S. Collins e Hervey

As algas do gênero *Eucheuma* pertencem à família Solieriaceae e ordem Gigartinales. Estas algas produzem galactanas do tipo carragenana, sendo uma importante fonte para a indústria.

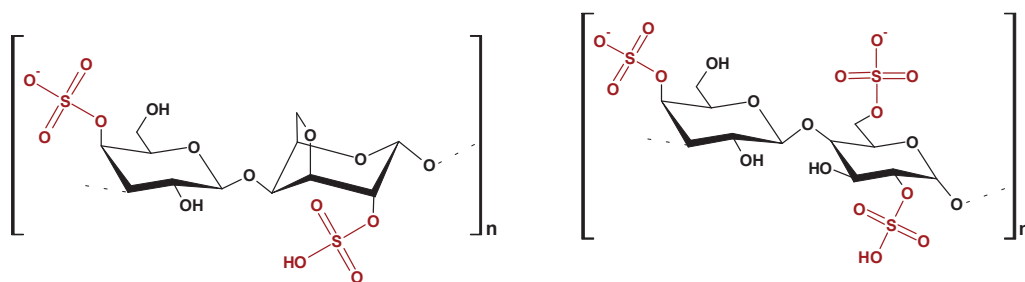
Diversos trabalhos têm descrito a estrutura química dos polissacarídeos produzidos por *Eucheuma spp.* GREER e YAPHE (1984), utilizando *kappa* e *iota*-

carragenases conjuntamente com análises de RMN de  $^{13}\text{C}$  e infravermelho, demonstraram que *E. gelatinae* produz carragenanas do tipo *beta*, *gamma* e *kappa*.

*Eucheuma denticulatum* é uma das principais espécies cultivadas utilizada na produção de carragenana (de RUITER e RUDOLPH, 1997). As galactanas produzidas por esta alga foram exaustivamente estudadas, tendo sido caracterizadas principalmente como *nu* e *iota*-carragenana (ANDERSON et al., 1973; AGUILAN et al., 2003). VIANA et al. (2004), utilizando o extrato a frio obtido de *E. denticulatum*, estudaram a cinética de ciclização das unidades de  $\alpha$ -D-galactopiranosose 2,6-disulfato (*nu*) em 3,6-anidro-D-galactopiranosose 2-sulfato (*iota*). A velocidade de ciclização a 70°C mostrou-se mais rápida que as determinadas para a porfirana ( $\beta$ -D-galactopiranosose ligada a  $\alpha$ -L-galactopiranosose 6-sulfato) e *lambda*-carragenana ( $\beta$ -D-galactopiranosose 2-sulfato ligada a  $\alpha$ -D-galactopiranosose 2,6-disulfato). A facilidade de transformação de *nu* em *iota*-carragenana, em condições leves, pode ser usada na indústria de produção destes polissacarídeos. As condições brandas de ciclização evitam a degradação e aumentam a força do gel.

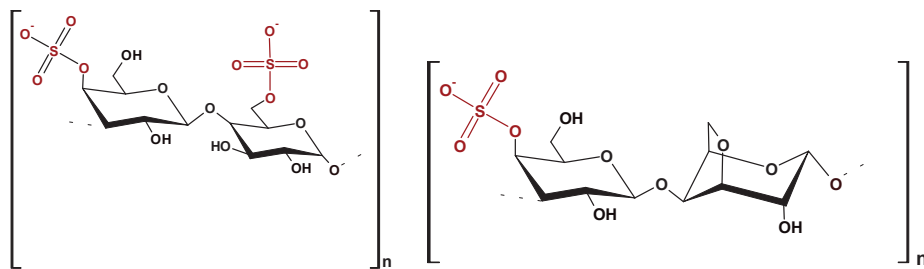
Estudos utilizando *iota* e *kappa*-carragenases realizados por BELLION et al. (1982) demonstraram que extratos alcalinos obtidos de *E. denticulatum* apresentaram pequenas quantidades de *kappa*-carragenana. AGUILAN et al. (2003) estudando extratos brutos a quente e tratados com álcali por RMN de  $^1\text{H}$ , não observaram a presença de *kappa*-carragenana. Entretanto análises mostraram que o precursor da *kappa*, a *nu*-carragenana, poderia estar presente. A Figura 6 mostra as principais estruturas repetitivas biosintetizadas por esta alga.

**FIGURA 6 - ESTRUTURAS REPETITIVAS PRESENTES NAS CARRAGENANAS BIOSINTETIZADAS POR *Eucheuma denticulatum* (ANDERSON et al., 1973; BELLION et al., 1982; AGUILAN et al., 2003).**



$[(\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-Galp-4-sulfato-(1}\rightarrow 4)\text{-3,6-anidro-}\alpha\text{-D-Galp-2-sulfato-(1}\rightarrow)]_n$

$[(\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-Galp-4-sulfato-(1}\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-Galp-2,6-disulfato-(1}\rightarrow)]_n$



$[(\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-Galp-4-sulfato-(1}\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-Galp-6-sulfato-(1}\rightarrow)]_n$

$[(\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-Galp-4-sulfato-(1}\rightarrow 4)\text{-3,6-anidro-}\alpha\text{-D-Galp-(1}\rightarrow)]_n$

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVOS GERAIS

O objetivo geral deste trabalho é a obtenção de oligossacarídeos, a partir dos polissacarídeos das algas vermelhas *Gracilaria domingensis* e *Eucheuma denticulatum*, para análises estruturais.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Extração dos polissacarídeos de *E. denticulatum*;
- Hidrólise redutiva parcial dos polissacarídeos sulfatados isolados das algas vermelhas *E. denticulatum* e *G. domingensis*;
- Comparação entre as metodologias utilizadas para purificação e fracionamento de oligossacarídeos obtidos por hidrólise redutiva parcial;
- Determinação da estrutura química dos oligossacarídeos isolados utilizando técnicas de ressonância magnética nuclear.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 MATERIAIS DE TRABALHO

Gametófitos vermelhos de *Gracilaria domingensis* (Gracilariales, Rhodophyta), foram crescidos em laboratório em condições específicas de fotoperíodo, temperatura, salinidade e aeração. As plantas crescidas foram congeladas, liofilizadas e em seguida moídas por GUIMARÃES (2000).

Amostras comerciais de *Eucheuma denticulatum* (Gigartinales, Rhodophyta), importada das Filipinas pela indústria Gelymar S.A. (Puerto Montt, Chile), foram gentilmente cedidas ao laboratório de química de carboidratos de macroalgas marinhas da UFPR.

##### 3.1.2 EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS DE *E. denticulatum* E *G. domingensis*.

A alga *G. domingensis*, seca e moída, foi submetida à extração aquosa quente (90°C, 4 h). O sobrenadante foi separado por centrifugação (10000 rpm por 10 min) e tratado com etanol (3 volumes). O precipitado foi dialisado e em seguida liofilizado (GUIMARÃES, 2000).

A alga *E. denticulatum*, seca e moída, foi submetida a extrações aquosas a temperatura de 25°C (1x) e 80°C (2x). Após centrifugação (10000 rpm por 10 minutos) os sobrenadantes foram concentrados, a pressão reduzida, e tratados com etanol (3 volumes). Os polissacarídeos precipitaram na forma de longas fibras e foram separados da solução etanólica com bastão de vidro, redissolvidos em água destilada e liofilizados. Não houve precipitação com etanol no último extrato obtido a 80°C. Este extrato foi concentrado, dialisado e liofilizado.

#### 3.2 TRATAMENTO ALCALINO

Tanto polissacarídeos quanto os oligossacarídeos obtidos de *E. denticulatum* foram solubilizados em água destilada (0,2 g%) e reduzidos com boroidreto de sódio (10% em relação à massa de carboidrato) por 16 horas. Adicionou-se então hidróxido de sódio, até concentração final de 1M, e novamente boroidreto de sódio (5%). As soluções foram aquecidas a 80°C, por 30 minutos para polissacarídeos e 60 minutos para oligossacarídeos (NOSEDA e CERZO, 1995), sendo em seguida neutralizadas em banho de gelo com ácido clorídrico fumegante, dialisadas, concentradas e liofilizadas.

### **3.3 HIDRÓLISE REDUTIVA PARCIAL**

Os polissacarídeos sulfatados foram hidrolisados de acordo com o método de USOV e ELASHVILI (1991). Duzentos miligramas de polissacarídeo foram dissolvidos em 15 ml de água destilada, sendo em seguida adicionado 1,35 g do complexo borano 4-metil-morfolina. Esta mistura foi aquecida a 60°C até completa solubilização. Na seqüência foi adicionado TFA 2M (5 ml), sendo a mistura em seguida incubada em banho termostatizado a 65°C por 8 horas. Durante as primeiras três horas de hidrólise os tubos foram abertos rapidamente, visando aliviar a pressão interna. Após a incubação a 65°C, o hidrolisado foi acrescido de água e evaporado a pressão reduzida até secura. O hidrolisado seco foi então dissolvido em metanol (2x) e novamente concentrado.

### **3.4 PURIFICAÇÃO DOS OLIGOSSACARÍDEOS**

#### **3.4.1 DIÁLISE FECHADA**

As diálises das frações contendo oligossacarídeos foram realizadas com água destilada em sistema fechado, sob agitação, em recipientes de aproximadamente um litro. Foram realizadas trocas de água em média a cada cinco horas. Foi utilizada



membrana de diálise (*Cellulose benzoylated tubing* Sigma-Aldrich, 30 cm x 3,0 cm d.i.) capaz de reter moléculas com massa molecular maior ou igual a 2000 Da.

### **3.4.2 CROMATOGRAFIA DE TROCA ANIÔNICA**

Foram utilizadas duas colunas de vidro para a purificação dos oligossacarídeos. Uma das colunas (12 cm x 2,5 cm d.i.) contendo DEAE-Sephadex A25 (Cl<sup>-</sup>) foi eluída com água destilada e gradiente contínuo de cloreto de sódio, utilizando fluxo controlado de 0,5 ml/min por bomba peristáltica (Pharmacia Biotech pump P-1). A segunda coluna (15 cm x 3,0 cm d.i.) contendo DEAE-Sepharose CL-6B (CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>) foi eluída com água destilada e gradiente descontínuo de carbonato de amônio, utilizando um fluxo de aproximadamente 2,6 ml/min.

Os eluatos foram coletados em tubos utilizando coletor programado por tempo. A detecção de carboidratos foi feita pelo método do fenol ácido sulfúrico (DUBOIS et al., 1956).

### **3.4.3 CROMATOGRAFIA DE TROCA CATIÔNICA**

As cromatografias foram realizadas em coluna de vidro (20 cm x 5,0 cm d.i.) contendo resina de divinil-benzeno sulfonado (DVB-S) (H<sup>+</sup>), a um fluxo de 3,5 ml/min. As eluições foram realizadas com água destilada sendo em seguida os eluatos neutralizados com solução saturada de bicarbonato de sódio ou carbonato de amônio.

### 3.4.4 CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO

As cromatografias de exclusão foram utilizadas para separação e dessalinização das amostras. Foram realizadas em coluna de vidro utilizando diferentes tipos de géis e água destilada como eluente. Segue abaixo especificações das colunas usadas:

Bio-Gel P-2 (limite de exclusão de 100-1800 Da): coluna 1 de 100 cm x 1,5 cm d.i., volume morto ( $V_0$ ) de 50 ml, volume total ( $V_t$ ) igual a 180 ml e fluxo de 0,4 ml/min.; coluna 2 de 150 cm x 3,0 cm d.i., com volume morto de 250 ml, volume total de 800 ml e fluxo de 0,7 ml/min.

Bio-Gel P-6 DG (limite de exclusão de 1000-6000 Da): coluna de 100 cm x 3,0 cm d.i., com volume morto de 155 ml, volume total de 570 ml e fluxo de 1,1 ml/min.

Sephadex G25 (limite de exclusão de 1000-5000 Da): coluna de 100 cm x 1,5 cm d.i., volume morto de 70 ml, com volume total de 180 ml e fluxo de 0,4 ml/min.

Os eluatos foram coletados em tubo utilizando coletor programado por tempo. A detecção dos carboidratos foi feita pelo método do fenol ácido sulfúrico (DUBOIS et al., 1956).

### 3.4.5 CROMATOGRAFIA DE CAMADA DELGADA (CCD) PREPARATIVA

A cromatografia de camada delgada preparativa foi realizada em cromatoplaça revestida com celulose (Merck). A fase móvel utilizada foi uma mistura de *n*-propanol, acetato de etila, ácido acético e água (4:4:1:1). As bordas da placa foram reveladas com revelador para ácido orgânico anilina 10% em etanol e glucose 10% em água destilada (4:1), a 100°C por 10 min (STAHL, 1965).

### **3.4.6 EXTRAÇÃO COM SOLVENTE ORGÂNICO**

Para eliminação do cloreto de sódio, presente nas eluatos obtidos por cromatografia de troca aniônica, as frações foram evaporadas em rotaevaporador na presença de tolueno para eliminar a umidade. Após a evaporação foi acrescentado dimetilsulfóxido ( $\text{Me}_2\text{SO}$ ), aproximadamente 50 ml, sendo a solução misturada com auxílio de ultrassom. Após a mistura a solução foi centrifugada (5000 rpm por 10 min.) e o sobrenadante separado. Este processo foi repetido por três vezes. Foi adicionado ao sobrenadante clorofórmio (3 volumes), sendo em seguida a mistura deixada em repouso a 4°C para facilitar o processo de precipitação. O precipitado foi recolhido após centrifugação (5000 rpm por 10 min), sendo em seguida dissolvido em água destilada, congelado e liofilizado. Esta técnica é baseada na utilizada por YANG et al. (2001).

## **3.5 MÉTODOS ANALÍTICOS**

### **3.5.1 DETECÇÃO DE CARBOIDRATOS**

A presença de carboidratos foi detectada através da reação frente à solução de fenol 5% (0,5 ml) e ácido sulfúrico concentrado (2,5 ml), conforme descrito por DUBOIS et al. 1956.

### **3.5.2 DETECÇÃO DA 4-METIL-MORFOLINA**

A detecção da amina terciária 4-metil-morfolina foi realizada através da reação frente ao reativo geral para alcalóides de Bertrand (ácido sílico-túngstico 5g%). Nesta reação ocorre a formação de um precipitado branco (GONÇALVES, 2001).

### 3.5.3 CROMATOGRAFIA DE CAMADA DELGADA ANALÍTICA

A cromatografia em camada delgada analítica foi realizada em cromatoplaça revestidas com sílica gel 60 (Merck). Foi usado como fase móvel uma mistura de *n*-butanol, ácido acético e água (2:2:1). O revelador utilizado foi o orcinol (0,4 g%) em ácido sulfúrico concentrado e etanol (1:19), 110°C por 10 minutos.

### 3.6 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

As análises estruturais de ressonância magnética nuclear mono e bidimensionais foram realizadas em equipamento da marca BRUKER, modelo DRX 400, série AVANCE, em tubo (*widebore probe*) de 5 mm de diâmetro externo, em água deuterada (D<sub>2</sub>O) 99%, a temperaturas que variaram de 25 a 80°C. Os deslocamentos químicos, expressos em  $\delta$  (ppm), foram determinados utilizando acetona como padrão interno tanto para as análises de <sup>13</sup>C ( $\delta = 30,2$  ppm) quanto para <sup>1</sup>H ( $\delta = 2,224$  ppm).

A maioria dos espectros, mono e bidimensionais, foram analisados utilizando o software MestReC versão 4.1.1.0.

#### 3.6.1 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR MONODIMENSIONAL

##### 3.6.1.1 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE PRÓTON (RMN <sup>1</sup>H)

Para as análises de RMN de <sup>1</sup>H foi promovida a troca de hidrogênios das hidroxilas por deutério e remoção das moléculas de água presente através da dissolução das amostras em D<sub>2</sub>O, congelamento e liofilização. Este processo é repetido por no mínimo 3 vezes.

Os espectros foram obtidos na frequência base de 400,13 MHz, janela espectral de 8250,8 Hz, intervalo de aquisição de 4 s, intervalo entre os pulsos de 1s, sendo realizados no mínimo 16 aquisições. A resolução dos espectros foi de 16K.

### **3.6.1.2 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE CARBONO-13 (RMN $^{13}\text{C}$ )**

Os espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$ , desacoplados de  $^1\text{H}$ , foram obtidos na frequência base de 100,61 MHz, janela espectral de 31750 Hz, intervalo de aquisição de 0,6 s, intervalo entre os pulsos de 0,1 s, sendo realizadas no mínimo 2000 aquisições. A resolução dos espectros foi de 32 K.

### **3.6.1.3 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE CARBONO-13 DEPT (*DISTORTIONLESS ENHANCEMENT BY POLARIZATION TRANSFER*)**

Os espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  DEPT foram obtidos na frequência base de 100,61 MHz, janela espectral de 24038 Hz, intervalo de aquisição de 1,4 s, intervalo entre os pulsos de 2s, sendo realizados no mínimo 2000 aquisições. O ângulo de transferência de polarização utilizado foi de  $135^\circ$  e a resolução dos espectros foi de 32 K.

## **3.6.2 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR BIDIMENSIONAL**

### **3.6.2.1 ESPECTROSCOPIA DE CORRELAÇÃO HOMONUCLEAR ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ ) COSY (*CORRELATION SPECTROSCOPY*)**

Esta é uma técnica homonuclear utilizada para correlacionar os deslocamentos químicos dos núcleos de  $^1\text{H}$  que estão acoplados um com o outro. Assim nos carboidratos, o H-1 de um monossacarídeo apresenta acoplamento com H-2 da mesma unidade, sendo possível observar esta interação na forma de um pico cruzado, e assim determinar o deslocamento químico de H-2 a partir de H-1. Dessa forma a partir do sinal de H-2 pode ser determinado o H-3 e assim sucessivamente ao longo do anel se

as constantes de acoplamento permitirem. Como cada unidade monossacarídica apresenta um padrão de constantes de acoplamento característicos, com estes resultados é possível determinar o tipo de açúcar presente na estrutura.

As condições de aquisição dos espectros de COSY utilizadas foram conforme descritas no manual da Bruker. A resolução dos espectros foi de 1024 (F2) x 1024 (F1) K, com janela espectral de 4125,4 (F2) x 4125,4 (F1) Hz.

### **3.6.2.2 ESPECTROSCOPIA TOTAL DE CORRELAÇÃO HOMONUCLEAR ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ ) TOCSY (*TOTAL CORRELATION SPECTROSCOPY*)**

Nesta técnica homonuclear os picos cruzados são gerados não só pelos prótons vicinais, mas sim, por todos os núcleos do sistema spin acoplado. Desta forma temos os picos cruzados correspondentes a interação H-1 com H-2, assim como, H-1 com H-3, H-1 com H-4 e assim sucessivamente se as constantes de acoplamento permitirem.

As condições de aquisição dos espectros de TOCSY utilizadas foram conforme descritas no manual da Bruker. A resolução dos espectros foi de 1024 (F2) x 1024 (F1) K, com janela espectral de 4125,4 (F2) x 4125,4 (F1) Hz.

### **3.6.3 ESPECTROSCOPIA DE CORRELAÇÃO HETERONUCLEAR ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ) HMQC (*HETERONUCLEAR MULTIPLE QUANTUM CORRELATION SPECTROSCOPY*)**

Esta técnica heteronuclear permite determinar quais átomos de hidrogênio estão ligados a quais átomos de carbono. No espectro é observada a correlação dos deslocamentos químicos de prótons e carbonos que dividem uma mesma ligação.

As condições de aquisição dos espectros de HMQC utilizadas foram conforme descritas no manual da Bruker. A resolução dos espectros foi de 1024 (F2) x 512 (F1) K, com janela espectral de 4085 (F2) x 15923 (F1) Hz.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.1 HIDRÓLISE REDUTIVA PARCIAL DAS GALACTANAS DE *Gracilaria domingensis*.

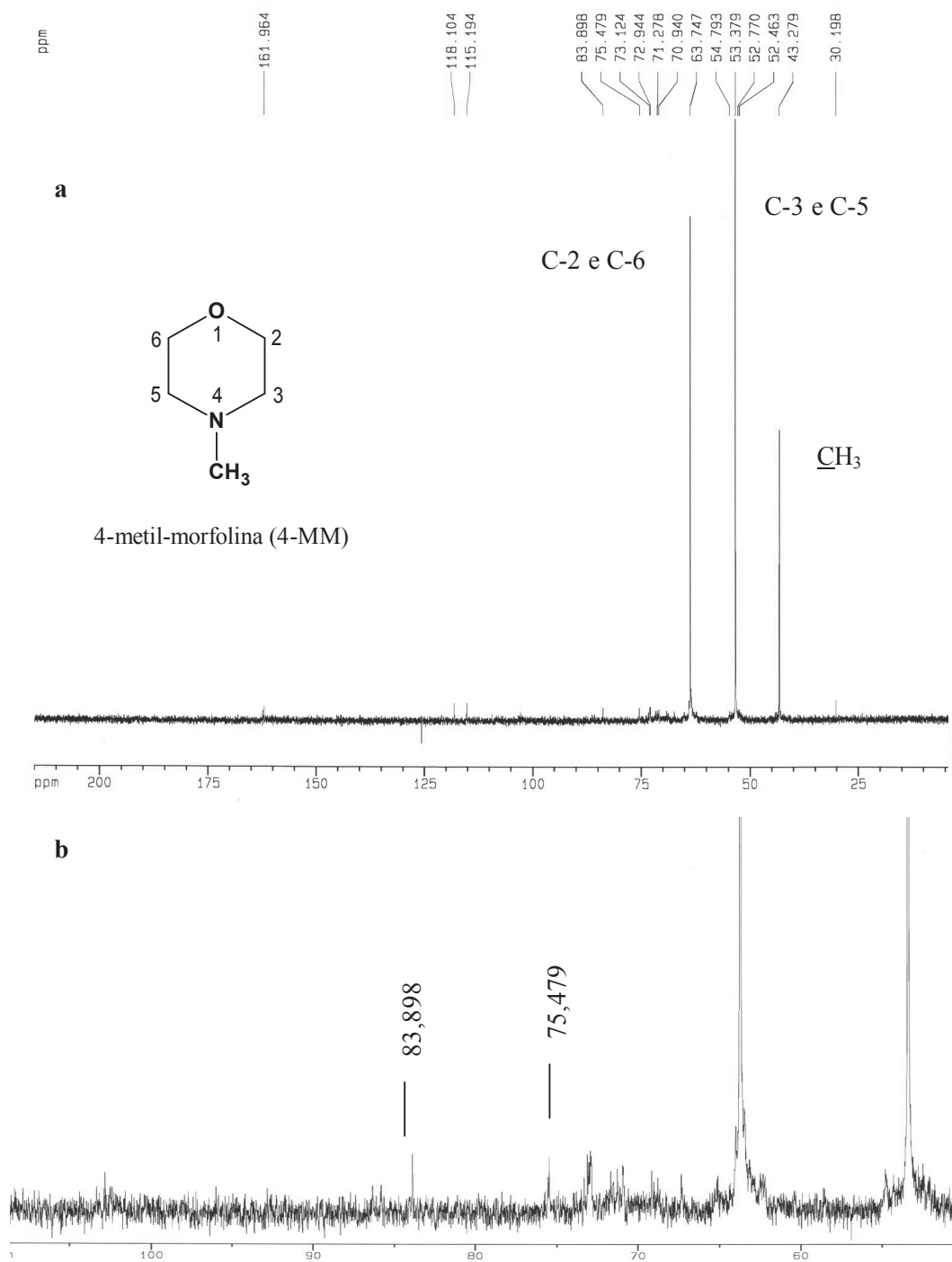
As galactanas sulfatadas (360mg) extraídas da alga vermelha *G. domingensis* (GUIMARÃES, 2000), foram submetidas à hidrólise reductiva parcial, como descrito por USOV e ELASHVILI (1991), e o hidrolisado denominado G-HRP.

A quantidade do complexo borano 4-metil-morfolina (B-4MM) utilizada na hidrólise reductiva parcial é cerca de 6,7 vezes maior que a de polissacarídeos hidrolisados. Durante a redução, o complexo entre a 4-metil-morfolina (4-MM) e o borano se desfaz. A 4-MM permanece na mistura, enquanto o borano é oxidado a borato e retirado por codestilação com metanol na forma de trimetil-borato. A 4-MM é uma amina terciária formada por um anel de seis átomos - sendo quatro carbonos, um nitrogênio e um oxigênio - possuindo um grupo metil ligado ao nitrogênio do anel (Figura 7). No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 7) de G-HRP é possível observar os sinais da 4-MM em maior intensidade frente aos dos oligossacarídeos. Os sinais em 63,7 ppm correspondem a C-2 e C-6; 53,4 ppm a C-3 e C-5 e o sinal em 43,3 ao carbono do grupo metil. Uma análise da região entre 80 e 90 ppm do espectro nos permite observar o sinal em 83,9 ppm, correspondente ao C-3 da unidade de 3,6-anidro-L-galactitol (GONÇALVES et al., 2002). Isto indica que a hidrólise produziu oligossacarídeos alditóis.

O primeiro passo de purificação (ver purificação completa na Figura 25, p. 57) de G-HRP foi a cromatografia de troca aniônica, utilizando DEAE-Sephadex A-25 (Figura 8, p. 33). A coluna cromatográfica foi eluída com água destilada - para retirar a 4-metil-morfolina, oligossacarídeos e monossacarídeos neutros. Seguiu-se a eluição utilizando um gradiente contínuo de cloreto de sódio de 0-0,15 M, eluição com solução 0,15M, um segundo gradiente de 0,15-0,30M e por último eluição com solução 0,3M.

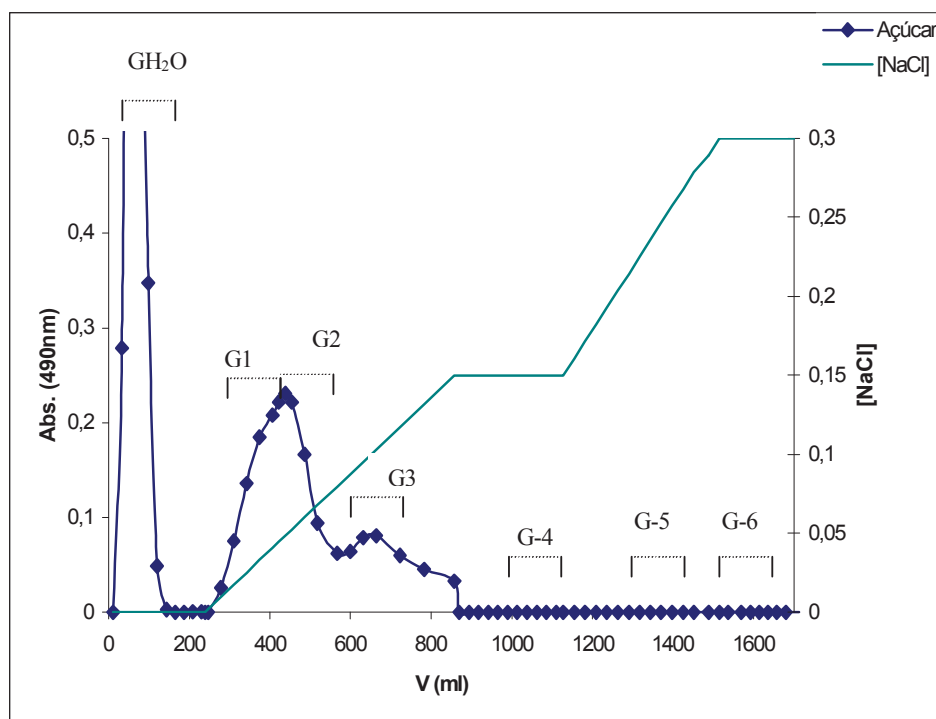


FIGURA 7 - ESPECTRO DE RMN  $^{13}\text{C}$  DE G-HRP. (a) ESPECTRO TOTAL (215-0 PPM); (b) AMPLIAÇÃO DO ESPECTRO (110-50 PPM).



O cromatograma de troca aniônica (Figura 8) mostra que a maior parte dos carboidratos eluíram com água e o primeiro gradiente de cloreto de sódio. O eluato aquoso foi agrupado numa única fração denominada G-H<sub>2</sub>O. O perfil cromatográfico do eluato obtido com o primeiro gradiente permitiu a formação de três frações, denominadas de G-1, G-2 e G-3. Nas eluições realizadas com maior concentração de NaCl as baixas absorbâncias detectadas após o teste de fenol sulfúrico não permitiram traçar um perfil cromatográfico. Entretanto, os ensaios indicaram a presença de carboidratos e os eluatos foram agrupados em frações denominadas G-4, G-5 e G-6.

**FIGURA 8 - PERFIL DE ELUIÇÃO DA CROMATOGRAFIA DE TROCA ANIÔNICA (DEAE-SEPHADEX A25) DE G-HRP.**



## 4.2 ANÁLISE DA FRAÇÃO G-H<sub>2</sub>O, OBTIDA DA CROMATOGRRAFIA DE TROCA ANIÔNICA.

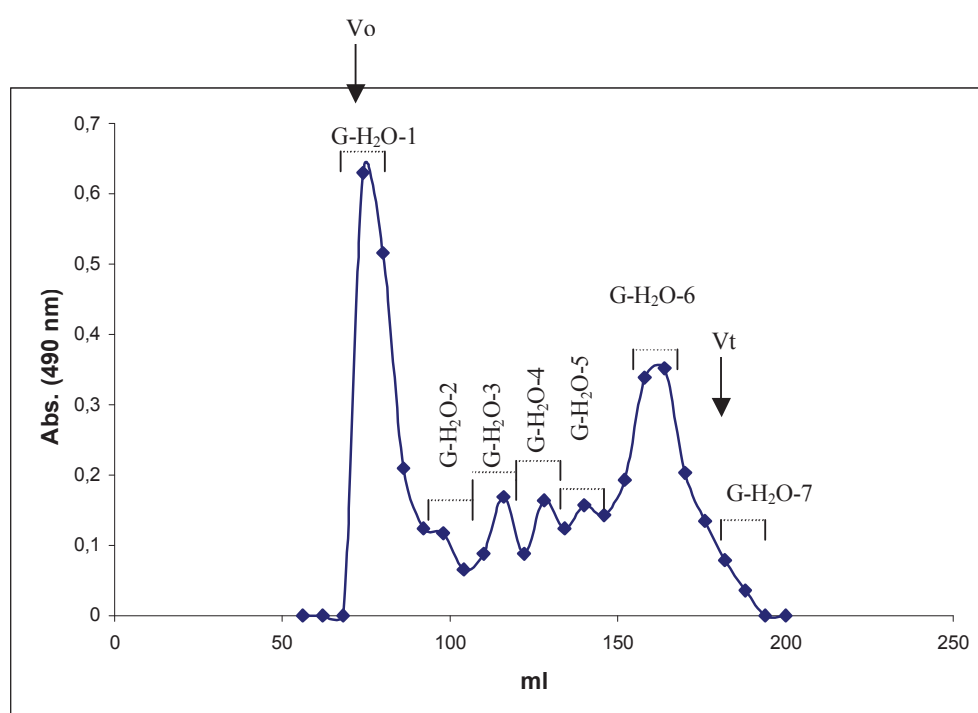
A fração G-H<sub>2</sub>O apresentou uma grande quantidade de 4-MM, detectada pelo reativo de Bertrand para alcalóides. GONÇALVES et al. (2002) utilizaram cromatografia de adsorção em carvão/Celite (1:1) para separar a 4-MM dos oligossacarídeos alditóis obtidos por hidrólise reductiva parcial. Neste trabalho os autores eluíram a coluna de carvão/Celite com água, para remover a amina, e em seguida com etanol/água (1:1) para desorver os oligossacarídeos. Entretanto, a coluna de carvão/celite apresentou baixa resolução e o eluato etanólico apresentou-se ainda contaminado. Devido às características básicas da 4-MM a fração G-H<sub>2</sub>O foi cromatografada em coluna de troca catiônica (DVB-S) e eluída com água. A amina é retida pela resina, enquanto os oligossacarídeos são encontrados no eluato aquoso. Após a eluição é necessário neutralizar o eluato. Testes negativos frente ao reativo de Bertrand e análise de RMN de <sup>13</sup>C mostraram que a cromatografia de troca catiônica foi eficiente, tendo removido totalmente a 4-MM.

A fração G-H<sub>2</sub>O foi cromatografada em coluna de exclusão contendo Sephadex G25. De acordo com o cromatograma obtido (Figura 9) pôde-se observar que a fração era constituída por carboidratos de vários tamanhos. O perfil cromatográfico permitiu a formação de sete novas frações, eluídas entre o volume morto (G-H<sub>2</sub>O-1) e o volume total (G-H<sub>2</sub>O-7) da coluna.

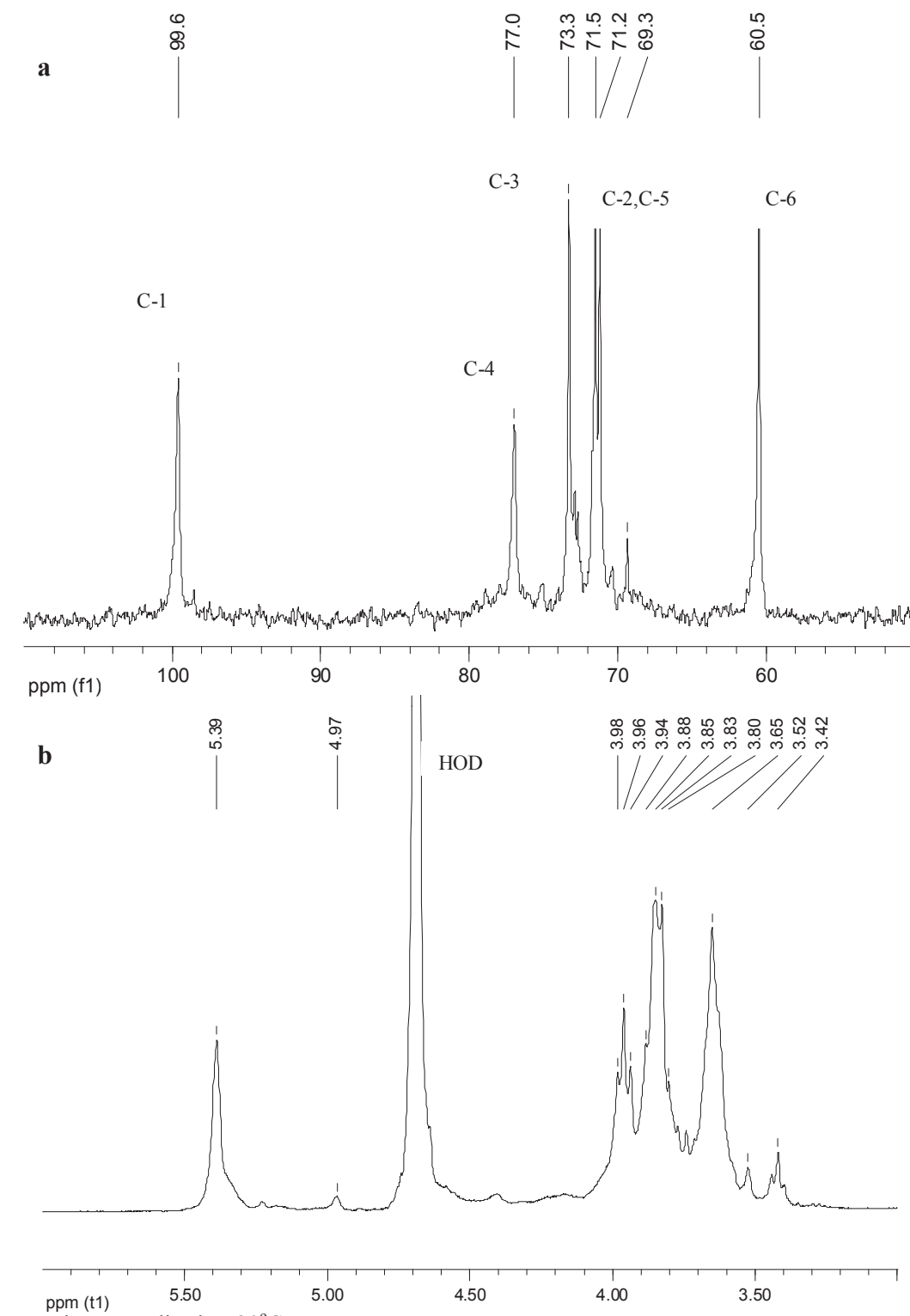
O espectro de RMN de <sup>13</sup>C (Figura 10<sup>a</sup>, p. 36) da fração G-H<sub>2</sub>O-1 (18 mg) mostra a presença de seis sinais intensos e apenas um deles na região anomérica, em 99,6 ppm. GUIMARÃES (2000) relata uma quantidade significativa de amido das florídeas nos extratos obtidos de *G. domingensis*. O amido das florídeas é o polissacarídeo de reserva das algas vermelhas, equivalente a amilopectina dos vegetais, sendo constituído por uma cadeia principal de  $\alpha$ -glucopirranose ligada pelos carbonos um e quatro, podendo conter ainda ramificações  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 6). Os sinais de RMN de <sup>13</sup>C de G-H<sub>2</sub>O-1 são os mesmos assinalados por GUIMARÃES (2000) para o amido das florídeas. No espectro de RMN de <sup>1</sup>H da fração G-H<sub>2</sub>O-1 é possível observar os

sinais em 5,39 e 4,97 ppm correspondente ao H-1 das unidades de  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4) e  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 6)-D-glucopiranosose, respectivamente (Figura 10b). A relação entre os sinais é de 20:1, semelhante à encontrada por KNUTSEN e GRASDALEN (1987) quando estudavam os polissacarídeos extraídos de *Furcellaria lumbricalis*.

**FIGURA 9 - CROMATOGRAMA DE EXCLUSÃO DA FRAÇÃO G-H<sub>2</sub>O EM SEPHADEX G25.**

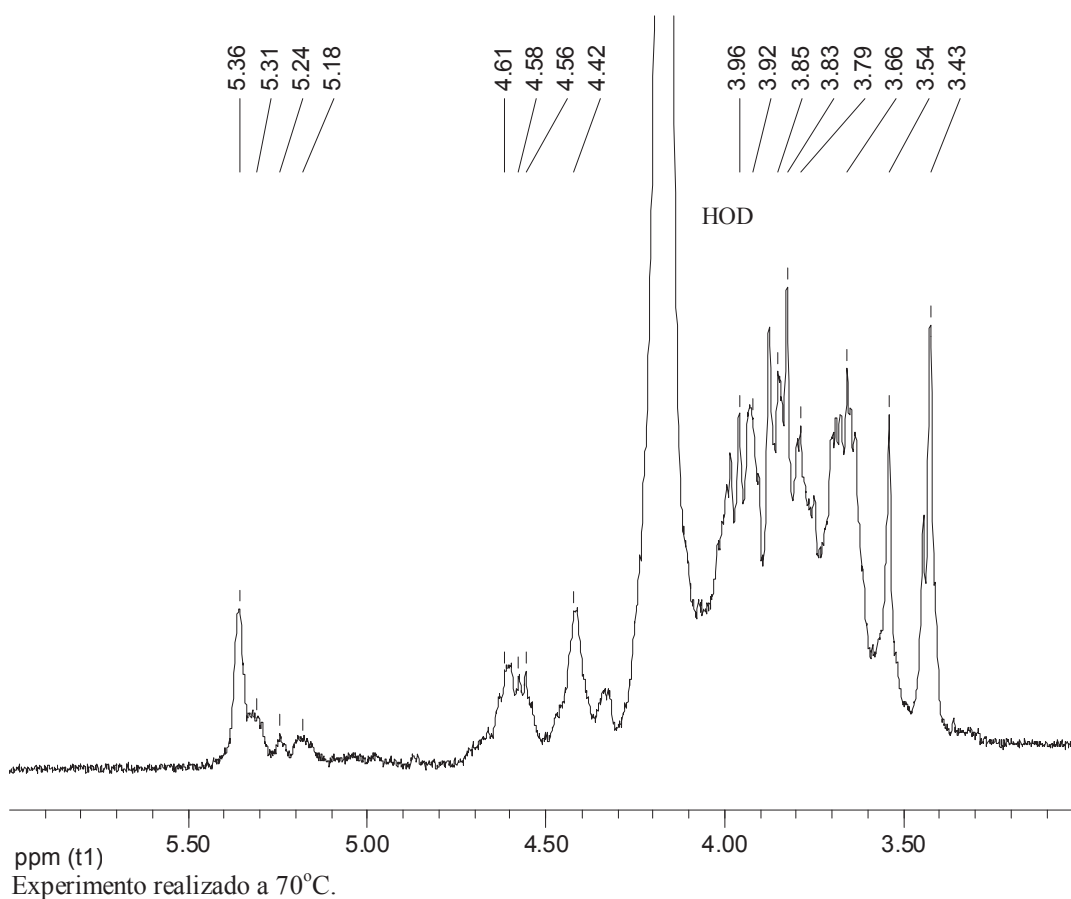


As frações G-H<sub>2</sub>O-2 (2,2 mg), 3 (4,5 mg) e 4 (3,5 mg) apresentaram baixo rendimento, no entanto foi possível analisar as duas últimas por RMN de <sup>1</sup>H. Os espectros das duas frações mostraram-se bastante semelhantes. A Figura 11 (p. 37) mostra o RMN de <sup>1</sup>H da fração G-H<sub>2</sub>O-3. O sinal em 5,36 ppm, correspondente ao H-1 das unidades de  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4)-D-glucopiranosose, indica que o principal constituinte destas frações é o amido das florídeas.

FIGURA 10 - ESPECTRO DE RMN DE  $^{13}\text{C}$  (a) E  $^1\text{H}$  (b) DE G-H<sub>2</sub>O-1

Os sinais em 5,18 e 5,31 ppm correspondem ao H-1 das unidades de 3,6-anidro- $\alpha$ -L-galactopiranosose e  $\alpha$ -L-galactopiranosose 6-sulfato, respectivamente (ZHANG et al., 2004). O sinal em 3,43 ppm corresponde aos prótons dos grupos metil substituindo C-6 da unidade A em agaranas (MAZUMDER et al., 2002). A presença destes sinais juntamente com o volume de eluição apresentado por estas frações na cromatografia de exclusão em Sephadex G25, indica a presença de fragmentos de agarana com alto grau de polimerização. Os baixos rendimentos destas frações (G-H<sub>2</sub>O-2 a 4) tornaram inviável a separação dos fragmentos de agarana do amido parcialmente hidrolisado.

**FIGURA 11 - ESPECTRO DE RMN <sup>1</sup>H DE G-H<sub>2</sub>O-3.**



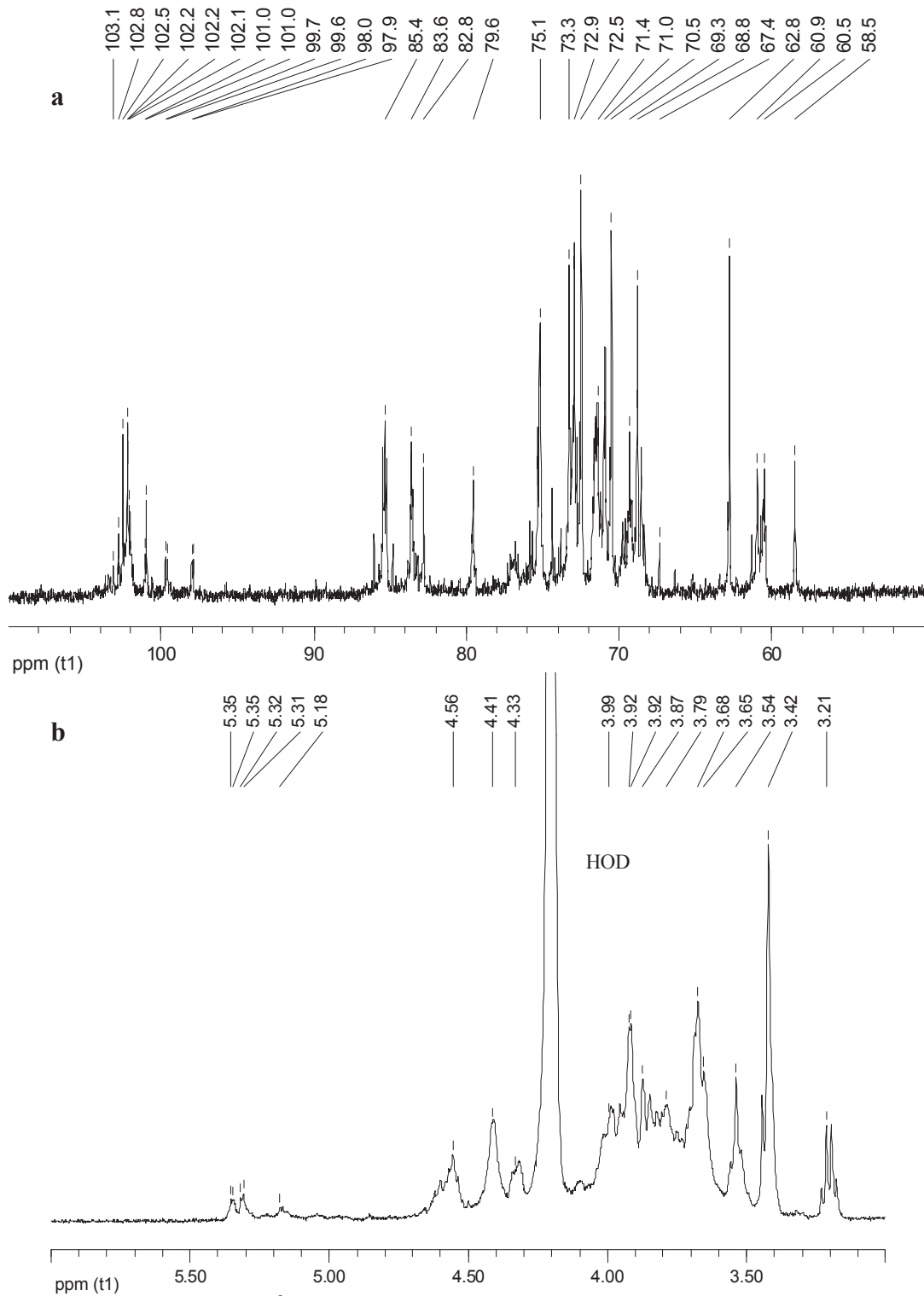
A fração G-H<sub>2</sub>O-5 rendeu aproximadamente 15 mg. Os espectros de RMN de <sup>13</sup>C e <sup>1</sup>H (Figura 12), mostram-se bastante complexos com um grande número de sinais. A presença de oligossacarídeos alditóis nesta fração é confirmada pelos sinais em 62,8, 83,6 e 85,4 ppm correspondentes respectivamente a C-1, C-3 e C-4 da

unidade de 3,6-anidro-L-galactitol (GONÇALVES et al., 2002). O sinal em 58,5 ppm corresponde ao grupo metil (CH<sub>3</sub>) ligado ao C-6 das unidades de β-D-galactopiranosose. Os sinais dos prótons deste substituinte podem ser observados em 3,42 ppm na Figura 12b. Analisando a região anomérica (90 a 110 ppm) do espectro de <sup>13</sup>C, pode-se observar o sinal em 98,0 ppm correspondente a C-1 da 3,6-anidro-α-L-galactopiranosose em ligação glicosídica (NOMURA et al., 1998). No espectro de próton o sinal de H-1 destas unidades aparece em 5,18 ppm. Isto indica que nem todas as ligações α-(1→3) da agarana de *G. domingensis* foram rompidas pela hidrólise reductiva parcial, tendo a fração G-H<sub>2</sub>O-5 oligossacarídeos alditóis com mais de duas unidades monossacarídicas.

A presença do amido das florídeas é confirmada pelos sinais em 99,6 e 5,35 ppm nos espectros (Figura 12) de <sup>13</sup>C e <sup>1</sup>H respectivamente (KNUTSEN e GRASDALEN, 1987). Os sinais em 100,9 e 101,0 ppm correspondem ao C-1 das unidades de α-L-galactopiranosose 6-sulfato (NOMURA et al., 1998). O sinal de H-1 destas unidades é observado no espectro de RMN de <sup>1</sup>H em 5,31 ppm. O sinal de C-1 da unidade A (β-D-galactopiranosose) ligada à unidade precursora é observado em 103,1 ppm. Estes sinais confirmam a existência de unidades precursoras do derivado 3,6-anidro da galactose em agaranas de *G. domingensis*.

O sinal em 102,5 ppm corresponde ao C-1 das unidades de β-D-galactopiranosose 6-sulfato em ligação glicosídica (VALIENTE et al., 1992), enquanto que os sinais de 102,2 e 102,0 ppm correspondem a C-1 das unidades de β-D-galactopiranosose e/ou β-D-galactopiranosose 6-O-metil. Os deslocamentos químicos de C-1 destas unidades são difíceis de se diferenciar (VIANA, 2001).

FIGURA 12 - ESPECTRO DE RMN DE  $^{13}\text{C}$  (a) E  $^1\text{H}$  (b) DE G-H<sub>2</sub>O-5.



Experimentos realizados a 30°C.

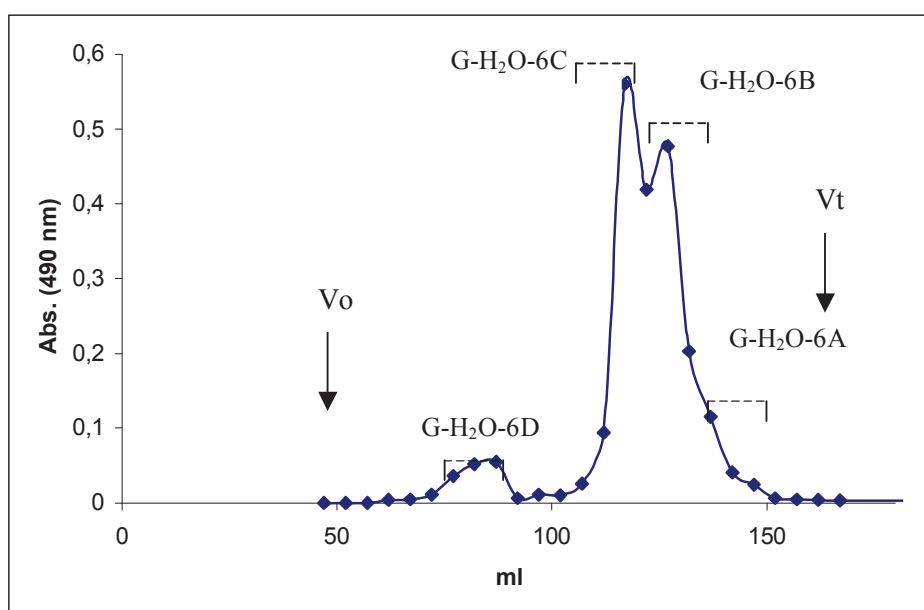


A análise dos espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$  da fração G-H<sub>2</sub>O-5 indicou a presença de oligossacarídeos alditóis com grau de polimerização maior que dois, contendo grupos *O*-sulfato e *O*-metil ligados a C-6 da unidade A e ainda a presença da unidade precursora de 3,6-anidro-galactopiranosose na unidade B.

A presença do amido das florídeas nas frações G-H<sub>2</sub>O-3 a 5 sugere uma degradação parcial deste polissacarídeo pela hidrólise reductiva parcial. Contudo, grande parte deste polímero é encontrado na forma de fragmentos de alto peso molecular, como mostrou a análise da fração G-H<sub>2</sub>O-1 eluída no volume morto da cromatografia de exclusão em Sephadex G25.

A fração G-H<sub>2</sub>O-6 eluiu próximo ao volume total na cromatografia de exclusão em Sephadex G25 (Figura 9, p. 35), sugerindo que nesta fração havia fragmentos de baixa massa molecular, uma vez que o limite de exclusão deste gel é de 1000 a 5000 Da para dextrana neutra. Diante disso, G-H<sub>2</sub>O-6 foi recromatografada em coluna de exclusão contendo Bio-Gel P-2, que possui um limite de exclusão de 100 a 1800 Da para proteínas globulares (Figura 13).

**FIGURA 13 - CROMATOGRAMA DE EXCLUSÃO DE G-H<sub>2</sub>O-6 EM BIO-GEL P-2.**



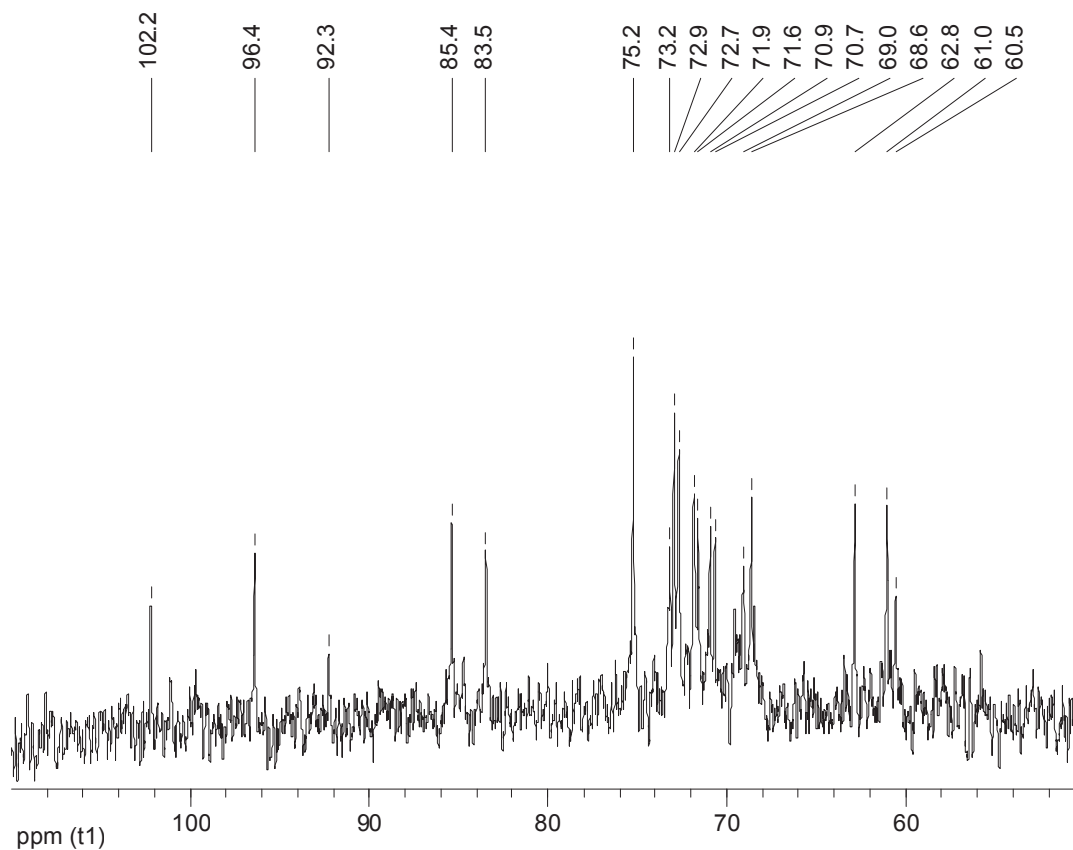
A cromatografia de G-H<sub>2</sub>O-6 em Bio-Gel P-2 (Figura 13) permitiu dividir a fração em quatro novas subfrações denominadas de G-H<sub>2</sub>O-6A a D. As subfrações G-H<sub>2</sub>O-6B e C correspondem aos picos bem definidos no cromatograma, sendo as frações que apresentaram maior rendimento, 7 e 16 mg respectivamente.

A subfração G-H<sub>2</sub>O-6A (4 mg) eluiu próximo ao volume total e seu espectro de RMN de <sup>13</sup>C esta apresentado na Figura 14. Na região anomérica (90 a 110 ppm), observa-se os picos em 92,3 e 96,4 ppm correspondentes a unidades de galactopiranosose redutoras, nas formas  $\alpha$  e  $\beta$  respectivamente (GORIN e MAZUREK, 1975). Embora as condições da hidrólise redutiva parcial favoreçam a quebra das ligações 3,6-anidrogalactosídicas das galactanas, ocorre também quebra das ligações galactosídicas em menor escala, indicada pela presença da galactose livre nesta subfração. O fato desse monossacarídeo não estar reduzido sugere uma diferença na redução, pelo complexo borano 4-metil-morfolina, da galactose e 3,6-anidro-galactose. Esta diferença também já foi observada anteriormente por STEVENSON e FURNEAUX (1991). Os sinais em 102,2, 85,4, 83,5 e 62,8 ppm indicam a presença de um dissacarídeo alditol, pois correspondem respectivamente a C-1 da unidade não redutora e C-4, C-3 e C-1 da unidade de 3,6-anidro-L-galactitol (GONÇALVES et al., 2002). Estes dados demonstram que a subfração G-H<sub>2</sub>O-6A é uma mistura de pelo menos dois carboidratos diferentes.

A subfração G-H<sub>2</sub>O-6B eluiu no volume de separação da coluna contendo Bio-Gel P-2 e corresponde ao pico quase sobreposto à fração G-H<sub>2</sub>O-6C (Figura 13). O espectro de RMN de <sup>13</sup>C desta subfração (Figura 15, p. 43), mostra a presença de doze sinais bem definidos e elevada relação sinal/ruído, estando apenas um deles na região anomérica em 102,1 ppm. Os sinais em 62,7, 83,4 e 85,4 ppm correspondem a C-1, C-3 e C-4, respectivamente, da unidade de 3,6-anidro-L-galactitol. Comparando-se os sinais publicados por GONÇALVES et al. (2002) para o agarobiitol, pode-se concluir que a fração G-H<sub>2</sub>O-6B é composta por este dissacarídeo alditol, com elevado grau de pureza. É interessante ressaltar os sinais: em 60,8 ppm, correspondente ao C-6 livre da unidade de  $\beta$ -D-galactopiranosose; os sinais em 75,1 e 75,0 quase sobrepostos dos C-5 das unidades de  $\beta$ -D-galactopiranosose e 3,6-anidro-L-galactitol. Na Figura 15b observa-

se a estrutura química do agarobiitol. A presença deste dissacarídeo era esperada nos produtos de HRP, uma vez que *G. domingensis* biosintetiza agaranas com elevado teor de agarose.

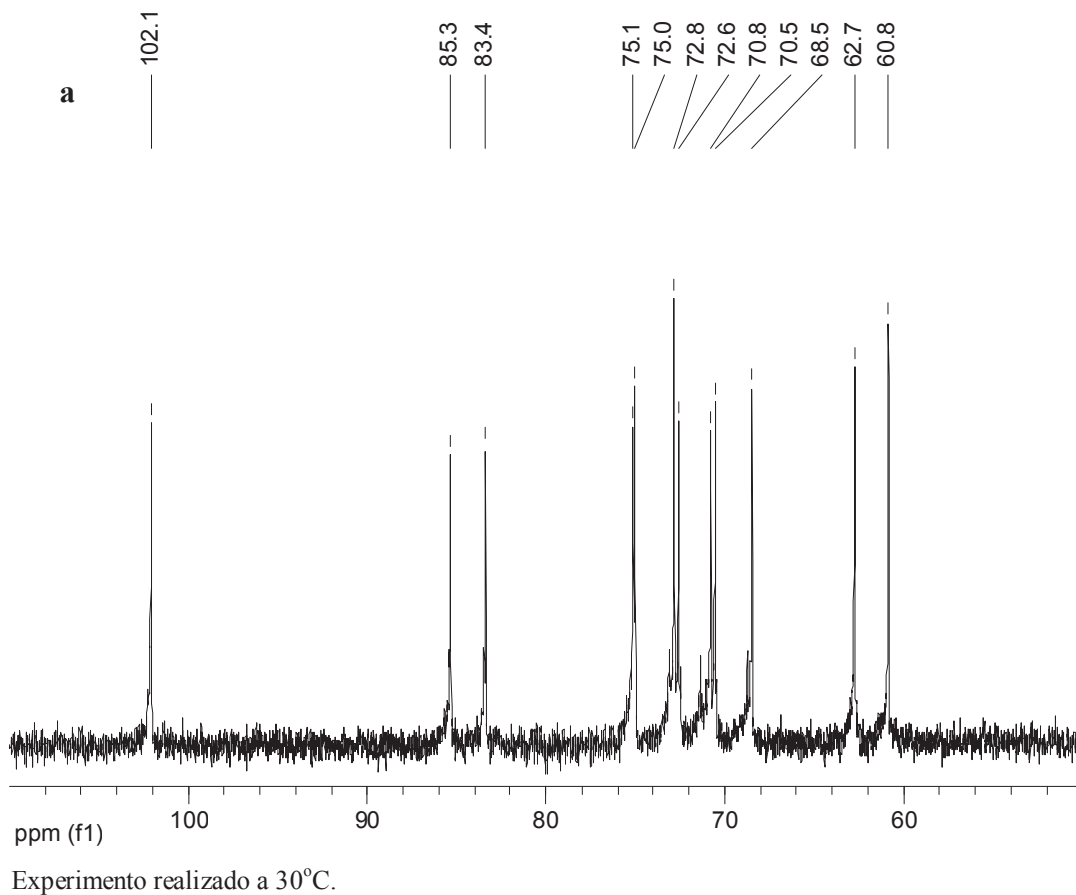
**FIGURA 14 - ESPECTRO DE RMN DE  $^{13}\text{C}$  DE G-H<sub>2</sub>O-6A.**



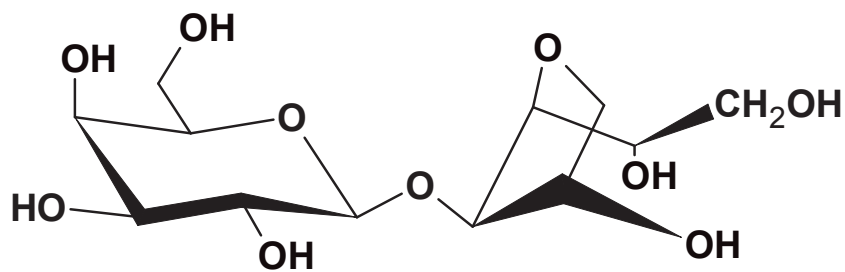
Experimento realizado a 30°C.

A fração G-H<sub>2</sub>O-6C, eluída próxima ao volume de eluição do agarobiitol (G-H<sub>2</sub>O-6B), foi analisada por RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 16, p. 44). O espectro mostra a presença de 13 sinais bem definidos, com apenas um deles de diferente intensidade em 58,4 ppm. Este sinal corresponde ao carbono do grupo metil ( $\text{CH}_3$ ), substituindo C-6 da unidade de  $\beta$ -D-galactopiranosose. A menor intensidade deste sinal se deve principalmente a um tempo de relaxação spin-rede ( $T_1$ ) longo deste carbono, associado a um intervalo de pulso curto, que dificulta a medida da transição do núcleo entre os estados de maior e menor energia.

FIGURA 15 - ESPECTRO DE RMN DE  $^{13}\text{C}$  DE G-H<sub>2</sub>O-6B (a) E ESTRUTURA QUÍMICA DO AGAROBITOL (b).

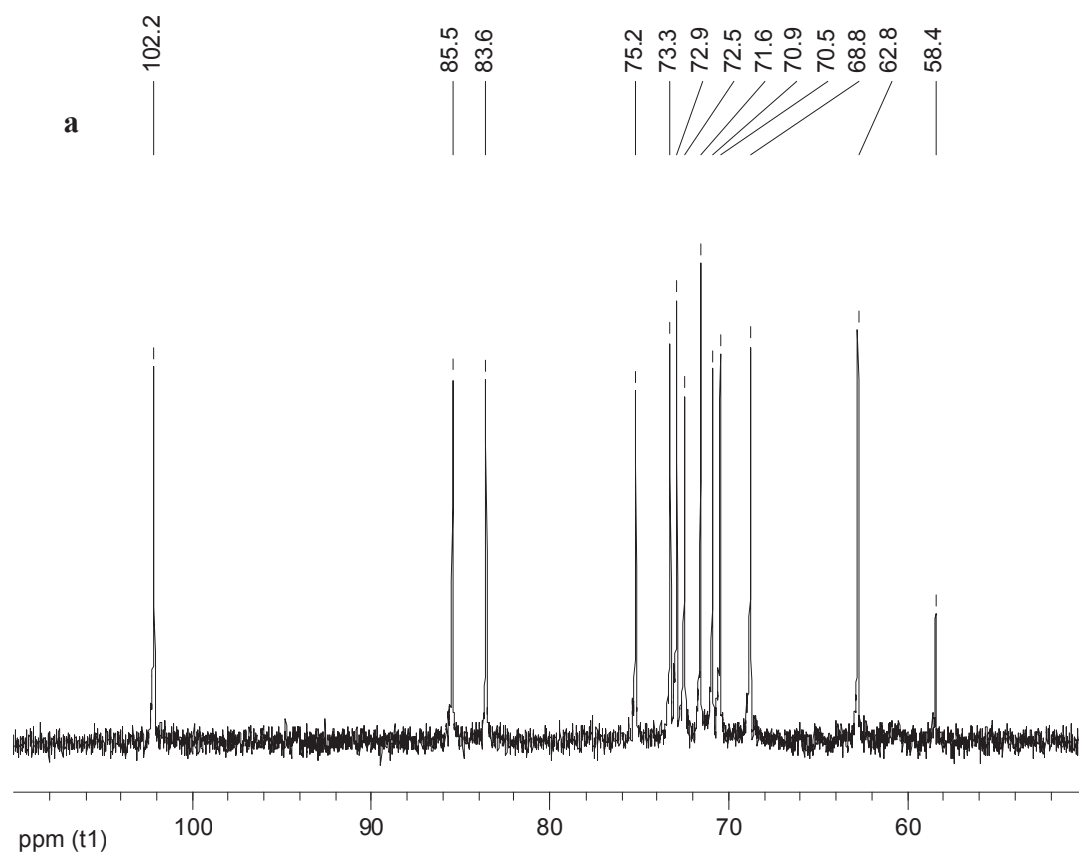


b



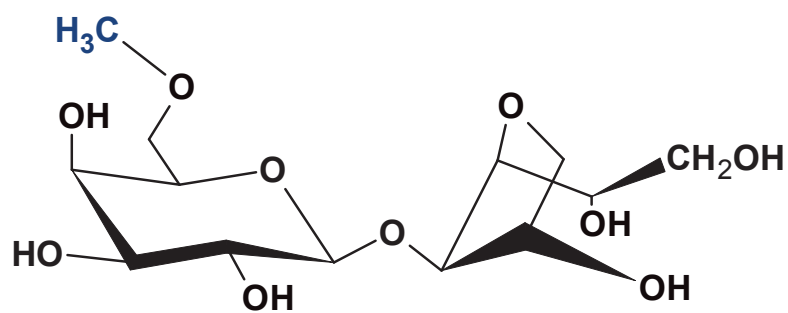
$\beta\text{-D-Galp-(1}\rightarrow\text{4)-3,6-anidro-L-galactitol}$

FIGURA 16 - ESPECTRO DE RMN DE  $^{13}\text{C}$  DE G-H<sub>2</sub>O-6C (a) E ESTRUTURA QUÍMICA DO 6<sup>2</sup>-O-METIL-AGAROBITOL (b).



Experimento realizado a 30°C.

b



6-O-metil  $\beta$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 4)-3,6-anidro-L-galactitol

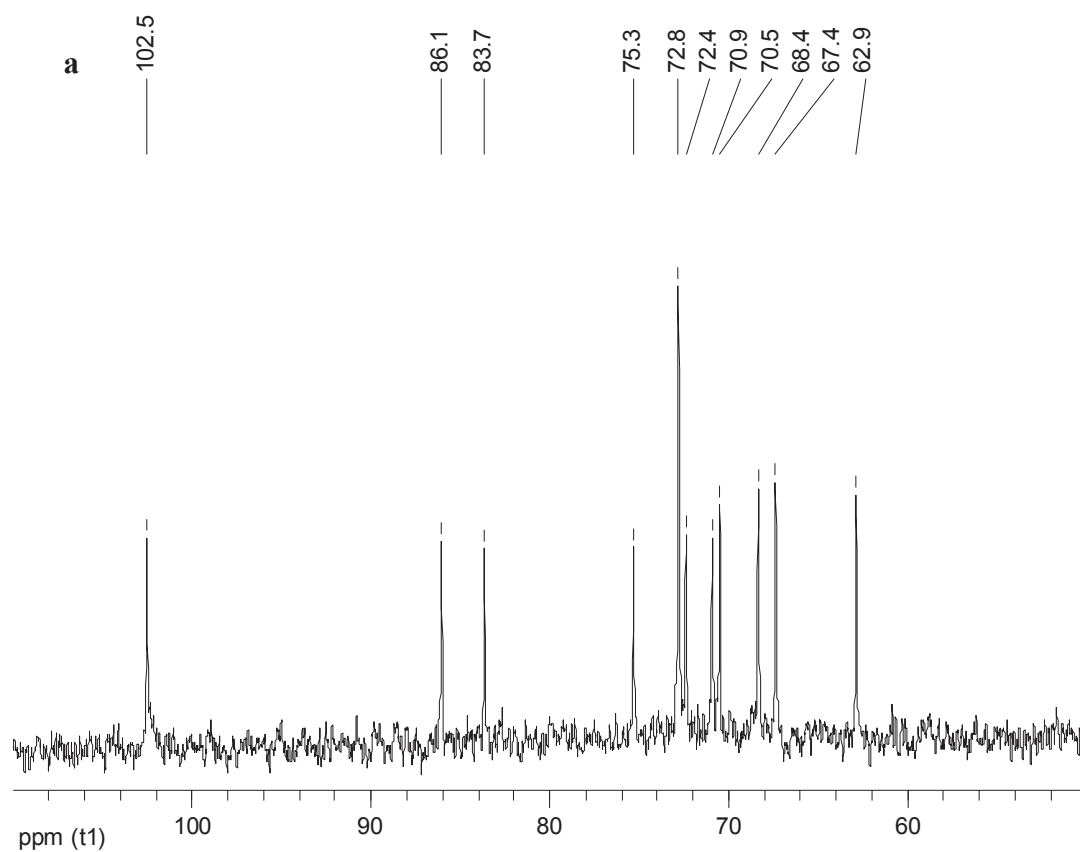
O sinal de C-6 substituído pelo grupo metil é observado em 71,6 ppm. O carbono vizinho, C-5, sofre um deslocamento de aproximadamente 2 ppm (efeito  $\beta$ ), indo de 75,2 para 73,3 ppm. Todos os sinais do dissacarídeo alditol metilado da fração G-H<sub>2</sub>O-6C coincidem com os publicados por VIANA (2001), confirmando a estrutura do dissacarídeo como sendo o 6<sup>2</sup>-*O*-metil-agarobiitol (Figura 16b), em um elevado grau de pureza. A presença deste dissacarídeo era esperada, uma vez que GUIMARÃES (2000) demonstrou que *G. domingensis* biosintetiza agaranas naturalmente metiladas em C-6 da unidade A.

A subfração G-H<sub>2</sub>O-6D eluiu próximo ao volume morto da coluna de Bio-Gel P-2, tendo formado um pico assimétrico. Entretanto, o espectro de RMN de <sup>13</sup>C (Figura 17a) mostra a presença de onze sinais bem definidos, sendo um deles em maior intensidade devido a uma sobreposição em 72,8 ppm. Isto indica a presença de um dissacarídeo puro nesta fração. O sinal em 67,4 ppm corresponde a C-6 da unidade de  $\beta$ -D-galactopiranosose substituída por grupo *O*-sulfato (VALIENTE et al., 1992). Os sinais em 62,9, 83,7 e 86,1 ppm correspondem a C-1, C-3 e C-4 da unidade de 3,6-anidro-L-galactitol respectivamente. Pode-se concluir que o dissacarídeo alditol presente na fração G-H<sub>2</sub>O-6D é o agarobiitol 6<sup>2</sup>-sulfato (Figura 17b).

Comparando-se os sinais do espectro da Figura 17 com os do agarobiitol (Figura 15, p. 43) é possível assinalar todos os carbonos do agarobiitol 6<sup>2</sup>-sulfato. A única diferença significativa entre os dois espectros é o deslocamento do sinal de C-6 da  $\beta$ -D-galactopiranosose substituída de 60,8 para 67,4 ppm (efeito  $\alpha$ ) e o deslocamento de C-5 de 75,2 para 72,8 ppm (efeito  $\beta$ ).

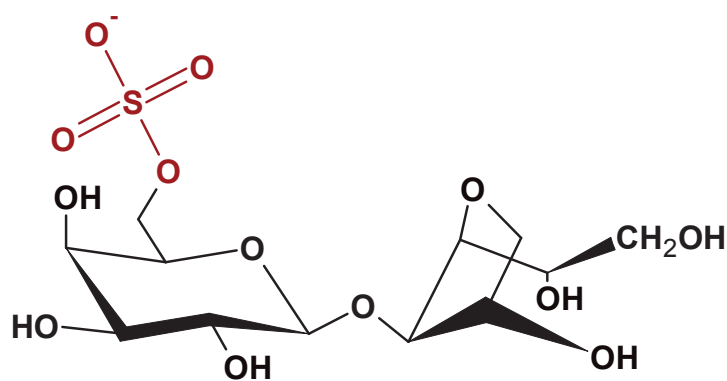
Assinalados todos os carbonos do dissacarídeo sulfatado, realizou-se o experimento de RMN bidimensional HMQC (<sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C). Neste experimento é possível observar as correlações entre <sup>13</sup>C e <sup>1</sup>H que dividem uma mesma ligação. O espectro está mostrado na Figura 18 (p. 47) e o assinalamento completo dos prótons e carbonos do agarobiitol 6<sup>2</sup>-sulfato na Tabela 2 (p. 48). A presença do dissacarídeo alditol sulfatado era esperada no hidrolisado, já que o polissacarídeo nativo de *G. domingensis* apresenta unidades de  $\beta$ -D-galactopiranosose sulfatada em C-6.

FIGURA 17 - ESPECTRO DE RMN DE  $^{13}\text{C}$  DE G-H<sub>2</sub>O-6D (a) E ESTRUTURA QUÍMICA DO AGAROBITOL 6<sup>2</sup>-SULFATO (b).



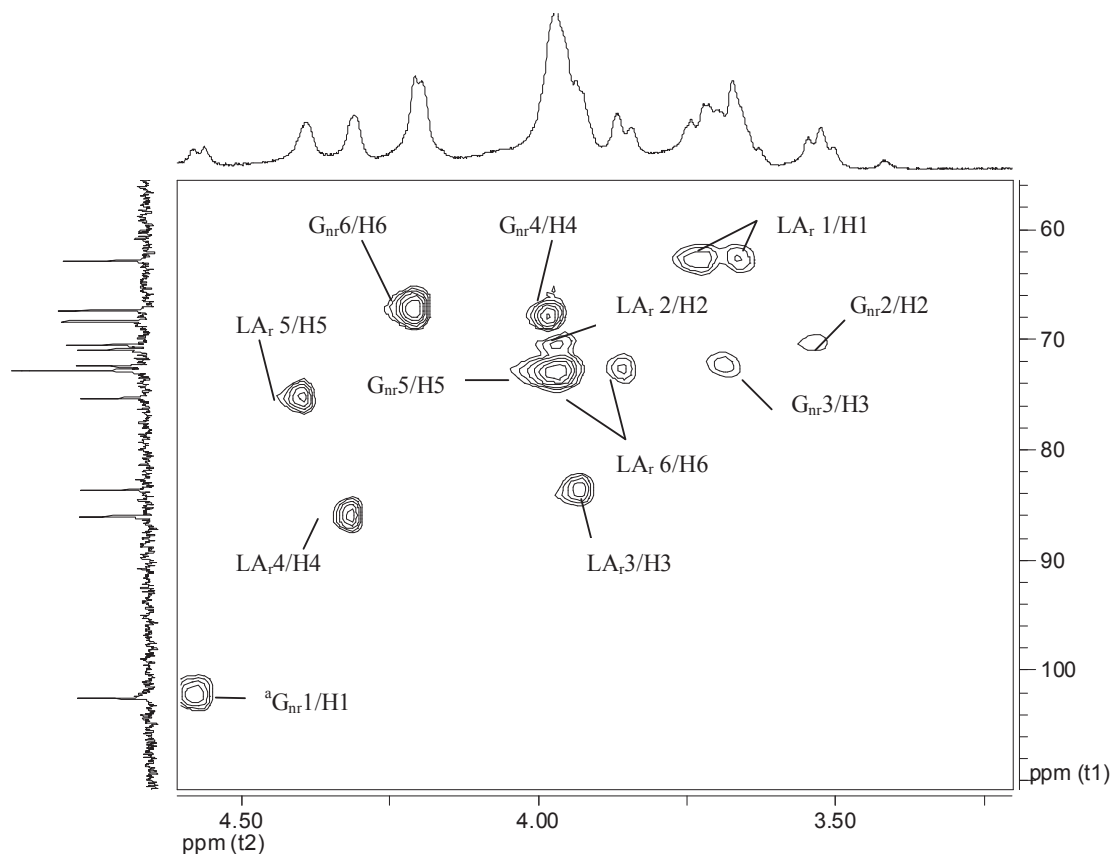
Experimento realizado a 30°C.

b



$\beta$ -D-Galp-6-sulfato-(1 $\rightarrow$ 4)-3,6-anidro-L-galactitol

**FIGURA 18 - ESPECTRO DE HMQC ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ) DA SUBFRAÇÃO G-H<sub>2</sub>O-6D (AGAROBIIITOL 6<sup>2</sup>-SULFATO).**



Experimento realizado a 30°C. <sup>a</sup> Nomenclatura análoga à usada por KNUTSEN et al. (1994): G<sub>nr</sub> – carbonos da unidade de β-D-galactopiranosose não redutora; LA<sub>r</sub> – carbonos da unidade de 3,6-anidro-L-galactitol.

É interessante observar que a cromatografia de exclusão em Bio-Gel P-2 (Figura 13, p. 40) foi capaz de separar os três dissacarídeos: agarobiitol, 6<sup>2</sup>-*O*-metil agarobiitol e agarobiitol 6<sup>2</sup>-sulfato. Houve uma boa resolução entre os dois dissacarídeos neutros, considerando que a diferença de peso molecular entre eles é de apenas 13 Da. O limite de exclusão do Bio-Gel P-2 é de 100 a 1800 Da para proteínas globulares, entretanto o agarobiitol 6<sup>2</sup>-sulfato, com peso molecular de aproximadamente 405 Da elui próximo ao volume morto. Isto ocorre devido ao enorme raio hidrodinâmico desta molécula, efeito direto das hidroxilas e principalmente do grupo sulfato. Estes dados reforçam a idéia que os limites de



exclusão dos géis, utilizando proteínas e carboidratos neutros (dextranas) são bem diferentes dos obtidos para os carboidratos sulfatados.

Bio-Gel P-2 é eficiente para separação de dissacarídeos alditóis neutros e monossacarídeos. Para a separação de dissacarídeos alditóis sulfatos seria necessário utilizar um gel com limite de exclusão maior.

**TABELA 2 - ASSINALAMENTO QUÍMICO DOS  $^{13}\text{C}$  E  $^1\text{H}$  DO AGAROBITOL 6<sup>2</sup>-SULFATO.**

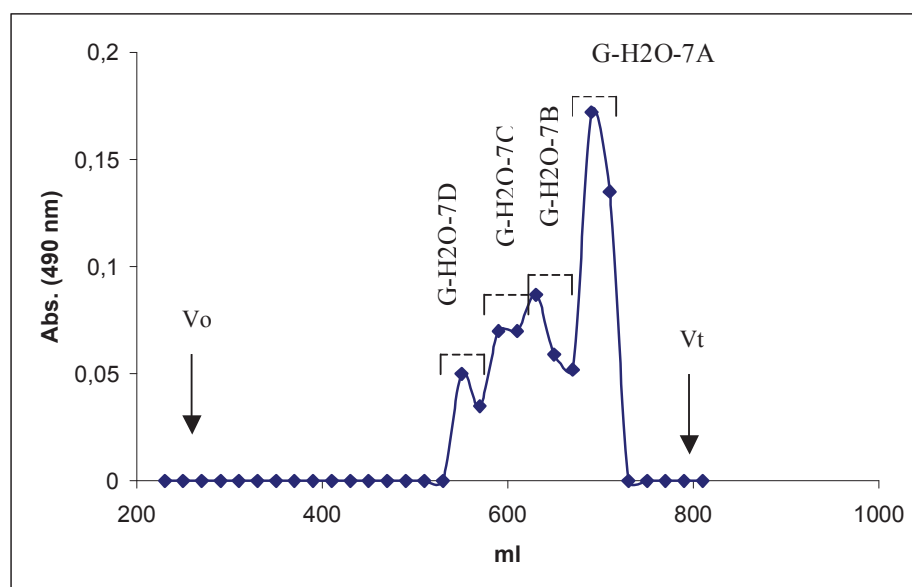
	ÁTOMOS <sup>a</sup>	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$
<b><math>\beta</math>-D-Galp 6-sulfato-(1→</b>	<b>G<sub>nr</sub>1</b>	102,5	4,57
	<b>G<sub>nr</sub>2</b>	70,5	3,54
	<b>G<sub>nr</sub>3</b>	72,4	3,68
	<b>G<sub>nr</sub>4</b>	68,4	3,98
	<b>G<sub>nr</sub>5</b>	72,8	3,97
	<b>G<sub>nr</sub>6</b>	67,4	4,21
<b>→4)-3,6-anidro- L-Galctitol</b>	<b>LA<sub>r</sub>1</b>	62,9	3,73 e 3,66
	<b>LA<sub>r</sub> 2</b>	70,9	3,97
	<b>LA<sub>r</sub> 3</b>	83,7	3,93
	<b>LA<sub>r</sub> 4</b>	86,1	4,31
	<b>LA<sub>r</sub> 5</b>	75,3	4,40
	<b>LA<sub>r</sub> 6</b>	72,8	3,86 e 3,97

<sup>a</sup> Nomenclatura análoga à usada por KNUTSEN et al. (1994): G<sub>nr</sub> – carbonos da unidade de  $\beta$ -D-galactopiranosose não redutora; LA<sub>r</sub> – carbonos da unidade de 3,6-anidro-L-galactitol.

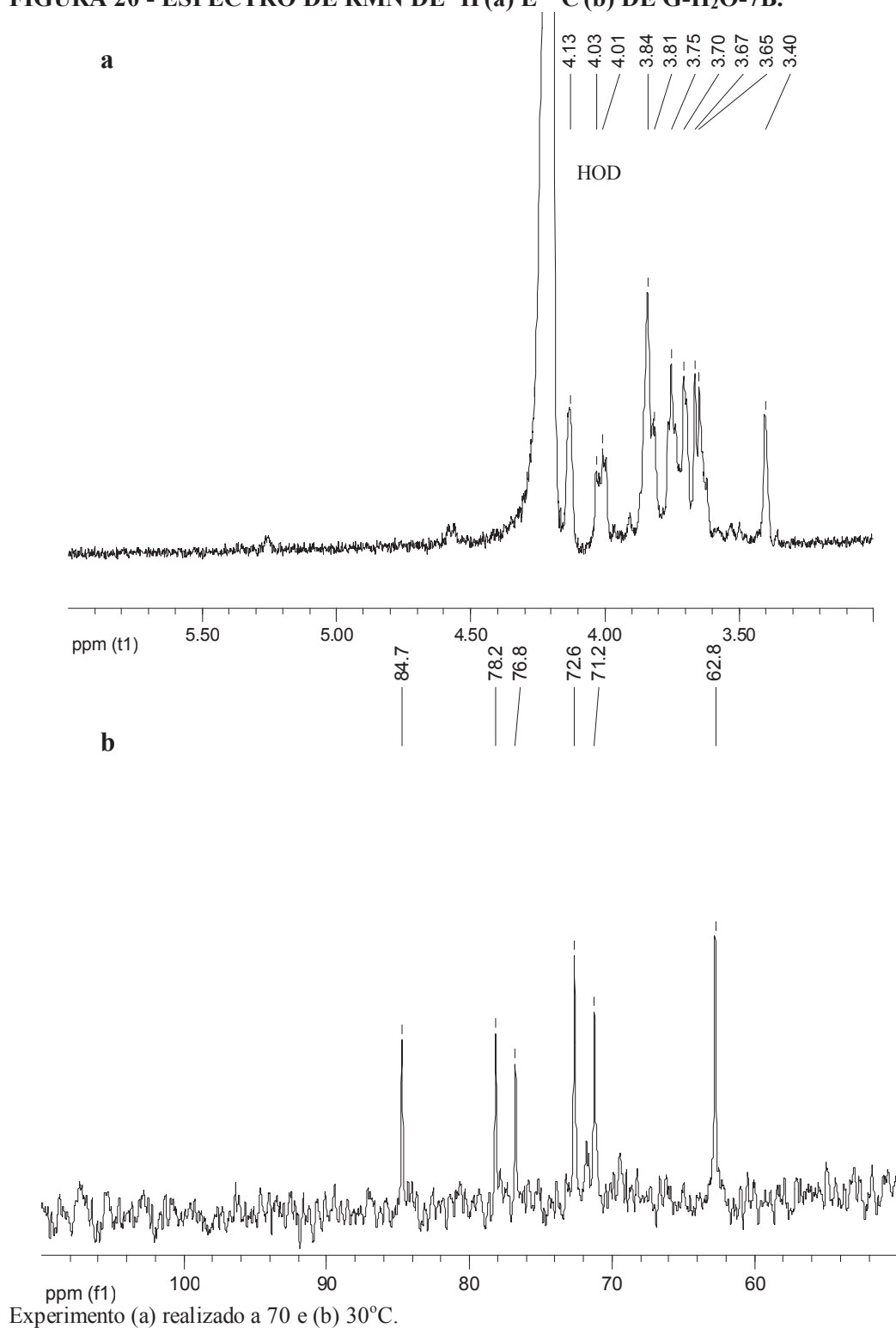
A fração G-H<sub>2</sub>O-7 corresponde a cauda do pico que deu origem a fração G-H<sub>2</sub>O-6, e eluiu no volume total da coluna de Sephadex G25 (Figura 9, p. 35). Esta fração também foi recromatografada em coluna de exclusão contendo Bio-Gel P-2 (Figura 19). O cromatograma permitiu dividir esta fração em quatro novas subfrações,

denominadas de G-H<sub>2</sub>O-7A a D. O rendimento destas subfrações não foi muito elevado ficando em torno de 3 mg.

**FIGURA 19 - CROMATOGRAMA DE EXCLUSÃO DE G-H<sub>2</sub>O-7 EM BIO-GEL P-2.**



A subfração G-H<sub>2</sub>O-7B foi analisada por RMN de <sup>1</sup>H, conforme mostra a Figura 20a. O espectro mostra a ausência de sinais de prótons anoméricos de unidades ligadas glicosidicamente, indicando a presença de monossacarídeos livres. O espectro de RMN <sup>13</sup>C desta fração (Figura 20b), mostra a presença de seis sinais de mesma intensidade. O sinal em 62,8 ppm é o mesmo que aparece nos dissacarídeos alditóis e corresponde ao C-1 do 3,6-anidro-L-galactitol. O sinal de C-3 desta unidade aparece em campo mais baixo em 84,7 ppm. A ausência de sinal na região próximo a 86 ppm indica que esta unidade não está substituída em C-4. Estes dados indicam que a subfração G-H<sub>2</sub>O-7B é constituída pelo monossacarídeo 3,6-anidro-galactitol livre. A presença deste monossacarídeo e da galactose livre na subfração G-H<sub>2</sub>O-6A confirmam a quebra de uma certa percentagem das ligações β-(1→4) pela hidrólise reductiva parcial.

**FIGURA 20 - ESPECTRO DE RMN DE  $^1\text{H}$  (a) E  $^{13}\text{C}$  (b) DE G-H<sub>2</sub>O-7B.**

A análise por RMN de  $^{13}\text{C}$  (espectro não mostrado) da fração G-H<sub>2</sub>O-7C indica a presença do dissacarídeo agarobiitol. Os sinais presentes no espectro desta fração são os mesmos da subfração G-H<sub>2</sub>O-6B (Figura 15, p. 43). As outras duas subfrações, G-H<sub>2</sub>O-7A e D devido a pouca quantidade de amostra não apresentaram espectros com um mínimo de resolução para realizar uma análise estrutural.

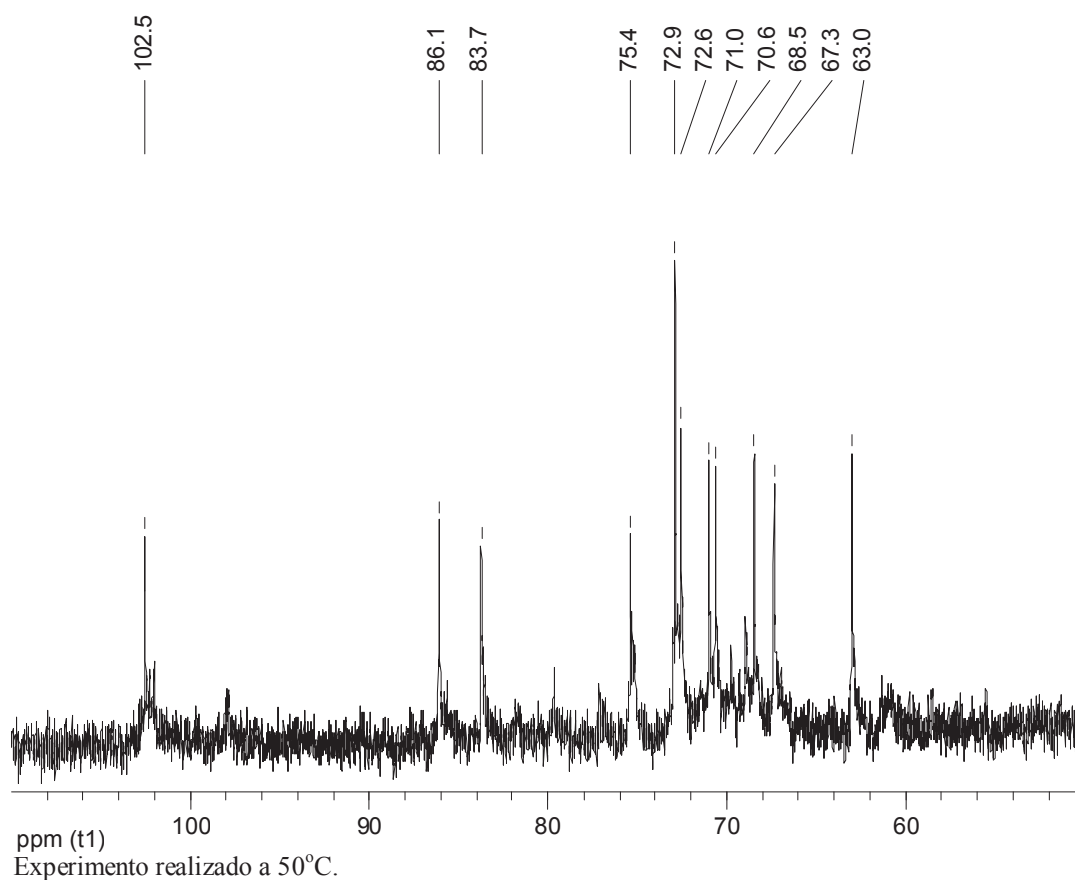
Conforme esperado, considerando o volume de eluição na cromatografia em Sephadex G25 (Figura 9, p. 35), as subfrações de G-H<sub>2</sub>O-7 são principalmente monossacarídeos e dissacarídeos neutros e a separação utilizando Bio-Gel P-2 foi eficiente em separar estas moléculas.

#### **4.3 ANÁLISE DAS FRAÇÕES G-1 E G-2 OBTIDAS DA CROMATOGRAFIA DE TROCA ANIÔNICA.**

A eluição da coluna de troca aniônica (DEAE-Sephadex A25) com o primeiro gradiente de cloreto de sódio (0-0,15 M), resultou em três frações denominadas G-1, G-2 e G-3 (Figura 8, p. 33). Devido à quantidade de sal presente nas frações, G-1 e G-2 foram submetidas a desalifcação através de cromatografia de exclusão utilizando Bio-Gel P-2. Os oligossacarídeos foram identificados através do método do fenol ácido sulfúrico (DUBOIS *et al.*, 1956) e a presença dos ânions cloreto através da reação com solução de nitrato de prata, que da origem a formação de um precipitado branco (AgCl). Monitorando-se a desalifcação através destes dois métodos, foi possível separar G-1 em duas e G-2 em três novas subfrações denominadas G-1A, G-1B e G-2A, G-2B e G-2C respectivamente.

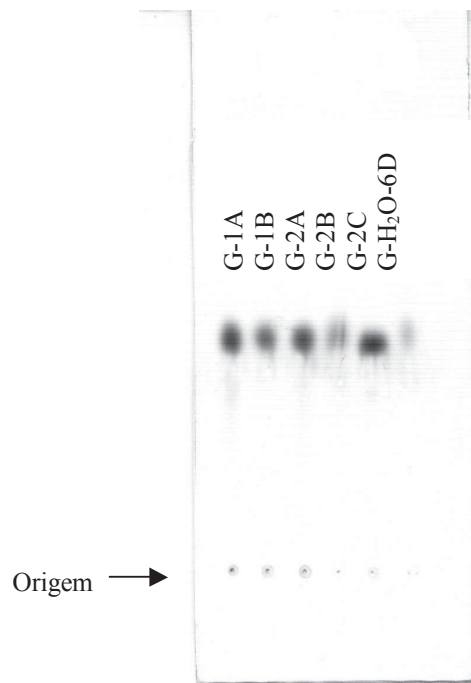
A subfração G-1A foi analisada por RMN de  $^{13}\text{C}$  e o espectro está mostrado na Figura 21. Pode-se observar a presença de onze sinais bem definidos e apenas um deles na região anomérica em 102,5 ppm. Estes sinais são iguais aos do agarobiitol 6<sup>2</sup>-sulfato (Figura 17, p. 46).

FIGURA 21 - ESPECTRO DE RMN DE  $^{13}\text{C}$  DE G-1A.



Foi realizada uma cromatografia em camada delgada (CCD) analítica (Figura 22), em sílica gel, das subfrações de G-1 e G-2. A cromatografia utilizou como fase móvel uma mistura de *n*-butanol:ácido acético:água (2:2:1), e como padrão a subfração G-H<sub>2</sub>O-6D. Os perfis de migração das cinco subfrações mostraram-se semelhantes, com a presença de uma única mancha, detectada pelo revelador para carboidratos orcinol:ácido sulfúrico. As distâncias de migração foram semelhantes à de G-H<sub>2</sub>O-6D, dando valores de retenção relativo ( $R_{\text{GH}_2\text{O-6D}}$ ), em torno de 1,0. Dessa forma G-1B e G-2A a C foram agrupadas, dando origem à fração denominada Ag-6S.

**FIGURA 22 - CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA DAS SUBFRAÇÕES DE G-1 E G-2.**



Cromatoplaça de sílica gel 60, fase móvel *n*-butanol:ácido acético:água (2:2:1), revelador orcinol:H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

O espectro de RMN de <sup>13</sup>C (Figura 23) da fração Ag-6S mostra os mesmos deslocamentos químicos, na faixa de 110 a 60 ppm, do agarobiitol 6<sup>2</sup>-sulfato (Figura 17, p. 46), como já era esperado pela análise da CCD analítica, junto com outros sinais em campo baixo.

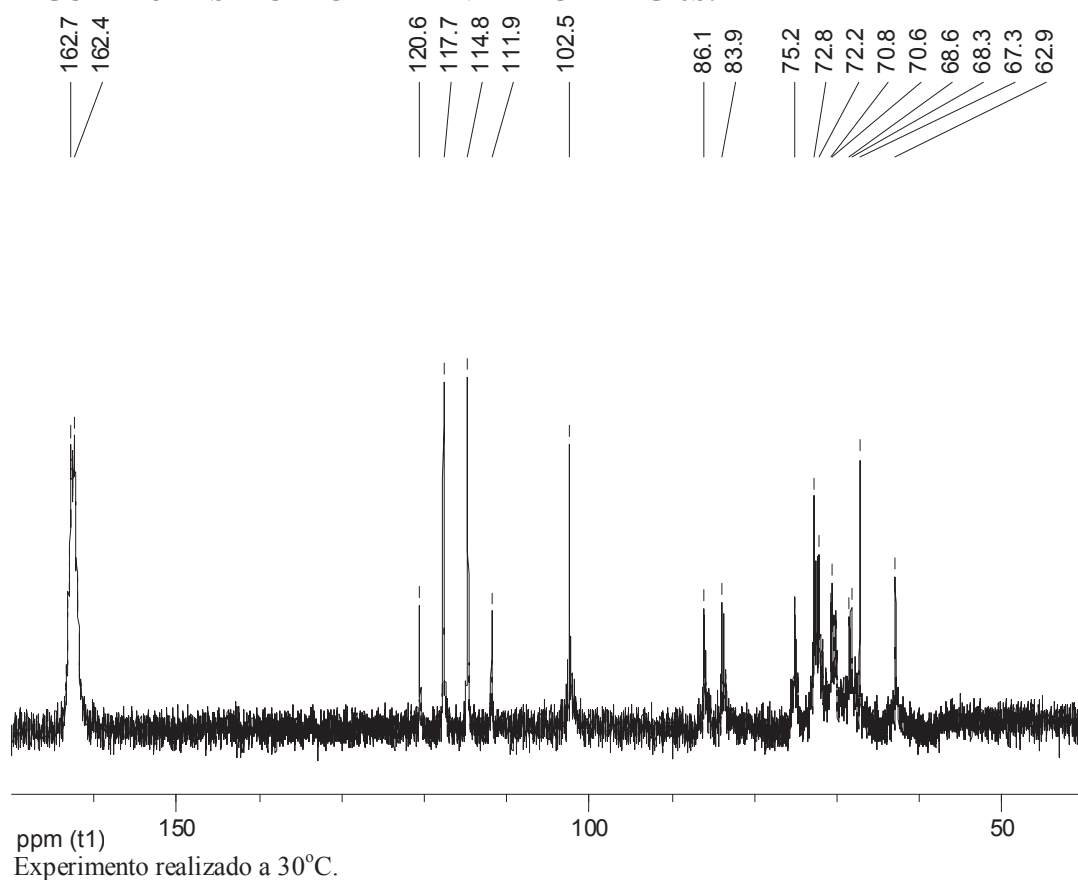
Os sinais em torno de 114 a 120 e 162 ppm, indicam a presença de um contaminante não açúcar nesta fração. A presença destes sinais foi observada após a hidrólise redutiva parcial dos polissacarídeos de *Acanthophora spicifera* (GONÇALVES, 2001). Este contaminante não está presente no reativo borano 4-metil-morfolina, pois o espectro de RMN de <sup>13</sup>C deste reativo não mostrou a presença destes sinais (espectro não mostrado).

O fato deste contaminante ter sido eluído junto com o dissacarídeo alditol sulfatado no primeiro gradiente de cloreto de sódio indica uma característica ácida

para este composto. O sinal em torno de 162 ppm corresponde a um carbono carbonílico (C=O). Este composto seria provavelmente um ácido carboxílico.

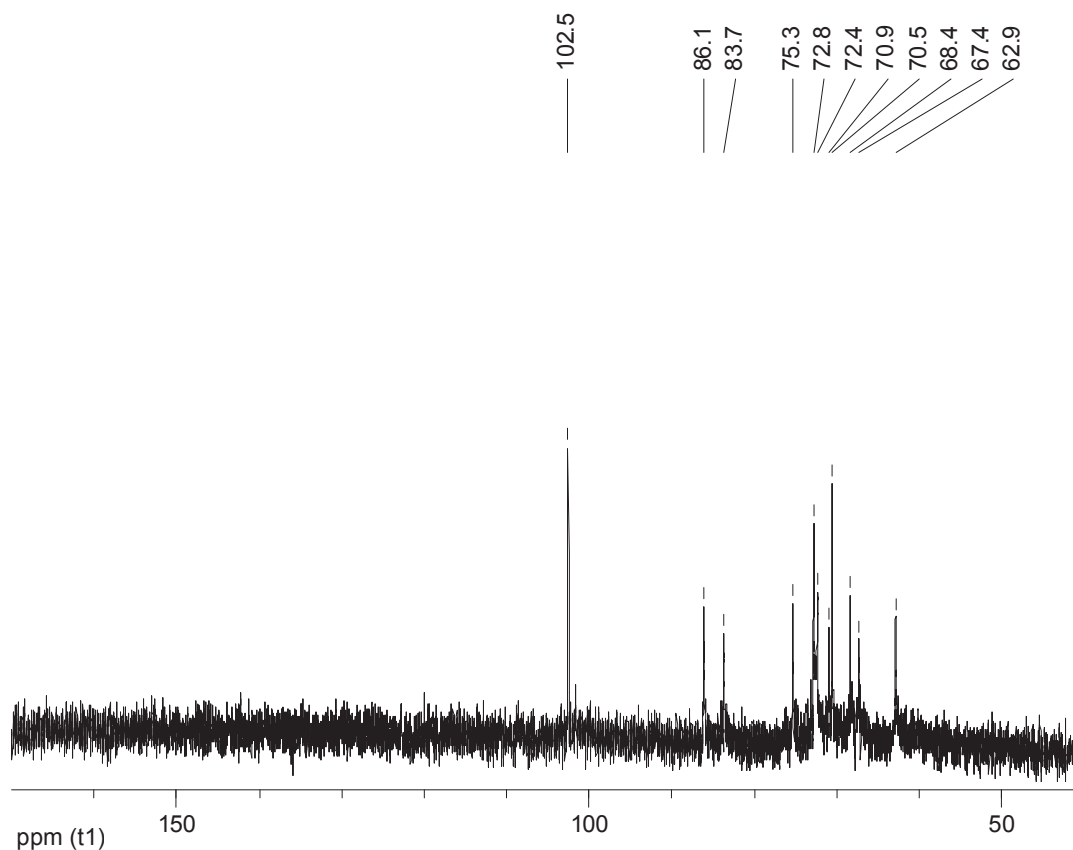
A fração Ag-6S em testes de CCD, utilizando cromatoplaças revestidas com celulose e fase móvel bastante apolar, apresentou uma mancha que eluiu junto ao frente, revelada pelo revelador para ácido orgânico anilina:glucose (STAHL, 1965). Assim Ag-6S, apresenta o dissacarídeo alditol agarobiitol 6<sup>2</sup>-sulfato e um contaminante com características ácidas como principais componentes.

**FIGURA 23 - ESPECTRO DE RMN DE <sup>13</sup>C DE AG-6S.**



O agarobiitol 6<sup>2</sup>-sulfato da fração Ag-6S, foi purificado por CCD em celulose preparativa. O composto ácido elui próximo ao frente, junto com a fase móvel, enquanto o dissacarídeo permanece na origem. A Figura 24 mostra o espectro de RMN de <sup>13</sup>C da fração Ag-6S livre do contaminante e com a presença do dissacarídeo alditol sulfatado como principal componente.

**FIGURA 24 - ESPECTRO DE RMN DE  $^{13}\text{C}$  DE AG-6S APÓS PURIFICAÇÃO EM CCD.**



Experimento realizado a 30°C.

#### **4.4 ANÁLISE DAS FRAÇÕES G-3, G-4, G-5 E G-6 OBTIDAS DA CROMATOGRAFIA DE TROCA ANIÔNICA.**

As frações G-3, G-4, G-5 e G-6 eluíram durante a lavagem da coluna de troca aniônica com maior concentração de cloreto de sódio (Figura 8, p. 33). A grande concentração de sal nestas frações inviabilizaram a desalifcação em cromatografia de exclusão utilizando Bio-Gel P-2, uma vez que era necessário dissolver estas frações com grandes volumes de água.

YANG et al. (2001) utilizaram uma extração com dimetilsulfóxido ( $\text{Me}_2\text{SO}$ ), para recuperar oligossacarídeos naturalmente piruvatados de uma mistura contendo

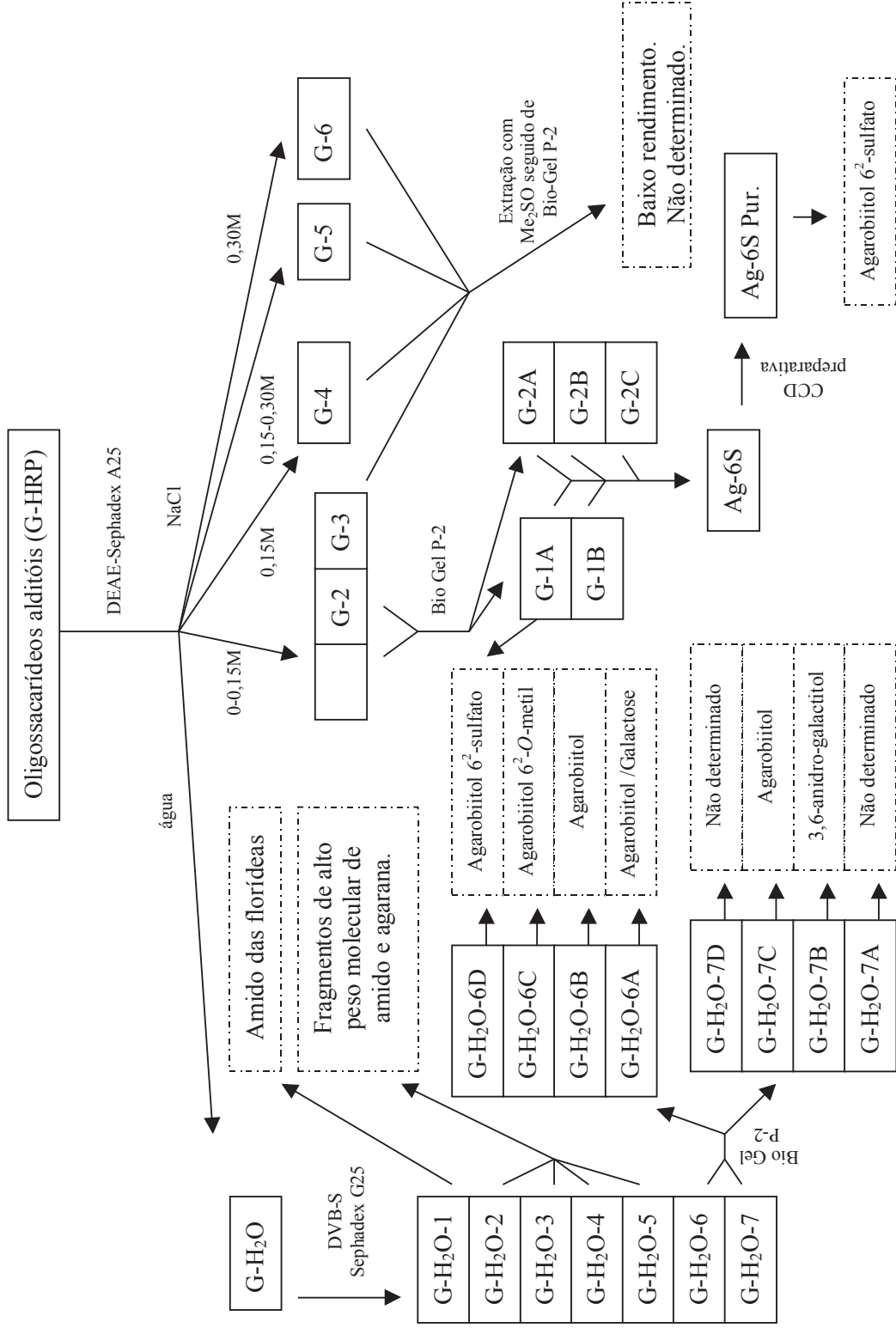


grande quantidade de sal. Diante disso estas frações foram submetidas a extrações com Me<sub>2</sub>SO. Nesta extração os oligossacarídeos alditóis são solubilizados pelo Me<sub>2</sub>SO, enquanto que o cloreto de sódio permanece insolúvel. Os oligossacarídeos são recuperados por precipitação, após adição de clorofórmio ao Me<sub>2</sub>SO. O precipitado é dissolvido em água e liofilizado. A extração com solvente orgânico não é capaz de retirar todo o sal, sendo necessário realizar um segundo passo de desalifcação em Bio-Gel P-2. Na prática, a extração com solvente mostrou-se um passo necessário para diminuir a quantidade de sal e possibilitar a desalifcação por cromatografia de exclusão.

Após os dois passos de desalifcação, foi observada a presença de carboidratos pelos testes de fenol ácido sulfúrico (DUBOIS et al., 1956). Entretanto, todas as frações apresentaram baixos rendimentos que inviabilizaram a caracterização dos oligossacarídeos presentes.

A Figura 25 mostra, resumidamente, os passos de purificação e os oligossacarídeos obtidos da hidrólise redutiva parcial das agaranas de *G. domingensis*.

**FIGURA 25 - ESQUEMA DE PURIFICAÇÃO E OLIGOSSACARÍDEOS OBTIDOS A PARTIR DA HIDRÓLISE REDUTIVA PARCIAL DAS AGARANAS DE *G. domingensis*.**



#### 4.5 EXTRAÇÃO E TRATAMENTO ALCALINO DOS POLISSACARÍDEOS DE *E. denticulatum*.

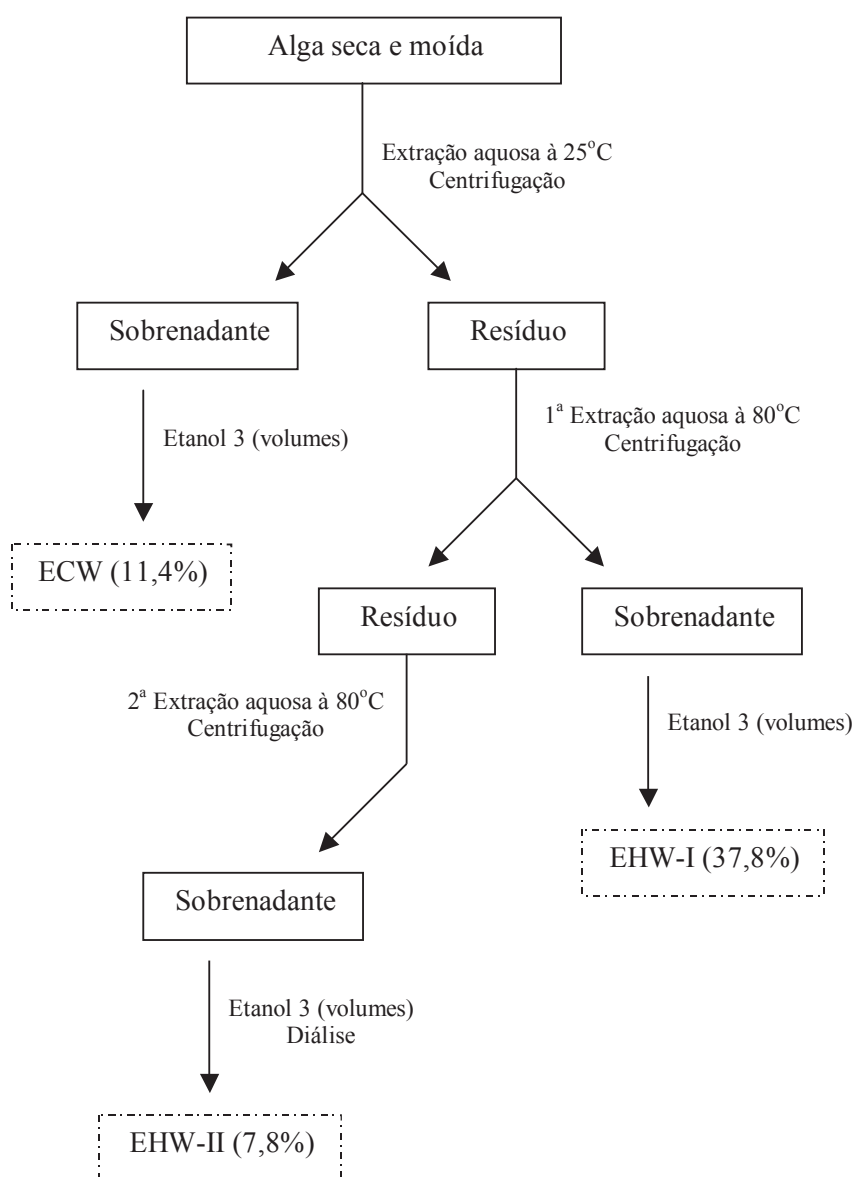
A alga seca e moída foi submetida a uma primeira extração a temperatura ambiente (25°C). Após centrifugação o sobrenadante aquoso foi concentrado parcialmente a pressão reduzida e tratado com etanol três volumes, precipitando os polissacarídeos solúveis à temperatura ambiente. O precipitado foi recolhido, solubilizado em água e liofilizado gerando a fração ECW (11,4 %).

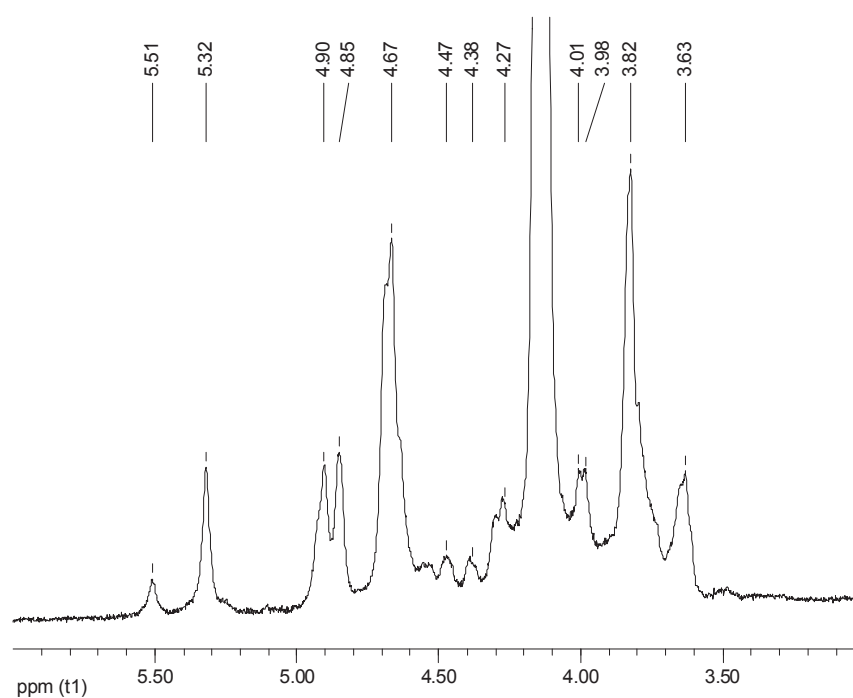
A alga residual da primeira extração foi submetida a duas extrações aquosas consecutivas a temperatura de 80°C. Na primeira extração a quente, os polissacarídeos precipitados com etanol três volumes foram recolhidos, solubilizados em água e liofilizados, rendendo a fração EHW-I (37,8%). Na segunda extração a quente, após a adição de etanol, não ocorreu precipitação apenas turvação do extrato. Por esta razão este extrato foi concentrado, dialisado e liofilizado dando origem à fração EHW-II (7,8%) (Figura 26).

O rendimento total dos polissacarídeos em relação ao peso seco da alga foi de 57%. O alto rendimento era esperado, uma vez que *E. denticulatum* é uma das principais algas cultivadas para a produção industrial de carragenanas.

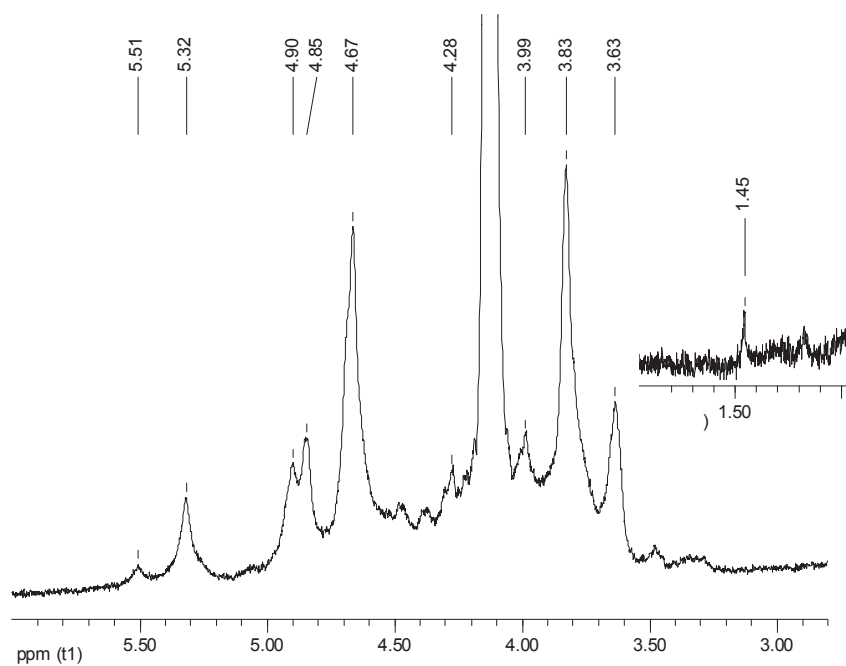
Esta alga sintetiza, como principal polissacarídeo, um híbrido de *iota/nu*-carragenana. O próton anomérico das unidades de  $\alpha$ -D-galactopiranosose 2,6-disulfato (*nu*) aparece em 5,51 ppm, enquanto o H-1 das unidades de 3,6-anidro- $\alpha$ -D-galactopiranosose 2-sulfato (*iota*) aparece em campo mais alto a 5,32 ppm (VAN de VELDE et al., 2002). Uma análise por RMN de  $^1\text{H}$  (Figuras 27 a 29, p. 60-61) das frações obtidas permitiu, rapidamente, identificar e determinar o teor relativo de *iota* e *nu*-carragenana presente em cada fração (Tabela 3, p. 62) através da integração dos picos anoméricos.

**FIGURA 26 - ESQUEMA DE EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS DE *E. denticulatum*.**



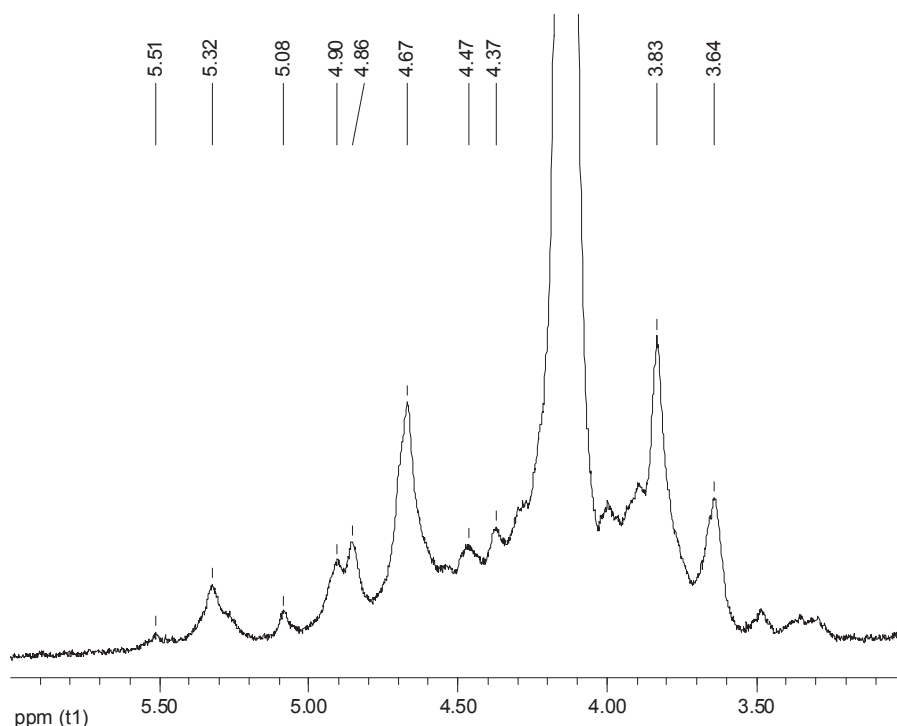
**FIGURA 27 - ESPECTRO DE RMN DE  $^1\text{H}$  DA FRAÇÃO ECW.**

Experimento realizado a  $80^\circ\text{C}$ .

**FIGURA 28 - ESPECTRO DE RMN DE  $^1\text{H}$  DA FRAÇÃO EHW-I.**

Experimento realizado a  $80^\circ\text{C}$ .

**FIGURA 29 - ESPECTRO DE RMN DE  $^1\text{H}$  DA FRAÇÃO EHW-II.**



Experimento realizado a 80°C.

A extração realizada a frio (ECW) apresentou maior quantidade de *nu*-carragenana (29%) e a última extração a quente (EHW-II) a menor (15%). Esta relação está de acordo com a solubilidade destes polímeros, já que os polissacarídeos mais sulfatados são mais solúveis em água.

A fração EHW-II, pelo espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 29), possui unidades de 3,6-anidro- $\alpha$ -D-galactopiranosose indicado pelo sinal de H-1 destes resíduos em 5,08 ppm (KNUTSEN e GRASDALEN, 1987).

A fração EHW-I apresentou um sinal de fraca intensidade em 1,45 ppm no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 28). Este sinal é assinalado como pertencente aos prótons do grupo metil do substituinte 4,6-*O*-(1'-carboxietilideno) (VAN de VELDE et al., 2002). Este tipo de substituinte nunca foi relatado para os polissacarídeos de *E. denticulatum*. Esta foi uma das razões que determinou a escolha de EHW-I para ser submetida à hidrólise redutiva parcial, uma vez que a determinação da estrutura de

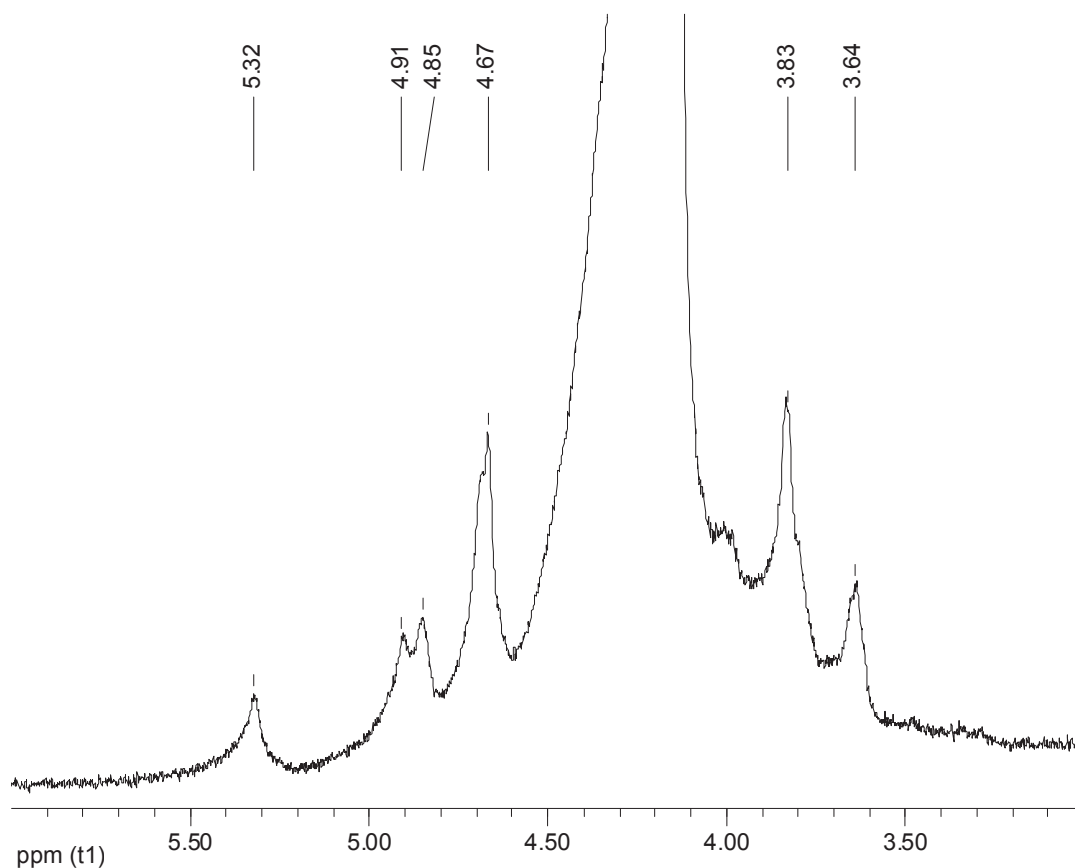
polissacarídeos através da obtenção de oligossacarídeos permite um estudo mais detalhado da estrutura química fina destes biopolímeros.

**TABELA 3 - PERCENTAGEM DE *NU* E *IOTA*-CARRAGENANA PRESENTE NAS FRAÇÕES OBTIDAS DE *E. denticulatum* DETERMINADAS POR RMN DE <sup>1</sup>H.**

<b>FRAÇÃO</b>	<b><i>NU</i>-CARRAGENANA (%)</b>	<b><i>IOTA</i>-CARRAGENANA (%)</b>
<b>ECW</b>	29	71
<b>EHW-I</b>	23	77
<b>EHW-II</b>	15	85

As condições da HRP favorecem a quebra das ligações 3,6-anidro-galactosídicas. Com intuito de diminuir o teor de *nu*-carragenana e conseqüentemente aumentar o teor de *iota*-carragenana, EHW-I foi submetida ao tratamento alcalino (NaOH 1M, 80°C, 30 min.) segundo NOSEDA e CERZO (1995), dando origem a fração EHW-I-TA. A formação da ligação 3,6-anidro ocorre através da eliminação do grupo sulfato de C-6 das unidades de  $\alpha$ -D-galactopiranosose 2,6-disulfato em meio alcalino. A formação da ligação ocorre em dois passos: primeiramente o meio alcalino desprotona as hidroxilas produzindo ânions alcóxidos. A  $\alpha$ -D-galactopiranosose 2,6-disulfato passa da conformação <sup>4</sup>C<sub>1</sub> (6-OSO<sub>3</sub><sup>-</sup> equatorial) para <sup>1</sup>C<sub>4</sub> (6-OSO<sub>3</sub><sup>-</sup> axial). Este passo coloca o C-6 sulfatado e o alcóxido de C-3 nas posições *cis* axiais. O segundo passo é o ataque nucleofílico do alcóxido de C-3 ao C-6, resultando na formação da ligação 3,6-anidro no mesmo resíduo de galactose e liberação do grupo sulfato de C-6 (de RUITER e RUDOLPH, 1997). O rendimento do tratamento alcalino ficou em torno de 70%, semelhante ao obtido por AGUILAN et al. (2003) para esta alga. Após o tratamento alcalino, EHW-I-TA foi analisada por RMN de <sup>1</sup>H (Figura 30). O sinal de H-1 das unidades de  $\alpha$ -D-galactopiranosose 2,6-disulfato, em 5,51 ppm desaparece, restando apenas o sinal em 5,32 ppm que corresponde ao H-1 das unidades de 3,6-anidro- $\alpha$ -D-galactopiranosose 2-sulfato.

**FIGURA 30 - ESPECTRO DE RMN DE  $^1\text{H}$  DA FRAÇÃO EHW-I-TA.**



Experimento realizado a 80°C.

#### **4.6 HIDRÓLISE REDUTIVA PARCIAL DE EHW-I-TA.**

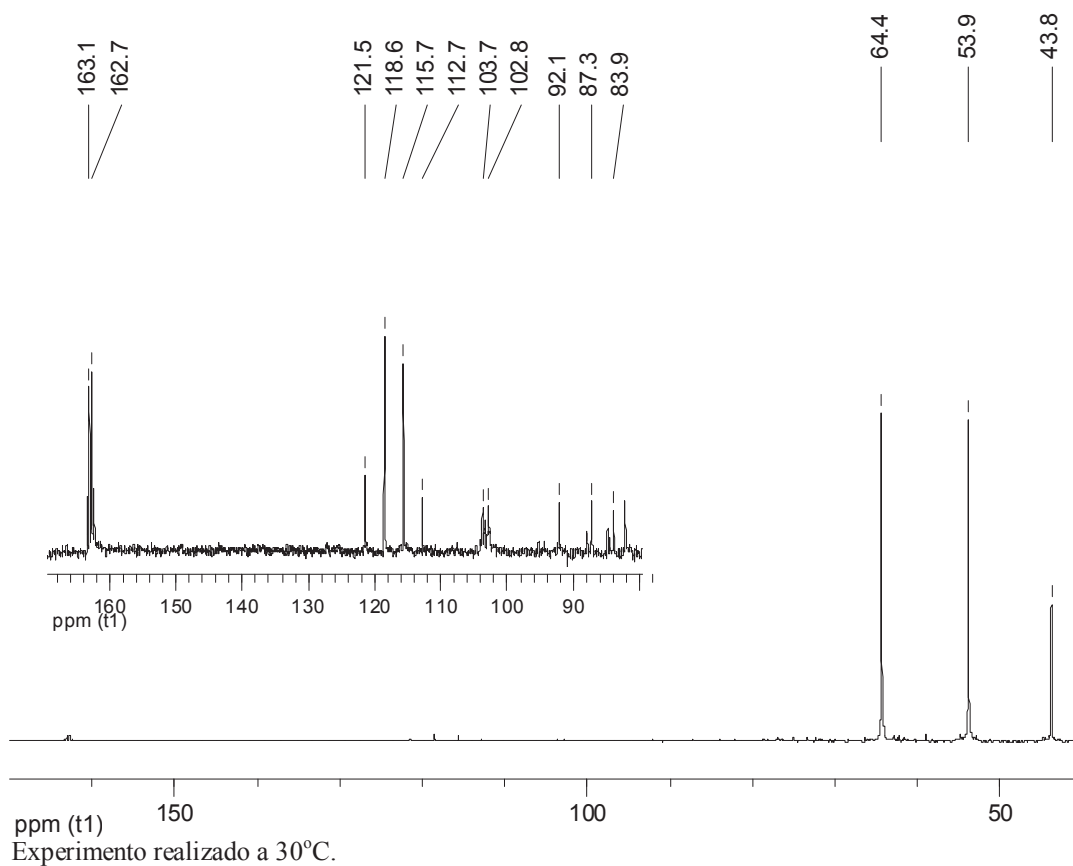
A fração EHW-I-TA (1,0 g) foi submetida à hidrólise reductiva parcial de acordo com as condições descritas por USOV e ELASHVILI (1991). O hidrolisado obtido foi evaporado, até a secura, tratado com metanol, dissolvido em água e liofilizado, sendo denominado de NEC-HRP.

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de NEC-HRP (Figura 31), mostra em maior intensidade os sinais da 4-metil-morfolina em 43,8, 53,9 e 64,4 ppm. Os sinais em campo mais baixo, em torno de 162 e 112 a 120 ppm, correspondem ao contaminante ácido já encontrado durante as etapas de purificação dos oligossacarídeos obtidos de *G. domingensis* (Figura 23, p. 54). Os sinais entre 80 e 87 ppm pertencem aos



carbonos 3 e 4 das unidades de 3,6-anidro-D-galactitol, confirmando a presença de oligossacarídeos alditóis no hidrolisado. O sinal em 92,1 ppm corresponde ao C-1 das unidades de 3,6-anidro- $\alpha$ -D-galactopiranosose 2-sulfato (VAN de VELDE et al., 2002), e confirma a existência de fragmentos com quatro ou mais unidades monossacarídicas.

**FIGURA 31 - ESPECTRO DE RMN DE  $^{13}\text{C}$  DA FRAÇÃO NEC-HRP, COM AMPLIAÇÃO DA REGIÃO ENTRE 170 E 80 PPM.**



O primeiro passo de purificação (Ver esquema completo de purificação na Figura 59, p. 104) ao qual foi submetido o hidrolisado NEC-HRP foi para separar os oligossacarídeos da 4-metil-morfolina, através de cromatografia de troca catiônica. Conforme já relatado, a 4-MM é retida pela resina e os oligossacarídeos são eluídos com água. Como a resina catiônica encontra-se na forma ácida, o eluato aquoso contendo os oligossacarídeos possui um pH muito baixo. Após neutralização o eluato foi concentrado até *secura*.

O segundo passo de purificação foi submeter NEC-HRP, agora livre da 4-MM, a diálise fechada em água destilada utilizando membrana de diálise capaz de reter moléculas com massa molecular maior ou igual a 2000 Da. A água de diálise foi monitorada até teste de fenol ácido sulfúrico negativo. Após concentração, a água de diálise deu origem a fração NEC-DIAL e o material retido na membrana de diálise a fração NEC-RET.

A diálise teve por objetivo separar os oligossacarídeos sulfatados dos monossacarídeos e sais gerados durante a hidrólise e o processo de neutralização. Esta etapa visava aumentar a eficiência do passo seguinte de purificação para separar os oligossacarídeos sulfatados.

#### 4.7 ANÁLISE DA FRAÇÃO NEC-DIAL

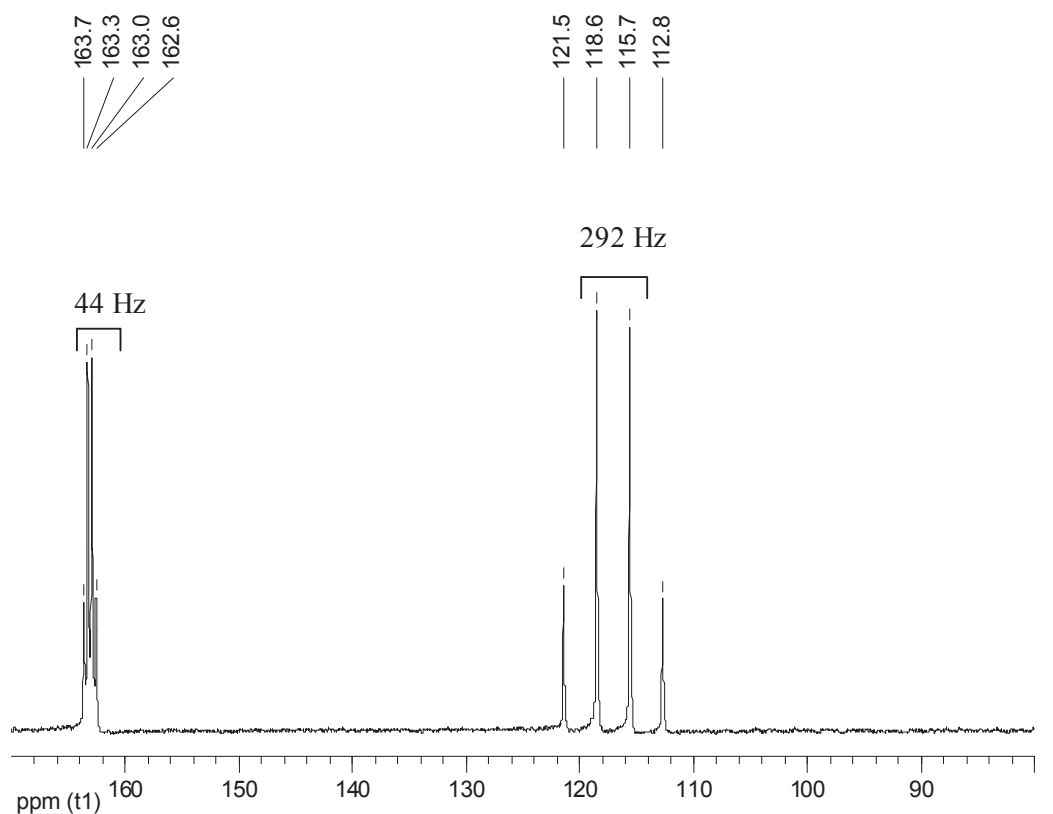
A fração NEC-DIAL foi analisada por RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 32). Embora os testes de fenol ácido sulfúrico tenham dado resultados positivos, o espectro não mostra a presença de nenhum sinal referente a carboidratos. São observados 8 sinais na região de 112 a 120 e 160 ppm. Estes sinais correspondem ao contaminante ácido encontrado no hidrolisado (NEC-HRP). Este composto possui baixo peso molecular, uma vez que não foi retido pela membrana de diálise. Devido às características ácidas, foi suspeitado que este contaminante poderia ser da solução de ácido trifluoracético (TFA) usada na hidrólise.

A análise por RMN de  $^{13}\text{C}$  de uma solução de TFA (espectro não mostrado) mostrou a presença dos mesmos sinais encontrados no espectro da fração NEC-DIAL. Estes dados indicam que o contaminante ácido nada mais é que do que o TFA utilizado na HRP.

A molécula de TFA possui três átomos de  $^{19}\text{F}$ , cujo spin nuclear possui um valor de 1/2. O experimento de RMN de  $^{13}\text{C}$  realizado desacopla os núcleos de  $^1\text{H}$ , mas não os de  $^{19}\text{F}$ . Isto explica a presença de oito picos, dois quartetos, no espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do TFA. O carbono ligado aos três átomos de flúor aparece na forma de um multiplete na região de 112 a 121 ppm. Os átomos de flúor conseguem acoplar até

com o carbono do grupo carboxila, resultando no multiplete na região de 162 ppm. As constantes de acoplamento foram de  $^1J_{CF}$  292,0 Hz e  $^2J_{CF}$  44,0 Hz, semelhantes às descritas por BREITMAIER e VOELTER (1987).

**Figura 32. Espectro de RMN de  $^{13}C$  da fração NEC-DIAL.**



Experimento realizado a 50°C.

Na hidrólise reductiva parcial a quantidade de TFA usada é muito grande, cerca de 5,7 g para cada 1 g de polissacarídeo hidrolisado. O hidrolisado é submetido à evaporação, a pressão reduzida, visando evaporar o TFA. Entretanto, o TFA do hidrolisado provavelmente deve formar um sal, inviabilizando a sua retirada por evaporação. A principal hipótese sugere que este sal seja formado com a amina terciária 4-MM (trifluoracetato de 4-metil-morfólônio).

A cromatografia de troca catiônica é essencial no processo de purificação dos oligossacarídeos obtidos por hidrólise reductiva parcial. Nesta cromatografia ocorre a troca do cátion 4-metil-morfólônio pelo próton, formando novamente TFA. Após neutralização do eluato é formado novamente um sal contendo trifluoracetato. A

diálise, utilizando membrana de diálise capaz de reter moléculas com massa molecular maior que 2000 Da, mostrou-se também essencial no processo de purificação dos oligossacarídeos alditóis, pois permite separar o trifluoracetato da mistura oligossacarídica.

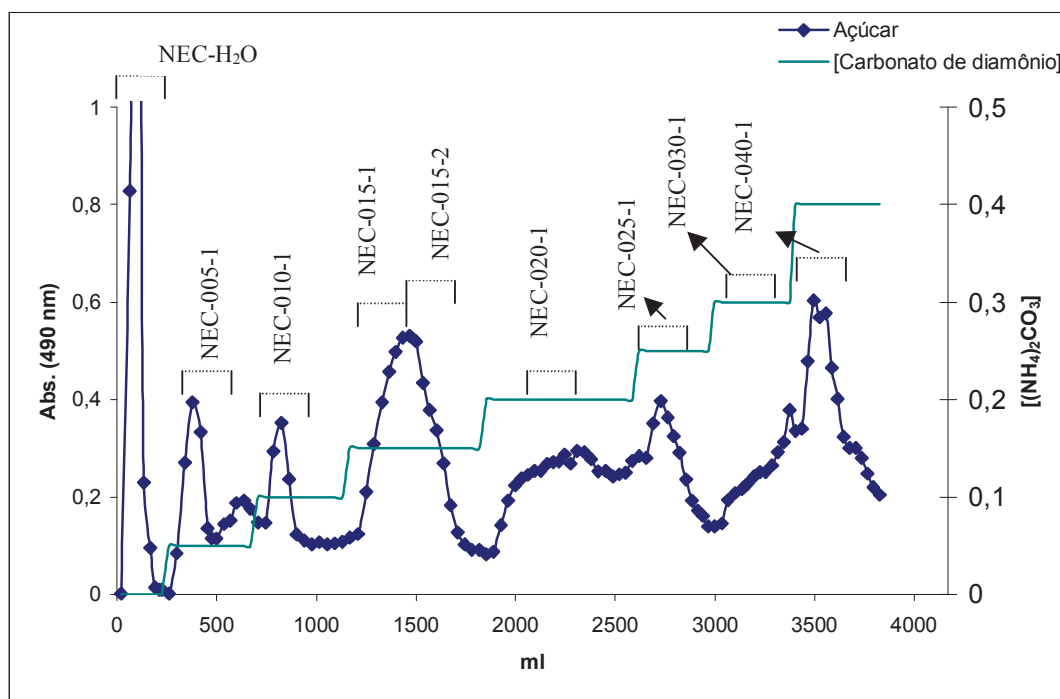
#### 4.8 ANÁLISE DA FRAÇÃO NEC-RET

A fração retida pela membrana de diálise, contendo os oligossacarídeos sulfatados, foi submetida à cromatografia de troca aniônica utilizando DEAE-Sepharose CL-6B (Figura 33). Algumas mudanças foram feitas em relação à cromatografia de troca aniônica realizada na purificação dos oligossacarídeos alditóis obtidos de *G. domingensis*. Além de água, a coluna foi eluída com diferentes concentrações de soluções de carbonato de amônio ( $[\text{NH}_4]_2\text{CO}_3$ ). Este sal, por evaporação a pressão reduzida, é eliminado evitando dessa forma a necessidade de desalinificação das frações obtidas. Optou-se por eluir a coluna com gradiente descontínuo. A utilização deste tipo de gradiente visou a obtenção de picos mais definidos no cromatograma e uma purificação mais efetiva dos oligossacarídeos. Nas primeiras eluições o intervalo entre as concentrações foi de 0,05M e na última de 0,10M.

Como *E. denticulatum* sintetiza carragenanas com até um grupo sulfato por unidade monossacarídica, a coluna foi eluída com solução de carbonato de amônio até concentração de 0,4M.

A Figura 33 mostra, além do cromatograma, as frações obtidas. Pode-se observar picos bem definidos nas eluições realizadas com água e com baixas concentrações de sal (0,05, 0,10 e 0,15M). As eluições com maior força iônica (0,20 a 0,40M) resultaram em platôs ou picos não muito definidos.

**FIGURA 33 - CROMATOGRAMA DE TROCA ANIÔNICA DA FRAÇÃO NEC-RET EM DEAE-SEPHAROSE CL-6B.**

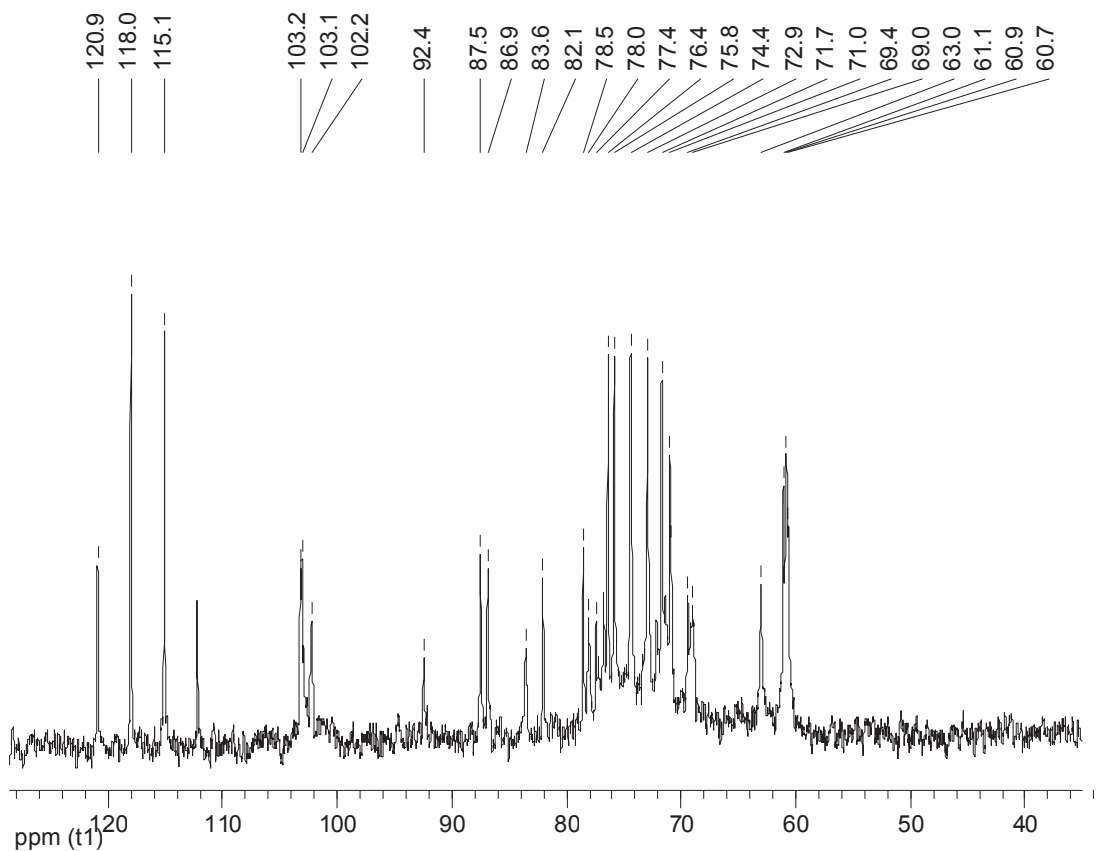


#### 4.9 ANÁLISE DA FRAÇÃO NEC-H<sub>2</sub>O

O eluato aquoso da cromatografia de troca aniônica deu origem a fração denominada NEC-H<sub>2</sub>O. Esta fração apresentou massa de aproximadamente 1,2 g, muito superior a de polissacarídeos hidrolisados (1,0 g). A análise do espectro de RMN de <sup>13</sup>C de NEC-H<sub>2</sub>O (Figura 34) mostra a presença dos sinais correspondentes ao sal de TFA, em torno de 118 ppm, justificando o elevado rendimento desta fração.

A presença do TFA diminuiu a eficiência do processo cromatográfico em coluna de troca aniônica. Prova disso é o sinal em 92,4 ppm, correspondente ao C-1 da 3,6-anidro- $\alpha$ -D-galactopiranosse 2-sulfato, que indica a eluição de oligossacarídeos sulfatados no eluato aquoso.

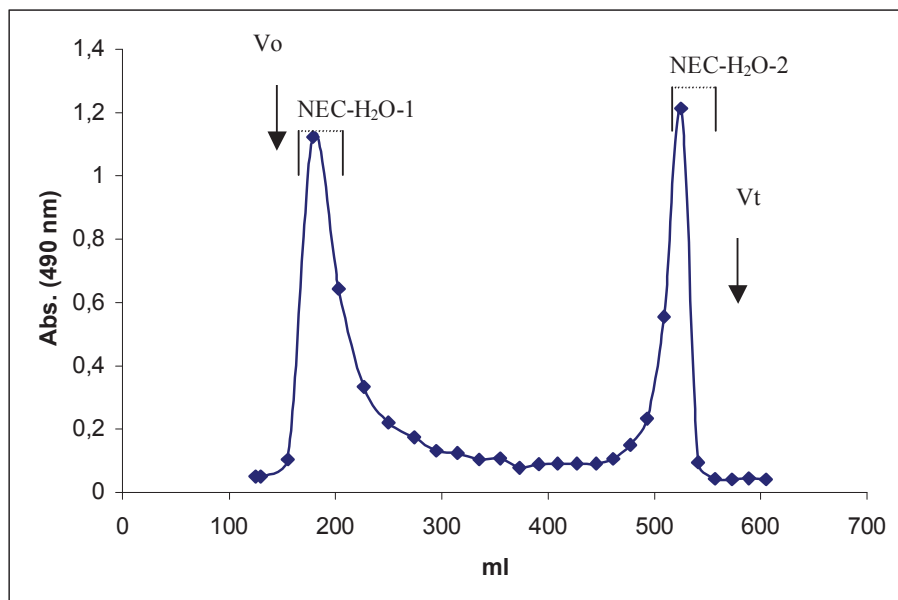
**FIGURA 34 - ESPECTRO DE RMN DE  $^{13}\text{C}$  DA FRAÇÃO NEC-H<sub>2</sub>O.**



Experimento realizado a 30°C.

Com o objetivo de purificar os oligossacarídeos presentes na fração NEC-H<sub>2</sub>O, foi realizada uma cromatografia de exclusão utilizando Bio-Gel P-6 DG (limite de exclusão de 1000 a 6000 Da). O cromatograma (Figura 35) mostra a presença de dois picos bem definidos. A fração eluída próximo ao volume morto foi denominada de NEC-H<sub>2</sub>O-1 e a eluída próximo ao volume total de NEC-H<sub>2</sub>O-2.

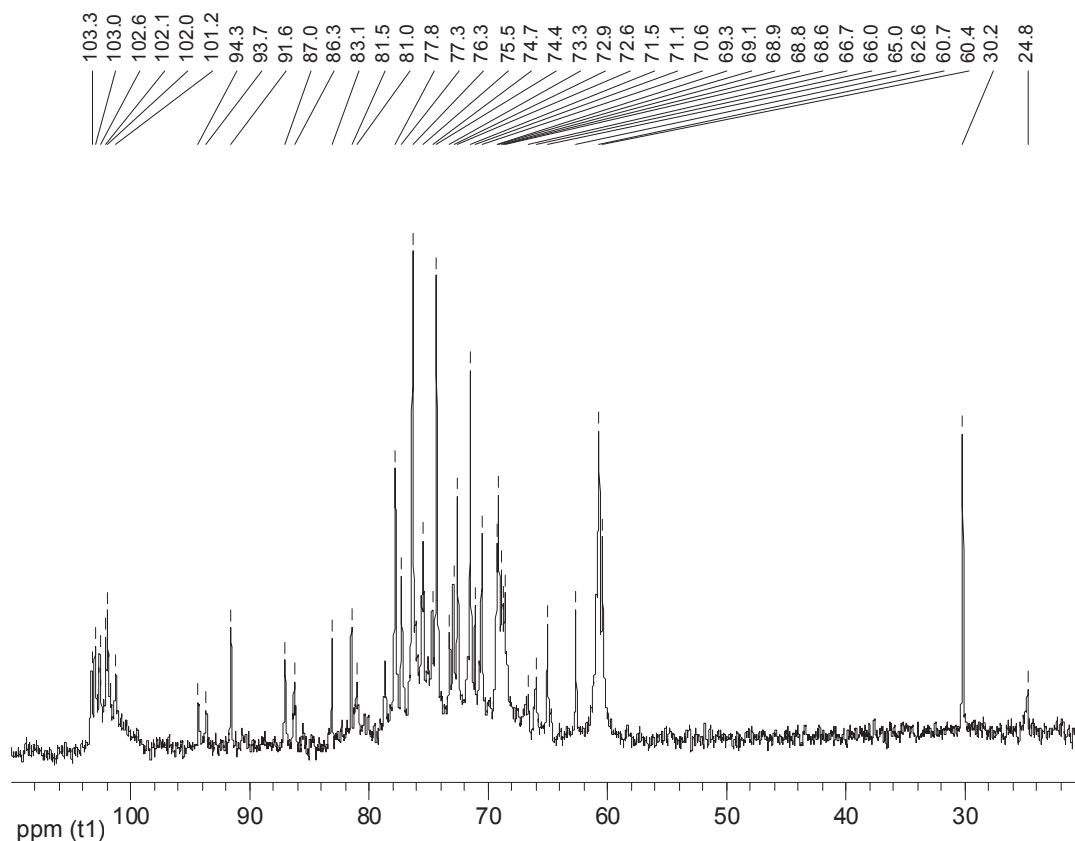
**FIGURA 35 - PERFIL DE ELUIÇÃO DA CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO DA FRAÇÃO NEC-H<sub>2</sub>O EM BIO-GEL P-6 DG.**



A fração NEC-H<sub>2</sub>O-1 conforme mostra o espectro de RMN de <sup>13</sup>C (Figura 36) e indica o volume de eluição, é composta principalmente por oligossacarídeos com mais de quatro unidades monossacarídicas. O espectro mostra na região anomérica (90 a 110 ppm) vários sinais. É possível observar sinais correspondentes a C-1 da unidade de 3,6-anidro- $\alpha$ -D-galactopiranosose em 94,3 ppm, além do sinal de C-1 desta unidade sulfatada em C-2 (91,6 ppm) (VAN de VELDE et al., 2002).

Os oligossacarídeos contendo unidades de 3,6-anidro- $\alpha$ -D-galactopiranosose, podem ter sido originados da hidrólise de *kappa*-carragenana, uma vez que *E. denticulatum* é capaz de sintetizar este polissacarídeo (BELLION et al., 1982). No entanto, a possibilidade da hidrólise redutiva parcial estar provocando a quebra da ligação éster sulfato presente em C-2 das unidades de 3,6-anidro- $\alpha$ -D-galactopiranosose na *iota*-carragenana, também existe.

**FIGURA 36 - ESPECTRO DE RMN DE  $^{13}\text{C}$  DE NEC-H<sub>2</sub>O-1.**



Experimento realizado a 30°C.

O sinal que mais chamou a atenção nesta fração foi o que apareceu em 24,8 ppm. Este sinal corresponde ao grupo metil do 4,6-*O*-(1'-carboxietilideno). GAREGG et al. (1980) demonstraram que quando este grupo substituinte possui a configuração R, o grupo metil apresenta sua ressonância em torno de 25 ppm, enquanto que na configuração S aparece em aproximadamente 17 ppm.

Os sinais em 65,0, 66,0 e 66,7, 101,2 ppm podem ser assinalados como pertencentes a C-6, C-5, C-4 e C-1 da unidade de 4,6-*O*-(1'-carboxietilideno)- $\beta$ -D-galactopiranosose ligada a unidade de 3,6-anidro- $\alpha$ -D-galactopiranosose 2-sulfato (CHIOVITTI et al., 2001). Este tipo de substituição nunca foi relatado para as carragenanas produzidas por *E. denticulatum*.

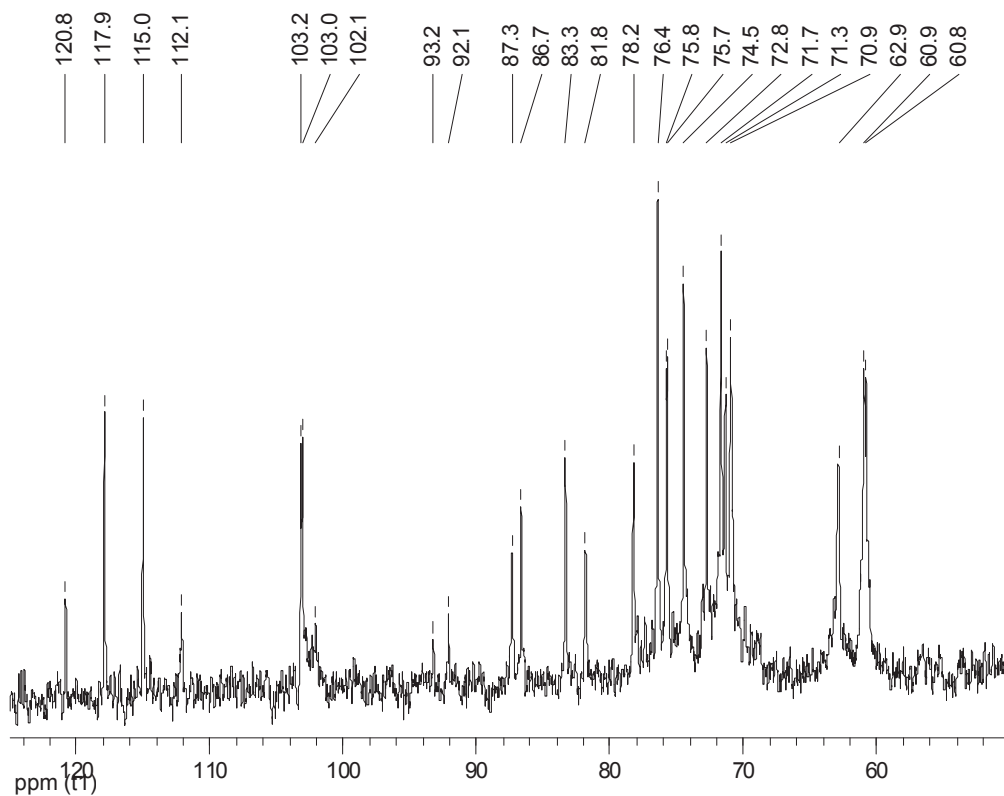


A utilização da hidrólise redutiva parcial para o estudo da estrutura química fina de galactanas obtidas de algas vermelhas mostrou-se uma técnica bastante útil. A obtenção de oligossacarídeos, após purificação, permite estudar fragmentos que representam estruturas polissacarídicas minoritárias sintetizadas pela alga.

A análise por RMN  $^{13}\text{C}$  da fração NEC-H<sub>2</sub>O-2 eluída no volume total da cromatografia de exclusão em Bio-Gel P-6 DG, mostra dois sinais de maior intensidade na região anomérica em 103,2 e 103,0 ppm (Figura 37). Considerando o volume de eluição desta fração e a presença de dois sinais principais na região anomérica, NEC-H<sub>2</sub>O-2 apresenta dissacarídeos alditóis como principais constituintes. A presença de oligossacarídeos maiores é observada pelo sinal em 92,1 ppm, que corresponde ao C-1 da unidade de 3,6-anidro- $\alpha$ -D-galactopiranosose 2-sulfato. O espectro mostra ainda a presença dos sinais correspondentes ao TFA (112 a 120 ppm).

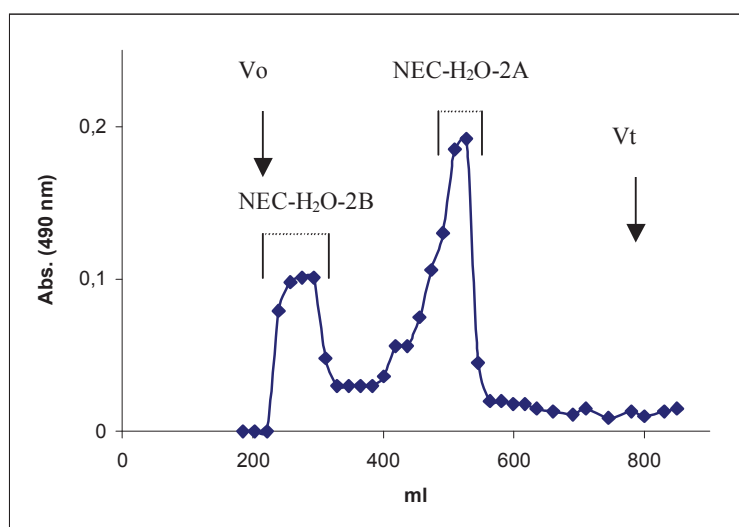
Com o objetivo de separar os dissacarídeos alditóis dos oligossacarídeos maiores, NEC-H<sub>2</sub>O-2 foi submetida a uma cromatografia de exclusão em Bio-Gel P-2. O cromatograma (Figura 38) mostra a presença de dois picos principais. O mais intenso e eluído por último deu origem a subfração NEC-H<sub>2</sub>O-2A e o menos intenso a subfração NEC-H<sub>2</sub>O-2B.

**FIGURA 37 - ESPECTRO DE RMN DE  $^{13}\text{C}$  DE NEC-H<sub>2</sub>O-2.**



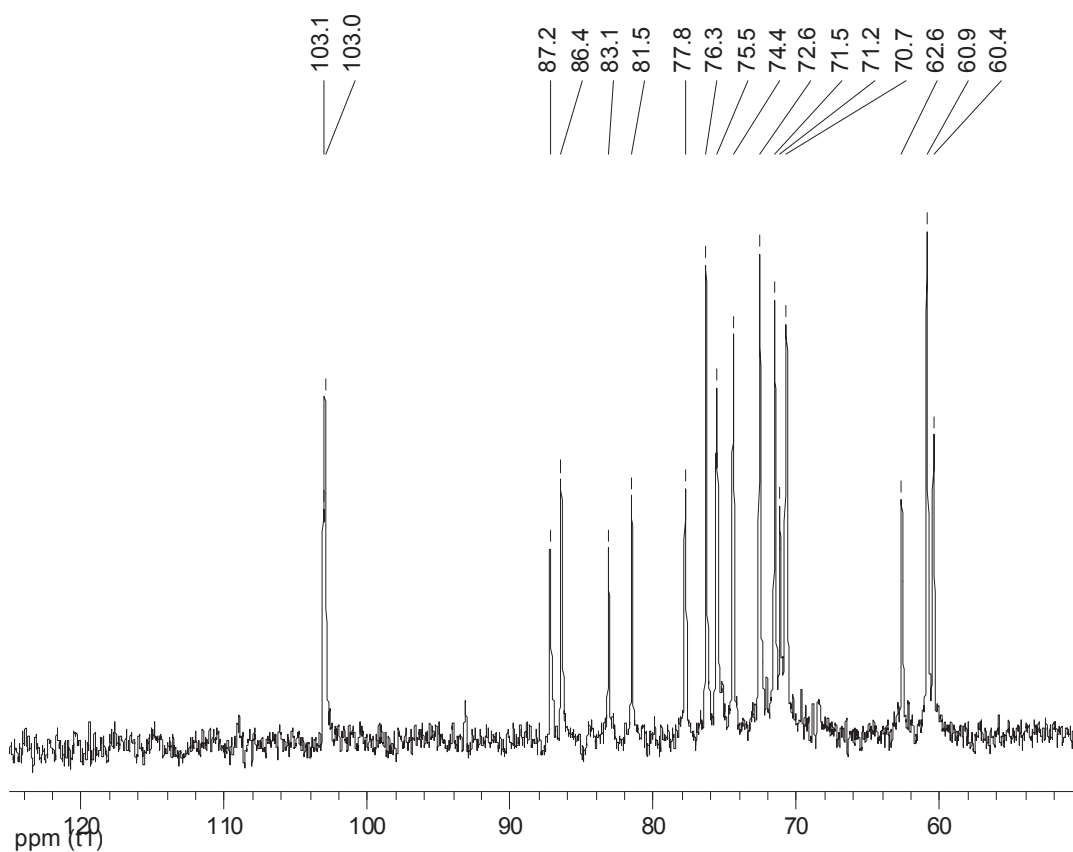
Experimento realizado a 30°C.

**FIGURA 38 - CROMATOGRAMA DE EXCLUSÃO DE NEC-H<sub>2</sub>O-2 EM BIO-GEL P-2.**



Análises por RMN de  $^{13}\text{C}$  da fração NEC-H<sub>2</sub>O-2A (espectro não mostrado) indicou a presença de TFA. Dessa forma, foi realizada uma diálise fechada utilizando membrana capaz de reter moléculas com massa molecular maior ou igual a 2000 Da. O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  desta fração (30 mg) dialisada (Figura 39) mostra a presença de 17 sinais bem definidos, sendo dois deles quase sobrepostos na região anomérica em 103,1 e 103,0 ppm.

**FIGURA 39 - ESPECTRO DE RMN DE  $^{13}\text{C}$  DE NEC-H<sub>2</sub>O-2A APÓS DIÁLISE.**



Experimento realizado a 30°C.

Os sinais em 81,5 e 83,1 ppm correspondem aos C-3 das unidades de 3,6-anidro-D-galactitol sulfatada e não sulfatada em C-2, respectivamente. A presença do grupo sulfato em C-2 destas unidades, causa um deslocamento nos sinais dos carbonos vizinhos para campo mais alto (deslocamento  $\beta$ ). O C-1 sofre este efeito, provocando

o deslocamento de 62,7 ppm na unidade não sulfatada para aproximadamente 60 ppm na unidade sulfatada. A presença do grupo sulfato em C-2 também afeta o C-4, que aparece em 87,2 ppm no 3,6-anidro-D-galactitol e em 86,4 ppm no 3,6-anidro-D-galactitol-2-sulfato. Estes sinais indicam que a principal diferença entre os dissacarídeos presentes nesta fração é o resíduo da extremidade reduzida. O conhecimento da estrutura do polissacarídeo hidrolisado sugere que a unidade de  $\beta$ -D-galactopiranosose esta sempre sulfatada em C-4 (ANDERSON et al., 1973). Assim, um dos dissacarídeos presentes nesta subfração é o carrabiitol 4<sup>2</sup>-sulfato. O sinal em 103,1 ppm corresponde ao C-1 deste dissacarídeo, conforme caracterizado por GONÇALVES et al. (em preparo). O outro dissacarídeo presente é o carrabiitol 2<sup>1</sup>,4<sup>2</sup>-disulfato.

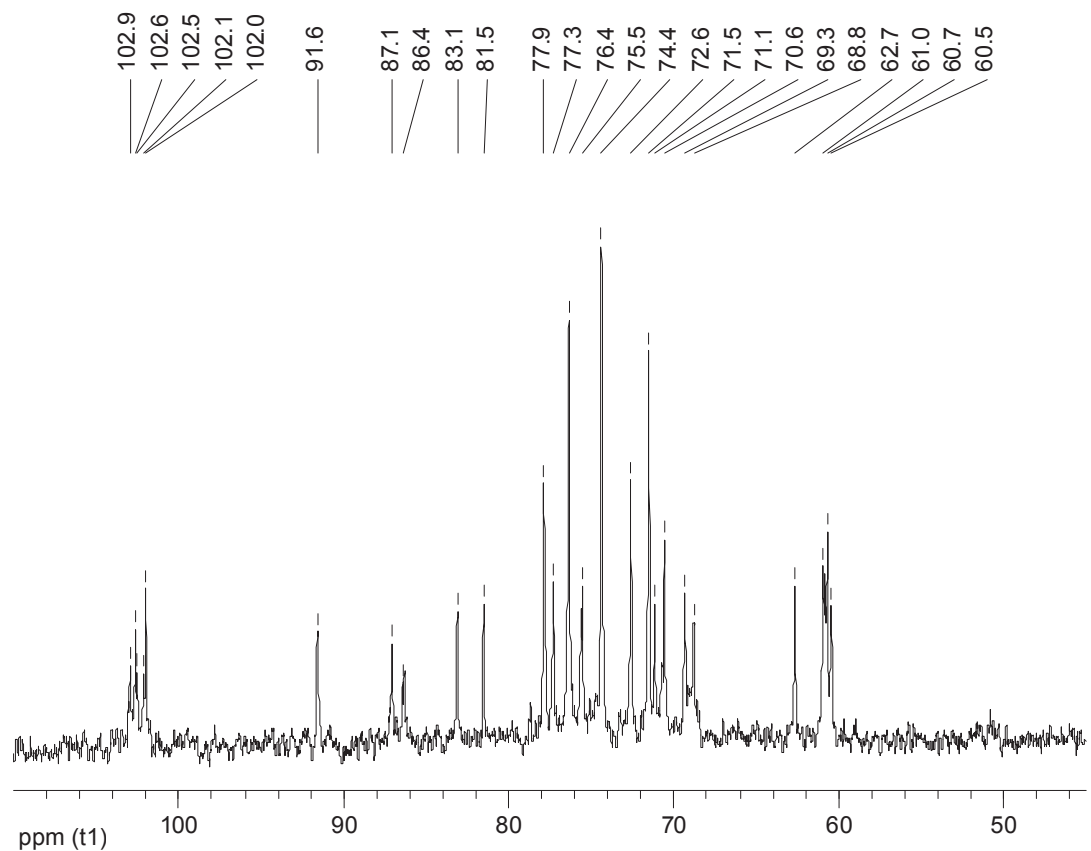
A presença do dissacarídeo alditol disulfatado era esperada uma vez que a principal carragenana sintetizada por *E. denticulatum* é a *iota*. O carrabiitol 4<sup>2</sup>-sulfato pode ser produto da hidrólise de *kappa*-carragenana, também sintetizada por *E. denticulatum*. Entretanto, considerando que o extrato (EHW-I-TA) submetido a HRP não apresentava sinal correspondente a H-1 da unidade de 3,6-anidro- $\alpha$ -D-galactopiranosose (Figura 30, p. 63) e que a quantidade isolada deste oligossacarídeo é semelhante a do carrabiitol 2<sup>1</sup>,4<sup>2</sup>-disulfato, é muito provável que nas condições da hidrólise redutiva parcial ocorra hidrólise do grupo sulfato presente em C-2 das unidades de 3,6-anidro- $\alpha$ -D-galactopiranosose da *iota*-carragenana.

Embora a diferença entre os dois oligossacarídeos seja um grupo sulfato, a cromatografia de exclusão, tanto em Bio-Gel P-2 quanto P-6 DG, não foi capaz de separar estes dois dissacarídeos.

A subfração NEC-H<sub>2</sub>O-2B (37 mg) eluída próximo ao volume morto na cromatografia de exclusão em Bio-Gel P-2, mostra no seu espectro de RMN de <sup>13</sup>C (Figura 40), sinais característicos de oligossacarídeos com quatro ou mais unidades monossacarídicas. Observa-se o sinal de C-1 da unidade de 3,6-anidro-D-galactopiranosose 2-sulfato em 91,6 ppm. Novamente a presença de oligossacarídeos com extremidade reduzida contendo 3,6-anidro-D-galactitol sulfatado e não sulfatado em C-2, é observada pelos sinais entre 81 e 87 ppm. Devido a dificuldade de separar

oligossacarídeos com diferença de um grupo sulfato através de cromatografia de exclusão, esta fração não foi submetida a mais processos de purificação.

**FIGURA 40 - ESPECTRO DE RMN DE  $^{13}\text{C}$  DE NEC-H<sub>2</sub>O-2B.**



Experimento realizado a 30°C.

#### 4.10 ANÁLISE DA FRAÇÃO NEC-005-1

A fração NEC-005-1 foi eluída com solução de carbonato de amônio 0,05M (Figura 33, p. 68). O alto rendimento que esta fração apresentou (767 mg), sugeriu a presença de TFA como um dos possíveis constituintes. Análise por RMN de  $^{13}\text{C}$  desta fração confirmou a presença de TFA e indicou a presença de oligossacarídeos em menor quantidade (espectro não mostrado).

NEC-005-1 foi submetida à diálise fechada utilizando membrana capaz de reter moléculas com massa molecular maior ou igual a 2000 Da. O material retido pesava apenas 40 mg o que confirma que a maior parte da fração era TFA. O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  desta fração após diálise (espectro não mostrado), mostra-se semelhante ao espectro da fração NEC-H<sub>2</sub>O-2A após diálise (Figura 39, p. 74). A única diferença entre as duas frações é a maior intensidade dos sinais correspondentes ao carrabiitol 4<sup>2</sup>-sulfato, indicando uma percentagem relativa maior deste oligossacarídeo alditol na fração NEC-005-1.

#### 4.11 ANÁLISE DA FRAÇÃO NEC-010-1

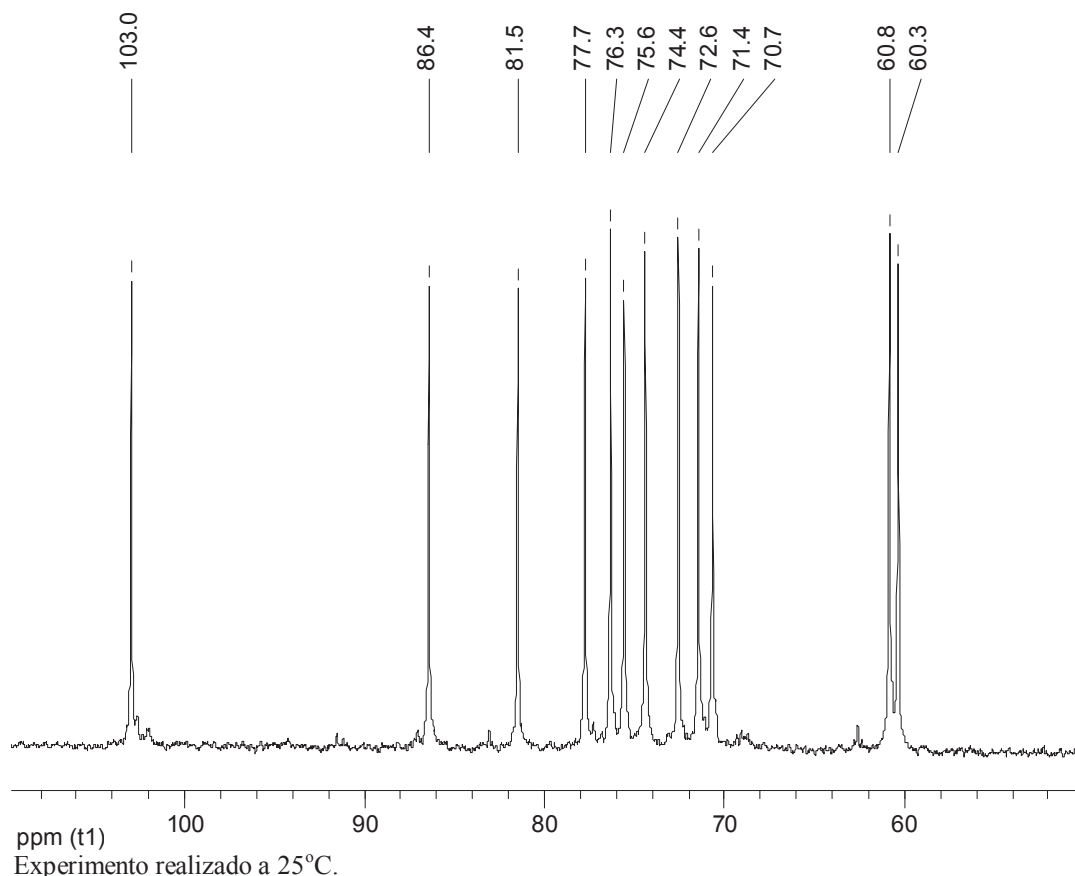
A eluição da coluna de troca aniônica com solução 0,10M de carbonato de amônio resultou num pico simétrico que deu origem a fração denominada NEC-010-1 (50 mg) (Figura 33, p. 68).

A análise do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 41) mostra a presença de doze sinais bem definidos com apenas um deles na região anomérica, característico de dissacarídeo alditol. Os sinais em 86,4 e 81,5 ppm indicam a presença do de 3,6-anidro-D-galactitol 2-sulfato, pois correspondem respectivamente a C-4 e C-3 desta unidade. Os sinais indicam que a fração NEC-010-1 corresponde a um dos dissacarídeos alditóis presente na mistura que compõe a fração NEC-005-1.

O conhecimento prévio da estrutura do polissacarídeo hidrolisado e a presença dos sinais característicos da unidade reduzida sulfatada indicaram a presença do carrabiitol 2<sup>1</sup>,4<sup>2</sup>-disulfato na fração NEC-010-1.

Foram realizados vários experimentos de RMN, mono e bidimensionais, visando determinar os deslocamentos químicos ( $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$ ) deste dissacarídeo alditol.

**FIGURA 41 - ESPECTRO DE RMN DE  $^{13}\text{C}$  DE NEC-010-1.**

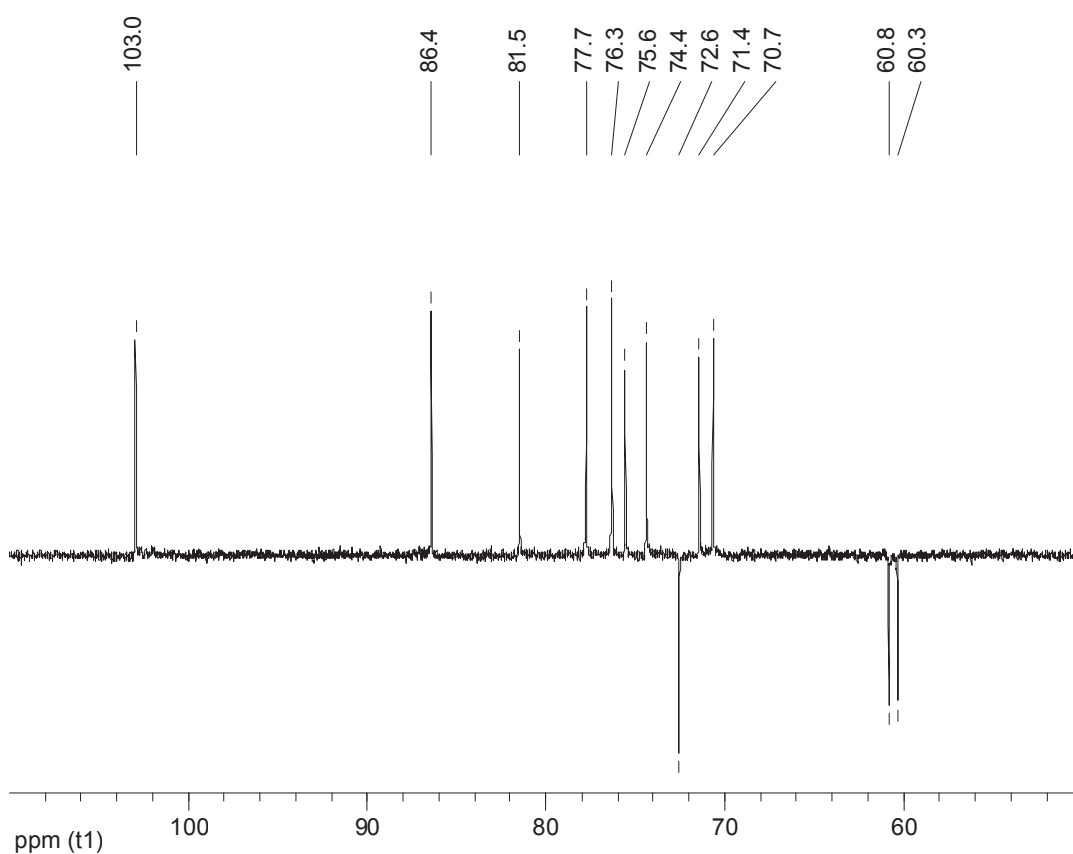


A nomenclatura usada para designar as unidades no oligossacarídeo será baseada na proposta por KNUTSEN et al. (1994). Esta nomenclatura é semelhante a utilizada para polissacarídeos (Tabela 1, p. 03), sendo as principais diferenças o uso do sufixo *nr* e *r* para designar a unidade da extremidade não redutora e redutora, respectivamente. Para oligossacarídeos maiores, as unidades ligadas a estas extremidades são designadas pelos sufixos *nr'* e *r'* respectivamente.

Através do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de NEC-010-1 foi possível determinar o deslocamento químico de  $G_{nr-1}$ , único sinal na região anomérica, e de  $DA_r-4$  e  $DA_r-3$  por comparação com outros dissacarídeos alditóis (GONÇALVES et al., 2002).

O primeiro experimento realizado foi o RMN de  $^{13}\text{C}$  DEPT. Neste experimento os carbonos metilênicos ( $\text{CH}_2$ ) aparecem como picos negativos enquanto que os demais carbonos, excetos quaternários, aparecem como picos positivos em relação a linha de base. O espectro (Figura 42) mostra a presença de três picos negativos, sendo o que aparece em campo mais baixo, a 72,6 ppm, correspondente a  $\text{DA}_r\text{-6}$ . Os sinais em torno de 60 ppm pertencem aos carbonos  $\text{DA}_r\text{-1}$  e  $\text{G}_{\text{nr}}\text{-6}$ , sendo difícil afirmar com certeza qual deslocamento pertence a determinado carbono.

**FIGURA 42 - ESPECTRO DE RMN DE  $^{13}\text{C}$  DEPT DE NEC-010-1.**



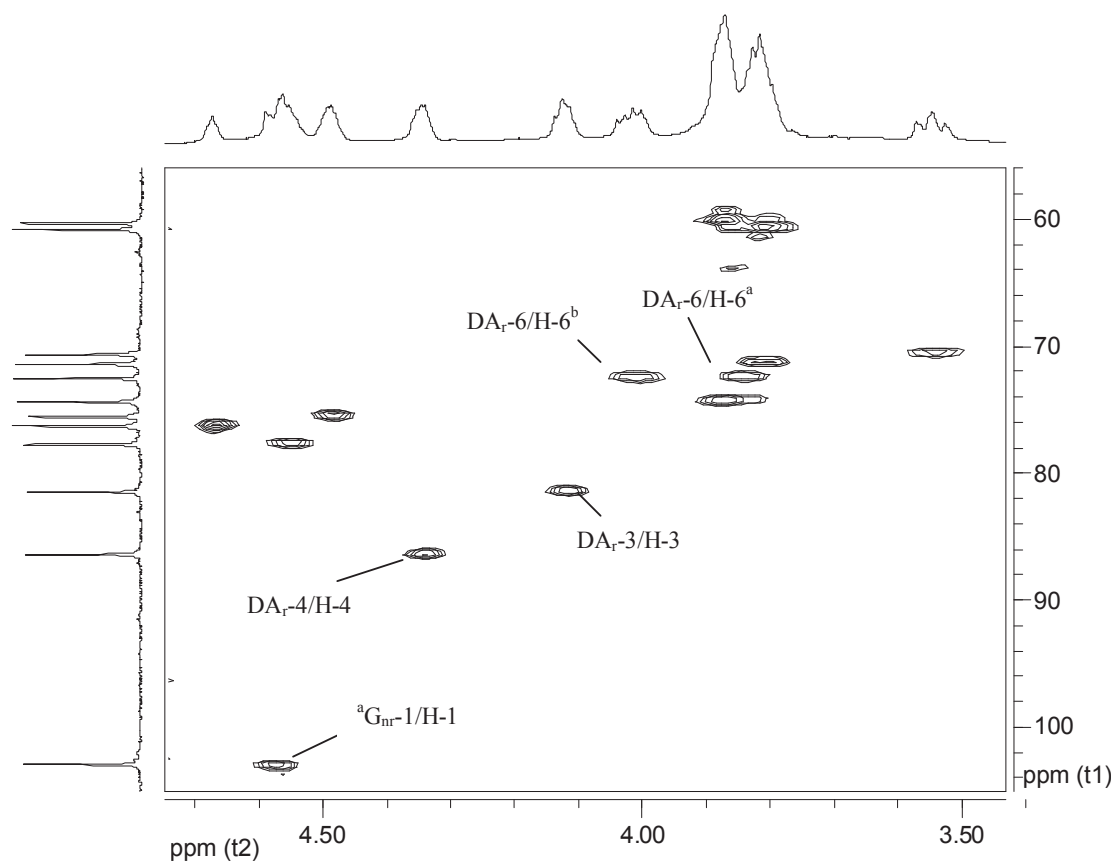
Experimento realizado a 25°C.

O segundo experimento realizado foi o bidimensional HMQC ( $^1\text{H}\text{-}^{13}\text{C}$ ) (Figura 43). Neste experimento é possível observar a correlação entre um  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$  que dividem uma mesma ligação. Sabendo os deslocamentos químicos dos carbonos de



$G_{nr-1}$ ,  $DA_r-4$ ,  $DA_r-3$  e  $DA_r-6$  foi possível determinar os deslocamentos químicos dos prótons ligados a estes carbonos (Tabela 4, p. 83).

**FIGURA 43 - ESPECTRO DE RMN HMQC ( $^1H$ - $^{13}C$ ) DE NEC-010-1.**

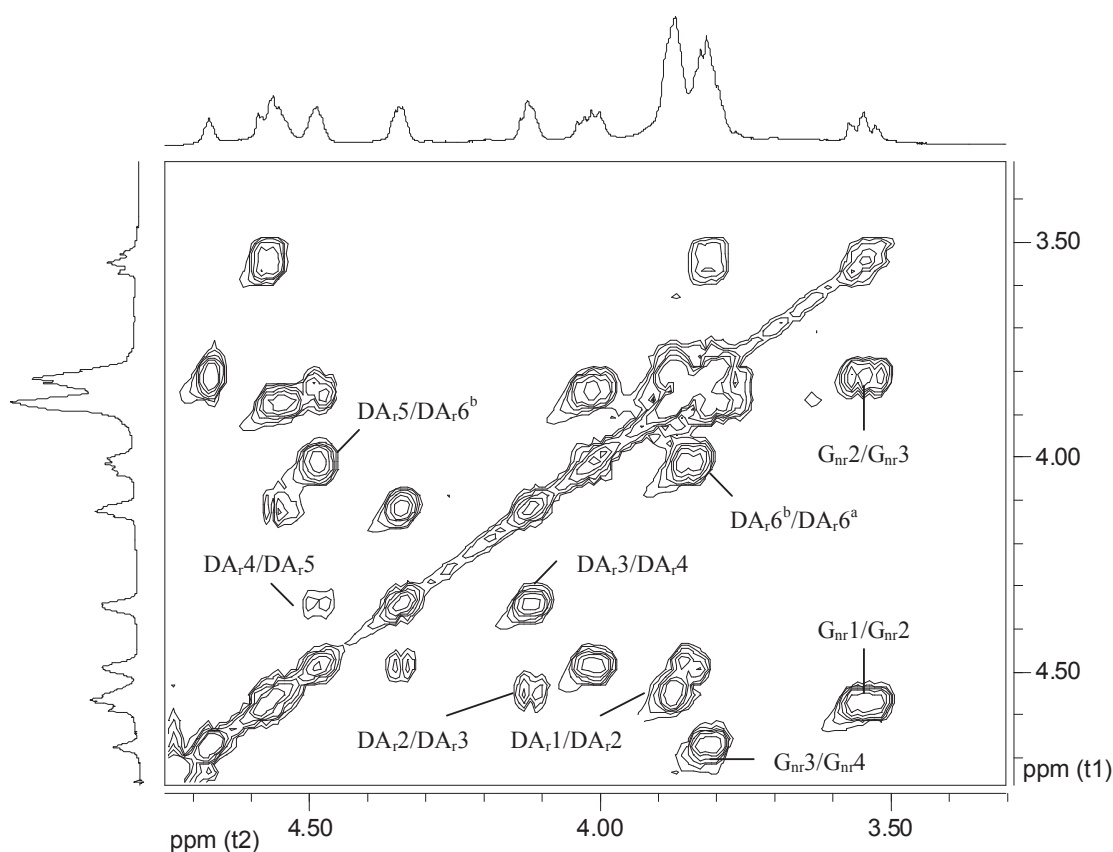


Experimento realizado a 25°C. <sup>a</sup> Nomenclatura análoga a usada por KNUTSEN et al. (1994):  $G_{nr}$  – carbonos da unidade de  $\beta$ -D-galactopirranose não redutora;  $DA_r$  – carbonos da unidade de 3,6-anidro-D-galactitol 2-sulfato.

O terceiro experimento foi o bidimensional COSY, que permite correlacionar os deslocamentos químicos dos núcleos de  $^1H$  vicinais que estão acoplados um com o outro. Assim em carboidratos, por exemplo, se o H-1 de uma unidade monossacarídica apresenta acoplamento com H-2 é possível observar esta interação na forma de um pico cruzado. O espectro de COSY de NEC-010-1 está mostrado na Figura 44. Conhecendo o deslocamento químico do próton de  $G_{nr-1}$ , 4,58 ppm determinado no

HMQC ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ), foi possível achar a correlação de  $G_{nr-1}/G_{nr-2}$  (4,58/3,54), em seguida de  $G_{nr-2}/G_{nr-3}$  (3,54/3,81) e  $G_{nr-3}/G_{nr-4}$  (3,81/4,66), sendo os respectivos carbonos assinalados depois no espectro de HMQC ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ). A constante de acoplamento dos prótons de  $G_{nr-4}$  e  $G_{nr-5}$  é muito baixa, devido às posições equatorial/axial que possuem, para apresentar uma correlação no espectro de COSY. O deslocamento químico do próton de  $G_{nr-4}$  (4,66 ppm), indica que este próton está muito desblindado, efeito direto do grupo sulfato ligado em  $G_{nr-4}$ .

**FIGURA 44 - ESPECTRO DE RMN COSY DE NEC-010-1.**



Experimento realizado a 25°C. <sup>a</sup> Nomenclatura análoga a usada por KNUTSEN et al. (1994):  $G_{nr}$  – prótons da unidade de  $\beta$ -D-galactopiranosose não redutora;  $DA_r$  – prótons da unidade de 3,6-anidro-D-galactitol 2-sulfato.

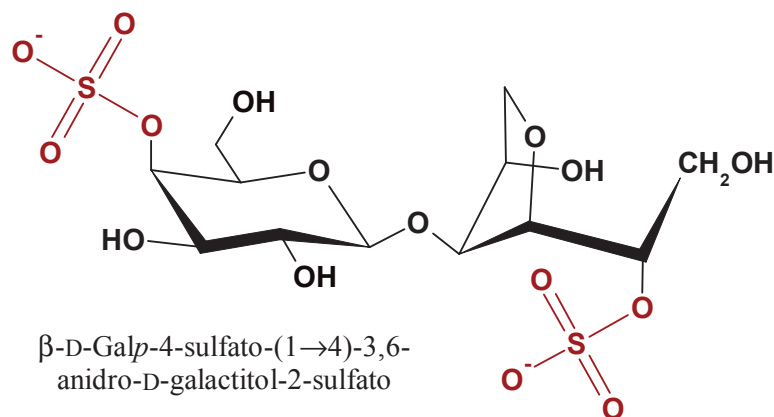
Ainda no espectro de COSY e sabendo os deslocamentos dos prótons de DA<sub>r</sub>-6, a partir do HMQC (<sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C), foi possível observar as correlações de DA<sub>r</sub>-6<sup>b</sup>/DA<sub>r</sub>-6<sup>a</sup> (4,01/3,84), DA<sub>r</sub>-6<sup>b</sup>/DA<sub>r</sub>-5 (4,01/4,48), DA<sub>r</sub>-5/DA<sub>r</sub>-4 (4,48/4,34), DA<sub>r</sub>-4/DA<sub>r</sub>-3 (4,34/4,12), DA<sub>r</sub>-3/DA<sub>r</sub>-2 (4,12/4,55) e DA<sub>r</sub>-2/DA<sub>r</sub>-1 (4,55/3,87), sendo os respectivos carbonos assinalados depois no espectro de HMQC (<sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C). O deslocamento químico do próton de DA<sub>r</sub>-2 em 4,55 ppm indica que ele é um dos mais desblindados da molécula, efeito direto do grupo sulfato ligado a este carbono.

Determinado o deslocamento químico do carbono de DA<sub>r</sub>-1, foi assinalado o deslocamento do carbono de G<sub>nr</sub>-6 no espectro de DEPT e o do próton no HMQC (<sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C). Restou apenas a correlação (74,4/3,87) no espectro de HMQC (<sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C) que por eliminação foi atribuída ao G<sub>nr</sub>-5.

O experimento de TOCSY que mostra as correlações não só dos prótons vicinais, mas sim de todos os núcleos do sistema de spin acoplado, foi realizado com a fração NEC-010-1. O espectro (não mostrado) ajudou a confirmar as correlações encontradas no espectro de COSY e os assinalamentos encontrados.

Estes resultados demonstram que a fração NEC-010-1 é constituída pelo dissacarídeo alditol carrabiitol 2<sup>1</sup>,4<sup>2</sup>-disulfato (Figura 45), isolado com um elevado grau de pureza. A Tabela 4 mostra o assinalamento completo do dissacarídeo alditol.

**FIGURA 45 - ESTRUTURA QUÍMICA DO DISSACARÍDEO CARRABIITOL 2<sup>1</sup>,4<sup>2</sup>-DISULFATO.**



**TABELA 4 - ASSINALAMENTO QUÍMICO DOS  $^{13}\text{C}$  E  $^1\text{H}$  DO CARRABITOL 2<sup>1</sup>,4<sup>2</sup>-DISULFATO.**

UNIDADE	ÁTOMOS <sup>a</sup>	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$
$\beta$ -D-Galp- 4-sulfato-(1→	G <sub>nr</sub> -1	103,0	4,58
	G <sub>nr</sub> -2	70,7	3,54
	G <sub>nr</sub> -3	71,4	3,81
	G <sub>nr</sub> -4	76,3	4,66
	G <sub>nr</sub> -5	74,4	3,87
	G <sub>nr</sub> -6	60,8	3,81
→4)-3,6-Anidro- D-galactitol- 2-sulfato	DA <sub>r</sub> -1	60,3	3,87 e 3,87
	DA <sub>r</sub> -2	77,7	4,55
	DA <sub>r</sub> -3	81,5	4,12
	DA <sub>r</sub> -4	86,4	4,34
	DA <sub>r</sub> -5	75,6	4,48
	DA <sub>r</sub> -6	72,6	3,84 e 4,01

<sup>a</sup> Nomenclatura análoga a usada por KNUTSEN et al. (1994): G<sub>nr</sub> – carbonos da unidade de  $\beta$ -D-galactopiranosose não redutora; DA<sub>r</sub> – carbonos da unidade de 3,6-anidro-D-galactitol 2-sulfato.

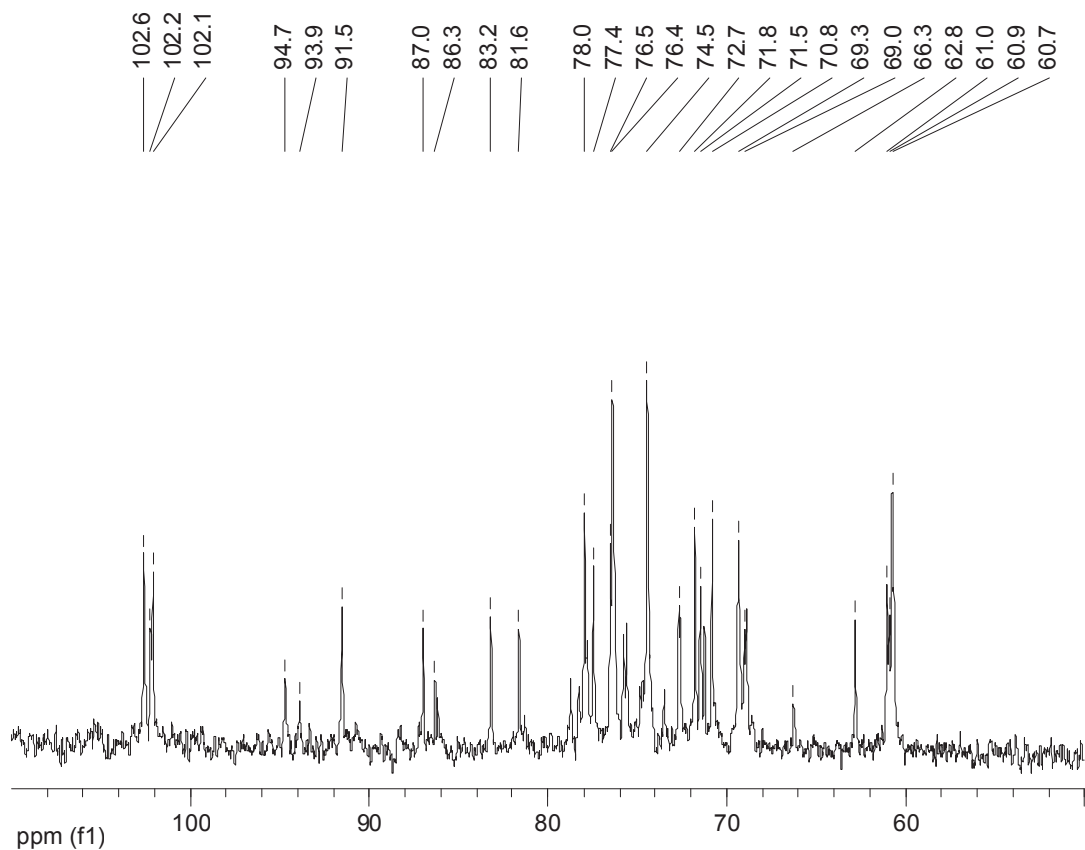
#### 4.12 ANÁLISE DAS FRAÇÕES NEC-015-1 E 2

A eluição da coluna de troca aniônica com solução 0,15 M de carbonato de amônio resultou na formação de um pico alargado. Este pico foi dividido em duas frações, a primeira parte dando origem à fração NEC-015-1 e a segunda a fração NEC-015-2 (Figura 33, p. 68).

A fração NEC-015-1 (26,4 mg) foi analisada por RMN de  $^{13}\text{C}$  conforme mostra a Figura 46. Na região anomérica observa-se o sinal em 91,5 ppm, correspondente a C-1 da 3,6-anidro- $\alpha$ -D-galactopiranosose 2-sulfato, e os sinais em 102,6 e 102,1 de C-1 da  $\beta$ -D-galactopiranosose 4-sulfato. Estes sinais aparecem na mesma intensidade, sugerindo a presença principalmente de tetrassacarídeos alditóis. A unidade de 3,6-anidro-D-galactitol nestes tetrassacarídeos pode estar sulfatada ou não em C-2, conforme indicam os sinais em 86,3/81,6 ppm e 87,0/83,2 ppm correspondentes a C4 e C-3 da unidade sulfatada e não sulfatada respectivamente.

O sinal em 94,7 ppm indica a presença de unidades de 3,6-anidro- $\alpha$ -D-galactopiranosose (VAN de VELDE et al., 2002), presentes em estruturas tetrassacarídicas ou maiores. A presença desta unidade, assim como de 3,6-anidro-D-galactitol, sugere a perda de grupo sulfato no processo hidrolítico, como observado na fração NEC-H<sub>2</sub>O-2A e NEC-005-1. Mesmo assim, pela análise de RMN de  $^{13}\text{C}$ , oligossacarídeos contendo unidades de 3,6-anidro- $\alpha$ -D-galactopiranosose seriam minoria dentro da mistura que compõe a fração NEC-015-1. Devido ao baixo rendimento e a complexidade da mistura, esta fração não foi submetida a mais processos de purificação.

**FIGURA 46 - ESPECTRO DE RMN DE  $^{13}\text{C}$  DE NEC-015-1.**

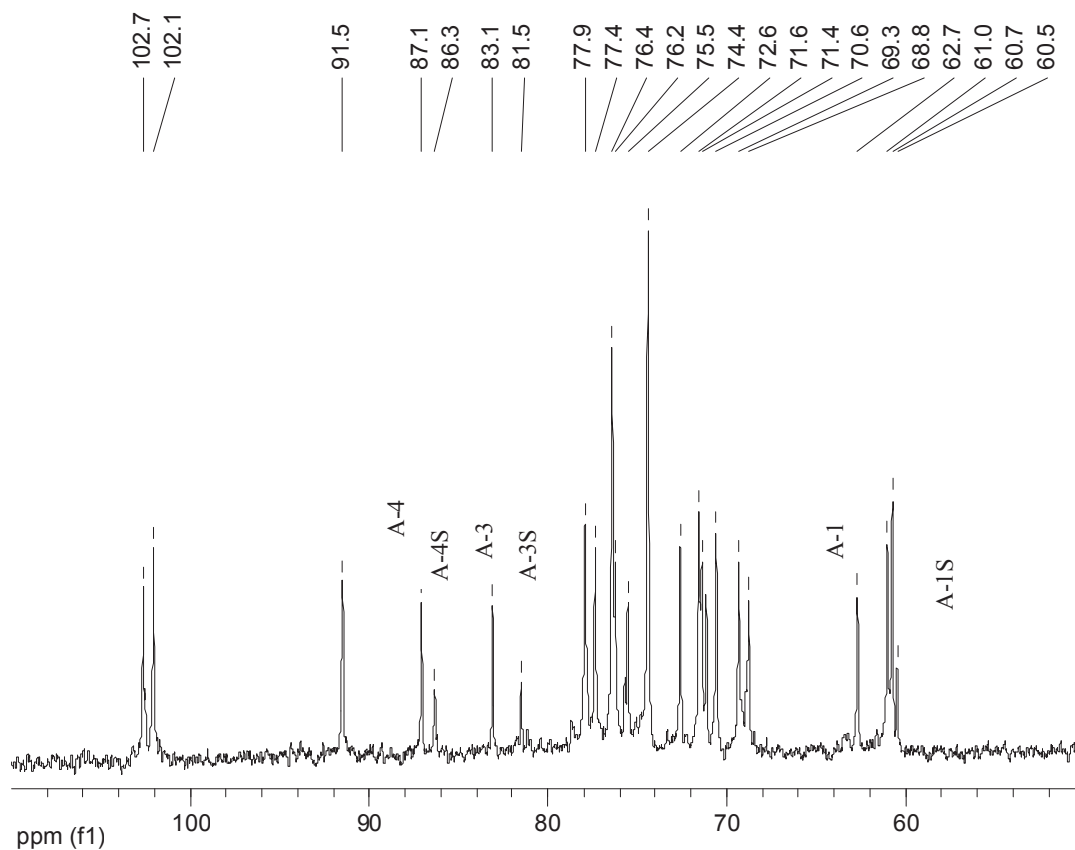


Experimento realizado a 30°C.

A fração NEC-015-2 apresentou praticamente os mesmos sinais no espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  que o da fração NEC-015-1, com exceção dos sinais em 94,7 e 93,9 ppm. O espectro (Figura 47) mostra três sinais de mesma intensidade na região anomérica em 91,5, 102,1 e 102,7 ppm, característicos de tetrassacarídeos alditóis. A presença de unidades de 3,6-anidro-D-galactitol sulfatada e não sulfatada em C-2 é observada pelos sinais de C-1 destas unidades em 60,5 e 62,7 ppm, respectivamente.

Pode-se concluir que a fração NEC-015-2 é uma mistura dos tetrassacarídeos carratetraitol 2<sup>1</sup>,4<sup>2</sup>,2<sup>3</sup>,4<sup>4</sup>-tetrasulfato e carratetraitol 4<sup>2</sup>,2<sup>3</sup>,4<sup>4</sup>-trisulfato. Integrando-se os sinais em 60,5 e 62,7 ppm, obteve-se a relação de 1:2 indicando que o tetrassacarídeo trisulfatado está presente em maior quantidade na fração.

**FIGURA 47 - ESPECTRO DE RMN DE  $^{13}\text{C}$  DE NEC-015-2.**



Experimento realizado a 30°C.

A-4, A-3, A-1: carbonos 4, 3 e 1 da unidade 3,6-anidro-D-galactitol respectivamente.

A-4S, A-3S, A-1S: carbonos 4, 3 e 1 da unidade 3,6-anidro-D-galactitol 2-sulfato respectivamente.

#### 4.13 ANÁLISE DA FRAÇÃO NEC-020-1

Durante toda a eluição da coluna de troca aniônica com solução 0,20 M de carbonato de amônio foi detectada a presença de carboidratos numa concentração constante sem, entretanto, ter ocorrido a formação de um pico simétrico (Figura 33, p. 68). O eluato foi agrupado dando origem a fração NEC-020-1 (80 mg).

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  indica que a fração NEC-020-1 (espectro não mostrado) é uma mistura oligossacarídica semelhante à encontrada na fração NEC-015-1. Os principais oligossacarídeos presentes são o carratetraitol 4<sup>2</sup>,2<sup>3</sup>,4<sup>4</sup>-trisulfato e carratetraitol 2<sup>1</sup>,4<sup>2</sup>,2<sup>3</sup>,4<sup>4</sup>-tetrasulfato. Integrando-se os sinais correspondentes a C-1 da

unidade de 3,6-anidro-D-galactitol não sulfatada e sulfatada obtém-se a relação de 1:5 respectivamente. Isto indica uma maior quantidade do tetrassacarídeo tetrasulfatado na fração.

#### 4.14 FRAÇÃO NEC-025-1

A fração NEC-025-1 (13 mg) é o resultado do agrupamento do pico eluído da coluna de troca aniônica com solução de carbonato de amônio 0,25 M.

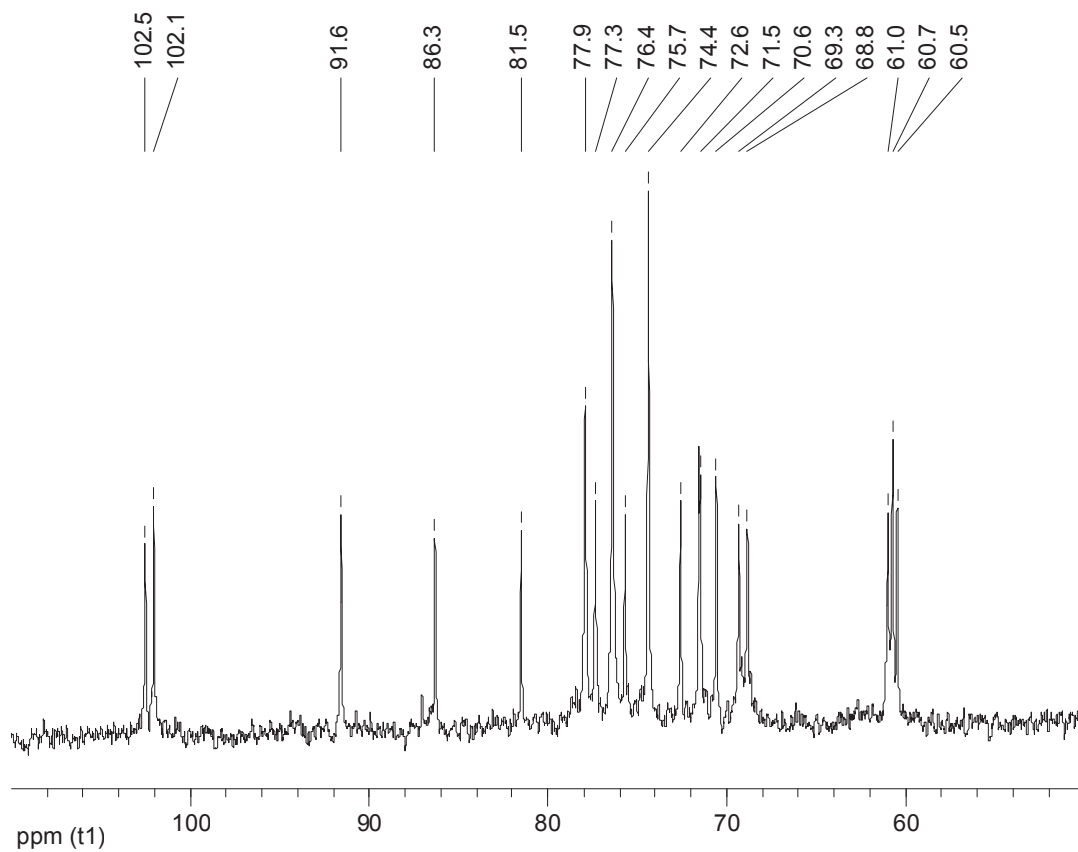
O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  desta fração (Figura 48) mostra a presença de três sinais de mesma intensidade na região anomérica, característico de tetrassacarídeo alditol. São observados, entretanto, 18 sinais bem definidos sugerindo a sobreposição de seis sinais no espectro. Os sinais de C-3 e C-4 do 3,6-anidro-D-galactitol 2-sulfato em 81,5 e 86,3 ppm respectivamente, e de 91,6 ppm correspondente a C-1 da unidade de 3,6-anidro- $\alpha$ -D-galactopiranosose 2-sulfato indicam que o tetrassacarídeo presente nesta fração é o carratetraitol 2<sup>1</sup>,4<sup>2</sup>,2<sup>3</sup>,4<sup>4</sup>-tetrasulfato (Figura 49).

Na tentativa de assinalar os deslocamentos químicos de prótons e carbonos desta molécula foram realizados vários experimentos de RMN mono e bidimensionais. No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  DEPT observou-se a inversão de cinco sinais em 60,5, 60,7, 61,0 69,3 e 72,6 ppm (não mostrado). Por comparação com o dissacarídeo da fração NEC-010-1 (Tabela 4, p. 83) os sinais em 72,6 e 60,5 ppm foram assinalados como pertencentes a DA<sub>r</sub>-6 e DA<sub>r</sub>-1, respectivamente. O sinal em 69,3 ppm é próximo ao assinalado para C-6 das unidades de 3,6-anidro- $\alpha$ -D-galactopiranosose 2-sulfato na *iota*-carragenana (VAN de VELDE et al., 2002), sendo atribuído como pertencente a DA<sub>nr</sub>-6 no tetrassacarídeo. Os sinais em 60,7 e 61,0 ppm pertencem a G<sub>nr</sub>-6 e G<sub>r</sub>-6, sendo difícil afirmar qual deslocamento químico corresponde a cada carbono.

Sabendo ainda os deslocamentos dos carbonos de DA<sub>nr</sub>-1 (91,6), DA<sub>r</sub>-3 (81,5), DA<sub>r</sub>-4 (86,3), DA<sub>r</sub>-6 (72,6) e DA<sub>nr</sub>-6 (69,3), estes últimos assinalados pelo experimento de DEPT, foi possível assinalar os deslocamentos dos prótons ligados a estes carbonos através das correlações no espectro de HMQC ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ) (Figura 50, p. 90).

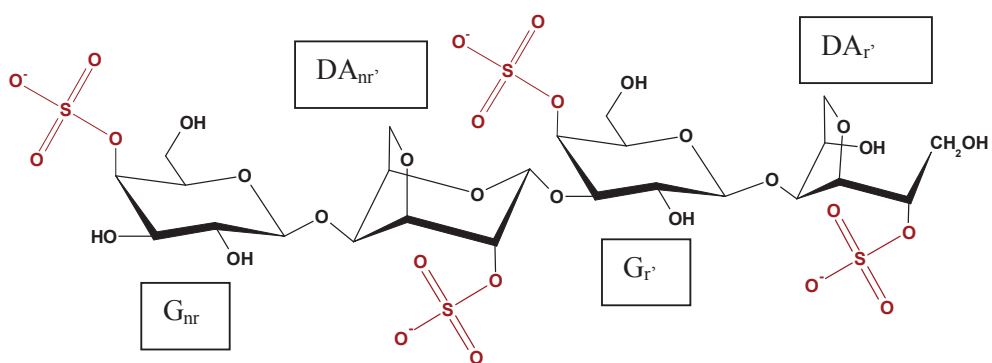


FIGURA 48 - ESPECTRO DE RMN DE  $^{13}\text{C}$  DE NEC-025-1.



Experimento realizado a 30°C.

FIGURA 49 - ESTRUTURA QUÍMICA DO DISSACARÍDEO CARRATETRAITOL 2<sup>1</sup>,4<sup>2</sup>,2<sup>3</sup>,4<sup>4</sup>-DISULFATO.

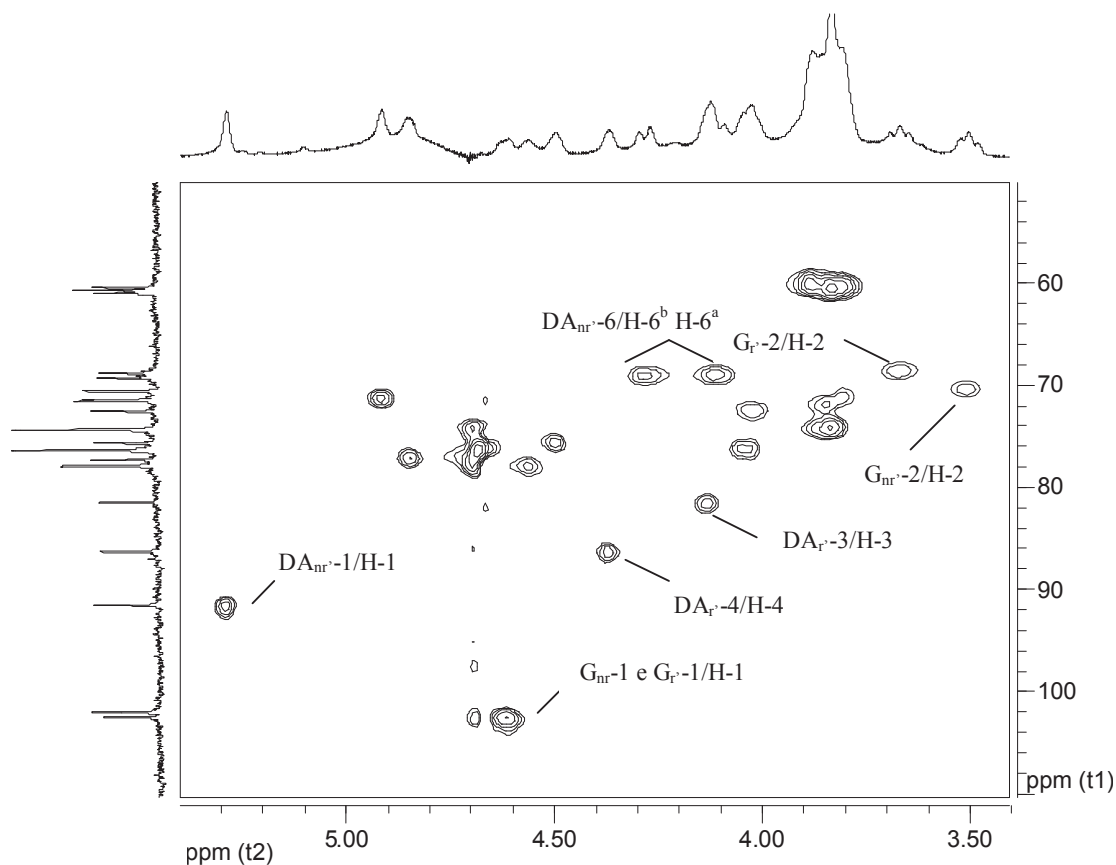


É interessante observar que os prótons de DA<sub>nr</sub>-6 possuem deslocamento químico diferente. YU et al. (2002) comenta que H-6<sup>a</sup> (4,11 ppm) possui deslocamento em campo mais alto em relação a H-6<sup>b</sup> (4,28 ppm), provavelmente devido ao efeito anisotrópico do oxigênio do anel piranosídico (Figura 51).

Os carbonos de G<sub>nr</sub>-1 e G<sub>r</sub>-1 apresentaram uma única correlação no espectro de HMQC (<sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C), indicando que os prótons ligados a estes carbonos possuem um deslocamento químico semelhante, de aproximadamente 4,62 ppm. Sabendo disso, no espectro de COSY (Figura 52, p. 91), as duas correlações observadas em 4,62/3,50 e 4,63/3,67 foram atribuídas a H-1/H-2 das unidades de β-D-galactopiranosose 4-sulfato, sendo assinalado os respectivos C-2 no espectro de HMQC (<sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C). Os deslocamentos químicos do carbono e próton de G<sub>nr</sub>-2 do carrabiitol 2<sup>1</sup>,4<sup>2</sup>-disulfato (Tabela 4, p. 83) são praticamente os mesmos encontrados na correlação 70,4/3,50 no espectro de HMQC (<sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C). Dessa forma, a correlação 4,62/3,50 foi assinalada como pertencente aos prótons de G<sub>nr</sub>-1/G<sub>nr</sub>-2 e 4,63/3,67 a G<sub>r</sub>-1/G<sub>r</sub>-2 do tetrassacarídeo alditol. Ainda no espectro de COSY foram observadas as correlações G<sub>nr</sub>-2/G<sub>nr</sub>-3 (3,50/3,81), G<sub>nr</sub>-3/G<sub>nr</sub>-4 (3,81/4,68), G<sub>r</sub>-2/G<sub>r</sub>-3 (3,67/4,05) e G<sub>r</sub>-3/G<sub>r</sub>-4 (4,05/4,91), sendo os respectivos carbonos assinalados em seguida no espectro de HMQC (<sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C) (Tabela 5, p. 93). Não foram observadas as correlações H-4/H-5 das unidades de β-D-galactopiranosose 4-sulfato, devido à baixa constante de acoplamento destes prótons.

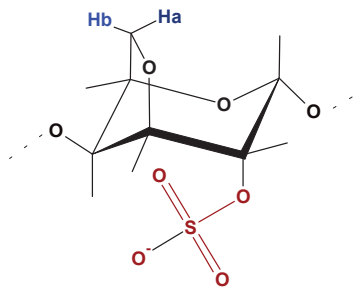
Os deslocamentos químicos da unidade de β-D-galactopiranosose não reduzida (G<sub>nr</sub>) foram semelhantes aos encontrados para o dissacarídeo carrabiitol 2<sup>1</sup>,4<sup>2</sup>-disulfato, enquanto que os deslocamentos da β-D-galactopiranosose 4-sulfato interna (G<sub>r</sub>) foram semelhantes aos descritos para a mesma unidade na *iota*-carragenana (VAN de VELDE et al., 2002). Devido a estas semelhanças de deslocamentos químicos, o carbono de G<sub>nr</sub>-1 foi assinalado em 102,5 ppm, enquanto G<sub>r</sub>-1 em 102,1 ppm. Os assinalamentos de G<sub>nr</sub>-6 e G<sub>r</sub>-6 foram feitos utilizando este mesmo critério. Pelo espectro de RMN de <sup>13</sup>C DEPT foram assinalados G<sub>nr</sub>-6 em 60,7 ppm e G<sub>r</sub>-6 em 61,0 ppm. No espectro de HMQC (<sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C) devido à sobreposição das correlações os prótons destes carbonos apresentaram o mesmo deslocamento de 3,83 ppm.

FIGURA 50 - ESPECTRO DE RMN DE HMQC ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ) DE NEC-025-1.

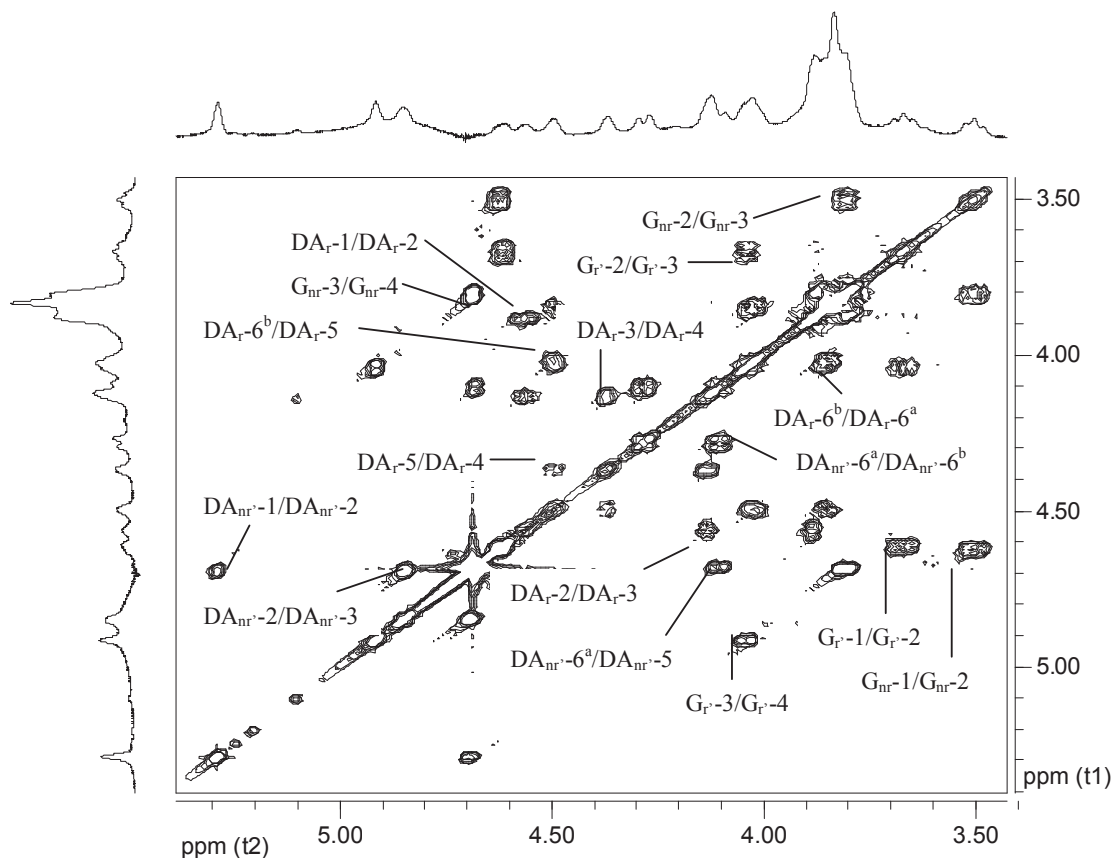


Experimento realizado a 30°C. <sup>a</sup> Nomenclatura análoga a usada por KNUTSEN et al. (1994): G<sub>nr</sub> – carbonos da unidade de β-D-galactopiranoose não redutora; DA<sub>nr</sub>' – carbonos da unidade de 3,6-anidro-α-D-galactopiranoose 2-sulfato; G<sub>r</sub>' – carbonos da unidade de β-D-galactopiranoose ligada a unidade reduzida; DA<sub>r</sub>' – carbonos da unidade de 3,6-anidro-D-galactitol 2-sulfato.

FIGURA 51 - ESTRUTURA MOSTRANDO A UNIDADE DE 3,6-ANIDRO-α-D-GALACTOPIRANOSE 2-SULFATO PRESENTE NAS CARRAGENANAS.



**FIGURA 52 - ESPECTRO DE RMN DE COSY DE NEC-025-1.**



Experimento realizado a 30°C. <sup>a</sup> Nomenclatura análoga a usada por KNUTSEN et al. (1994): G<sub>nr</sub> – prótons da unidade de β-D-galactopiranosose não redutora; DA<sub>nr</sub> – prótons da unidade de 3,6-anidro-α-D-galactopiranosose 2-sulfato; G<sub>r</sub> – prótons da unidade de β-D-galactopiranosose ligada a unidade reduzida; DA<sub>r</sub> – prótons da unidade de 3,6-anidro-D-galactitol 2-sulfato.

No espectro de COSY sabendo os deslocamentos dos prótons de DA<sub>r</sub>-6, em 3,86 e 4,02 ppm, foi possível observar a correlação DA<sub>r</sub>-6<sup>b</sup>/DA<sub>r</sub>-5 (4,01/4,50), em seguida DA<sub>r</sub>-5/DA<sub>r</sub>-4 (4,50/4,37), DA<sub>r</sub>-4/DA<sub>r</sub>-3 (4,37/4,13), DA<sub>r</sub>-3/DA<sub>r</sub>-2 (4,13/4,56) e DA<sub>r</sub>-2/DA<sub>r</sub>-1 (4,56/3,88), sendo os respectivos carbonos assinalados no espectro de HMQC (<sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C). Dessa forma, todos os carbonos e prótons da unidade de 3,6-anidro-D-galactitol 2-sulfato do tetrassacarídeo foram assinalados, tendo os deslocamentos químicos se mostrado semelhantes aos observados na mesma unidade do dissacarídeo carrabitol 2<sup>1</sup>,4<sup>2</sup>-disulfato. É interessante observar que com a abertura do anel

piranosídico, as conectividades entre todos os prótons da unidade reduzida podem ser observadas no espectro de COSY, ao contrário da unidade de 3,6-anidro- $\alpha$ -D-galactopiranosose 2-sulfato.

Da unidade interna de 3,6-anidro- $\alpha$ -D-galactopiranosose 2-sulfato sabia-se o deslocamento dos prótons de DA<sub>nr</sub>'-1 (5,29 ppm) e DA<sub>nr</sub>'-6 (4,11 e 4,28 ppm). No espectro de COSY foi possível observar a correlação DA<sub>nr</sub>'-1/DA<sub>nr</sub>'-2 (5,29/4,69) e DA<sub>nr</sub>'-2/DA<sub>nr</sub>'-3 (4,69/4,85), sendo assinalado os respectivos carbonos pelo espectro de HMQC ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ). A correlação entre os prótons DA<sub>nr</sub>'-3/DA<sub>nr</sub>'-4 não foi observada devido a baixa constante de acoplamento destes prótons (YU et al., 2002). Somente um dos prótons de DA<sub>nr</sub>'-6, o que fica quase perpendicular ao plano do anel piranosídico (DA<sub>nr</sub>'-6<sup>a</sup>), mostra correlação com o próton DA<sub>nr</sub>'-5 no espectro de COSY (KNUTSEN e GRASDALEN, 1992) (Figura 51, p. 90). Através desta correlação foi encontrado o deslocamento do próton de DA<sub>nr</sub>'-5 e em seguida do carbono no espectro de HMQC ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ). A correlação entre o próton de DA<sub>nr</sub>'-5 e DA<sub>nr</sub>'-4 não foi observada.

Os únicos assinalamentos que faltavam assinalar eram de DA<sub>nr</sub>'-4, G<sub>nr</sub>'-5 e G<sub>r</sub>'-5. No espectro de HMQC ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ) duas correlações não haviam sido ainda identificadas em 78,0/4,69 e 74,4/3,84 ppm. Por comparação ao assinalamento da *iota*-carragenana (VAN de VELDE et al., 2002) a correlação 78,0/4,69 foi atribuída a DA<sub>nr</sub>'-4. A correlação 74,4/3,84 foi interpretada como uma sobreposição, e atribuída a G<sub>nr</sub>'-5 e G<sub>r</sub>'-5.

Os experimentos de RMN permitiram assinalar os prótons e carbonos, além de confirmar a estrutura do tetrassacarídeo carratetraitol 2<sup>1</sup>,4<sup>2</sup>,2<sup>3</sup>,4<sup>4</sup>-tetrasulfato (Figura 49, p. 88) na fração NEC-025-1. Na Tabela 5 são apresentados os assinalamentos completos dos  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  de cada uma das unidades do tetrassacarídeo carratetraitol 2<sup>1</sup>,4<sup>2</sup>,2<sup>3</sup>,4<sup>4</sup>-tetrasulfato.

**TABELA 5 - ASSINALAMENTO QUÍMICO DOS  $^{13}\text{C}$  E  $^1\text{H}$  DO CARRATETRAITOL  $2^1,4^2,2^3,4^2$ -TETRASULFATO.**

UNIDADE	ÁTOMOS <sup>a</sup>	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$
	$\text{G}_{\text{nr}}-1$	102,5	4,62
$\beta$ -D-Galp-	$\text{G}_{\text{nr}}-2$	70,6	3,50
4-sulfato-(1→	$\text{G}_{\text{nr}}-3$	71,5	3,81
não redutora	$\text{G}_{\text{nr}}-4$	76,4	4,68
	$\text{G}_{\text{nr}}-5$	74,4	3,84
	$\text{G}_{\text{nr}}-6$	60,7	3,83
	$\text{DA}_{\text{nr}}-1$	91,6	5,29
→4)-3,6-Anidro	$\text{DA}_{\text{nr}}-2$	74,4	4,69
$\alpha$ -D-Galp-	$\text{DA}_{\text{nr}}-3$	77,3	4,85
2-sulfato-(1→	$\text{DA}_{\text{nr}}-4$	77,9	4,69
	$\text{DA}_{\text{nr}}-5$	76,4	4,68
	$\text{DA}_{\text{nr}}-6$	69,3	a=4,11 e b=4,28
	$\text{G}_{\text{r}}-1$	102,1	4,63
$\beta$ -D-Galp-	$\text{G}_{\text{r}}-2$	68,8	3,67
4-sulfato-(1→	$\text{G}_{\text{r}}-3$	76,4	4,05
interna	$\text{G}_{\text{r}}-4$	71,5	4,91
	$\text{G}_{\text{r}}-5$	74,4	3,84
	$\text{G}_{\text{r}}-6$	61,0	3,83
	$\text{DA}_{\text{r}}-1$	60,5	3,88
→4)-3,6-Anidro-	$\text{DA}_{\text{r}}-2$	77,9	4,56
D-galactitol-	$\text{DA}_{\text{r}}-3$	81,5	4,13
2-sulfato	$\text{DA}_{\text{r}}-4$	86,3	4,37
	$\text{DA}_{\text{r}}-5$	75,7	4,50
	$\text{DA}_{\text{r}}-6$	72,6	3,86 e 4,02

<sup>a</sup> Nomenclatura análoga a usada por KNUTSEN et al. (1994):  $\text{G}_{\text{nr}}$  – carbonos da unidade de  $\beta$ -D-galactopiranosose não redutora;  $\text{DA}_{\text{nr}}$  – carbonos da unidade de 3,6-anidro- $\alpha$ -D-galactopiranosose 2-sulfato;  $\text{G}_{\text{r}}$  – carbonos da unidade de  $\beta$ -D-galactopiranosose ligada a unidade reduzida;  $\text{DA}_{\text{r}}$  – carbonos da unidade de 3,6-anidro-D-galactitol 2-sulfato.

#### 4.15 ANÁLISE DA FRAÇÃO NEC-030-1

A monitoração do eluição da coluna de troca aniônica, pelo método do fenol ácido sulfúrico, com solução 0,30 M de carbonato de amônio não apresentou absorvâncias muito elevadas conforme mostra a Figura 33 (p. 68). Entretanto a facilidade de se eliminar o sal por evaporação a pressão reduzida permitiu agrupar os tubos correspondentes, formando à fração denominada NEC-030-1 (13 mg).

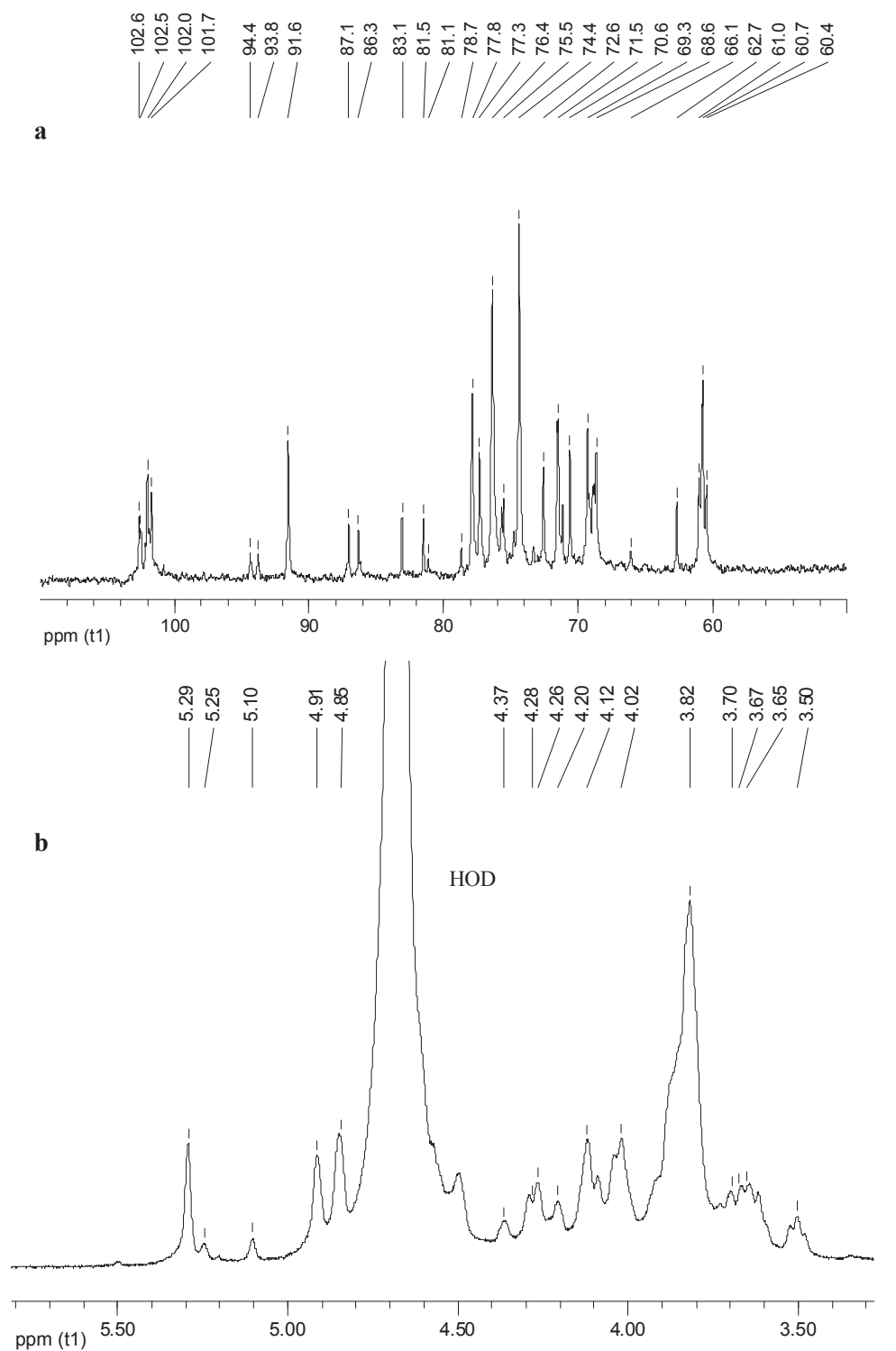
O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  foi semelhante ao da fração NEC-015-1 (Figura 46, p. 85), sugerindo uma mistura de oligossacarídeos, apresentando basicamente diferença no conteúdo de grupos sulfato e grau de polimerização. O baixo rendimento e a complexidade da mistura não permitiram uma purificação dos oligossacarídeos presentes na mistura.

#### 4.16 ANÁLISE DA FRAÇÃO NEC-040-1

A fração NEC-040-1 (30 mg) foi analisada por RMN de  $^{13}\text{C}$ , conforme mostra a Figura 53a. Na região anomérica (90 a 110 ppm) é possível observar o sinal de maior intensidade em 91,6 ppm correspondente a C-1 das unidades de 3,6-anidro- $\alpha$ -D-galactopiranosose 2-sulfato. A presença de três sinais, na região de carbono anomérico beta, em 102,6, 102,0, 101,7 ppm de mesma intensidade sugerem a presença de hexassacarídeos alditóis nesta fração. Em campo mais alto observa-se os sinais em 60,4 e 62,7 ppm correspondentes a C-1 da unidade de 3,6-anidro-D-galactitol sulfatada e não sulfatada em C-2, respectivamente. A presença destas unidades também pode ser observada pelos sinais em 87,1 e 83,1 ppm (C-4 e C-3 de 3,6-anidro-D-galactitol) e 86,3 e 81,5 ppm (C-4 e C-3 de 3,6-anidro-D-galactitol 2-sulfato). Estes sinais indicam a possibilidade de duas extremidades reduzidas diferentes nos hexassacarídeos presentes nesta fração.

Dois sinais de menor intensidade na região anomérica de carbono alfa, em 94,4 e 93,8 ppm, que já tinham sido observados nas frações NEC-015-1 e NEC-030-1, estão presentes também no espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de NEC-040-1.

**FIGURA 53 - ESPECTRO DE RMN DE  $^{13}\text{C}$  (a) E  $^1\text{H}$  (b) DE NEC-040-1.**



Experimentos realizados a 30°C.



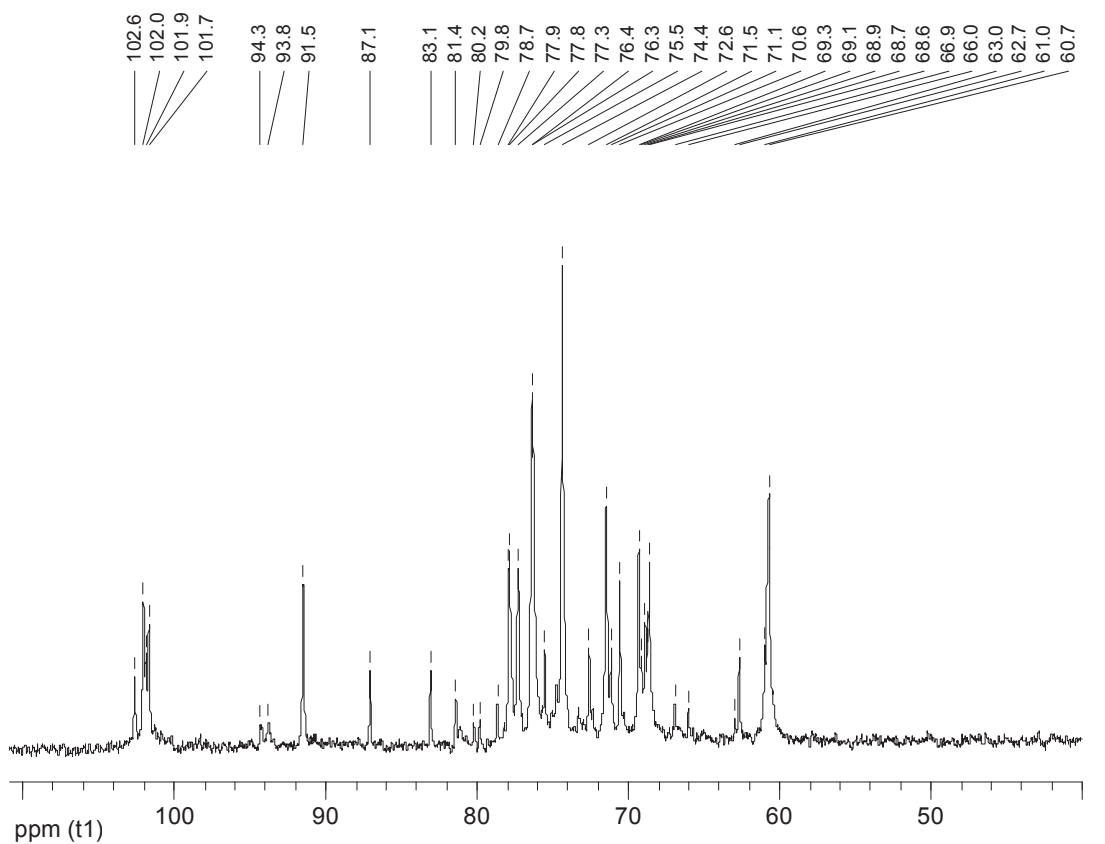
O sinal em 94,4 ppm deve corresponder a C-1 de unidade de 3,6-anidro- $\alpha$ -D-galactopiranosose (VAN de VELDE et al., 2002). O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de NEC-040-1 confirma a presença desta unidade pela observação do deslocamento químico de H-1 em 5,10 ppm (Figura 53b). Além do sinal em 5,29 ppm de H-1 das unidades de 3,6-anidro- $\alpha$ -D-galactopiranosose 2-sulfato, foi observado o sinal em 5,25 ppm. Segundo VAN de VELDE et al. (2002) este sinal poderia corresponder a H-1 das unidade de  $\alpha$ -D-galactopiranosose 6-sulfato. Entretanto, o sinal de C-1 esperado para esta unidade, em 98,2 ppm, não foi observado no espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ .

Uma forma de verificar se o sinal em 5,25 ppm pertenceria a H-1 da  $\alpha$ -D-galactopiranosose 6-sulfato seria submeter à fração NEC-040-1 ao tratamento alcalino e verificar se este sinal sumiria após o ensaio.

Após o tratamento alcalino, a fração agora denominada NEC-040-1-TA (23 mg) apresentou o espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (não mostrado) igual ao da fração nativa (NEC-040-1) na região de H-1 das unidades alfa. Isto é, os sinais em 5,29, 5,25 e 5,10 ppm ainda permaneciam. Entretanto, o espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  apresentou-se bastante diferente (Figura 54). A mudança mais evidente foi o desaparecimento dos sinais em 86,3 e 60,4 ppm correspondentes a C-4 e C-1 da unidade de 3,6-anidro-D-galactitol 2-sulfato. Estes resultados indicam que o grupo sulfato presente em C-2 destas unidades é sensível às condições alcalinas.

Estudos utilizando carboidratos sulfatados têm mostrado que a liberação de sulfato, em meio alcalino, não é um processo hidrolítico e sim resultado de uma eliminação catalisada por base produzindo um anel anidro. Um grupo sulfato ligado a carbono secundário é lábel, sob condições alcalinas, somente se existe uma hidroxila livre trans, adjacente (TURVEY, 1965). Estas condições podem ser observadas, por exemplo, no 1,2-*O*-isopropilideno-3-*O*-metil- $\alpha$ -D-glucofuranose 6-sulfato. DUFF e PERCIVAL (1947) após tratarem esta molécula com metóxido de sódio, a 40°C por 3 h, obtiveram seu derivado anidro (Figura 55a).

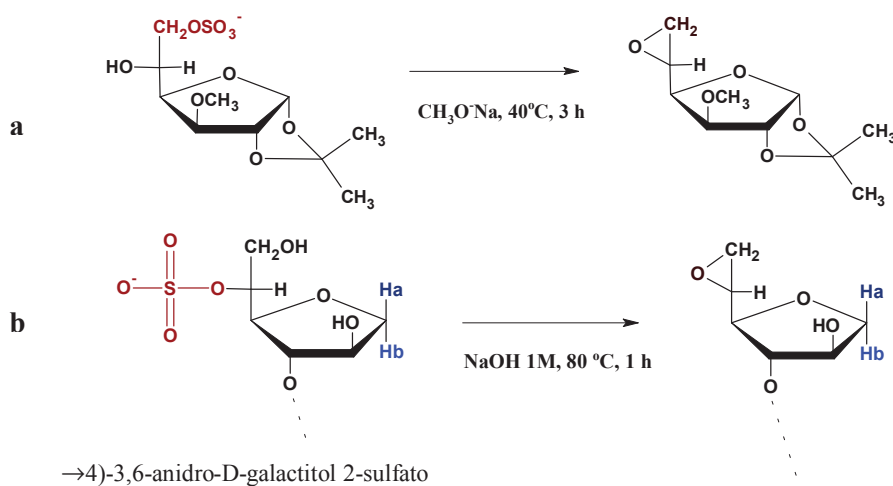
FIGURA 54 - ESPECTRO DE RMN DE  $^{13}\text{C}$  DE NEC-040-1-TA.



Experimento realizado a 55°C.

FIGURA 55 - DESULFATAÇÃO ALCALINA EM MONOSSACARÍDEO (a) E NA UNIDADE DE 3,6-ANIDRO-D-GALACTITOL 2-SULFATO (b).

1,2-*O*-isopropilideno-3-*O*-metil- $\alpha$ -D-glucofuranose 6-sulfato



A desulfatação das unidades de 3,6-anidro-D-galactitol 2-sulfato, presente nos oligossacarídeos de NEC-040-1, deve ter o mesmo mecanismo de outros carboidratos sulfatados e resultar na formação de um anel anidro. A ligação entre C-1 e C-2 pode sofrer rotação, possibilitando o arranjo estereoquímico necessário para que ocorra a reação. Sob condições alcalinas haveria formação do ânion alcóxido em C-1 e posterior ataque nucleofílico a C-2. A eliminação do grupo sulfato resultaria na formação de um epóxido (Figura 55b).

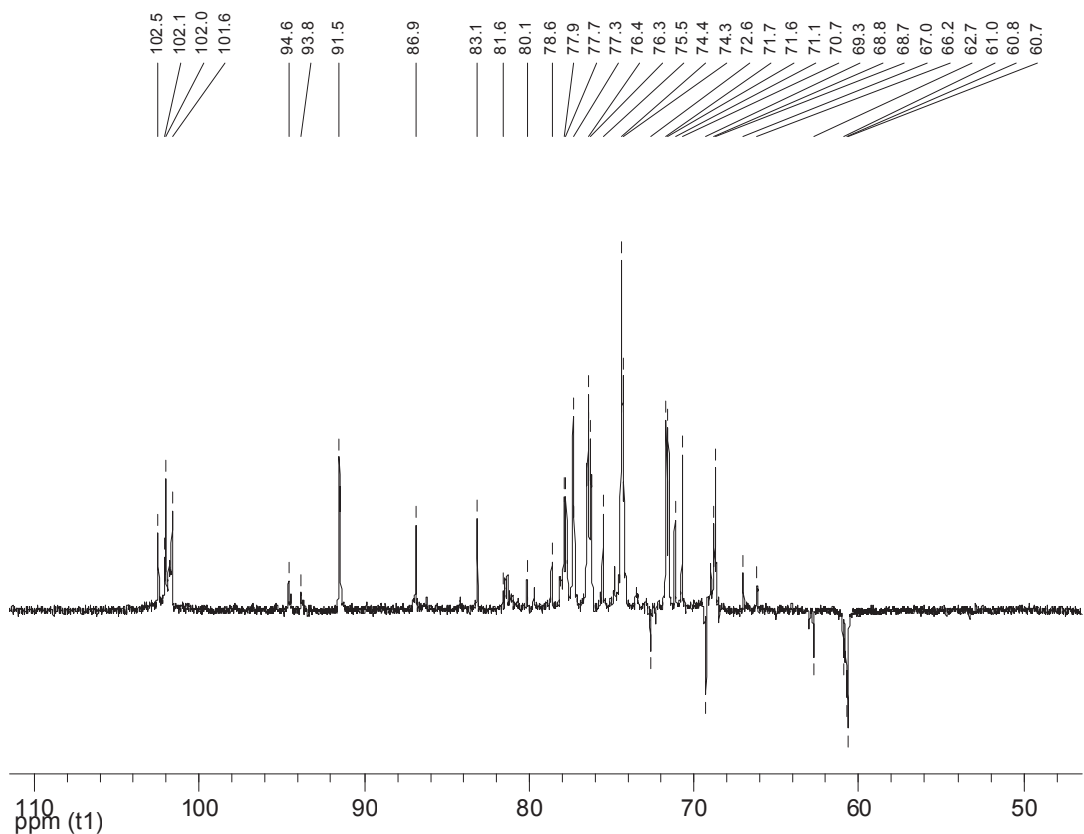
A intensidade dos sinais de C-1, C-3 e C-4 da unidade de 3,6-anidro-D-galactitol 2-sulfato no espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de NEC-040-1 (Figura 53<sup>a</sup>, p. 95), indica que haveria uma grande quantidade deste resíduo, semelhante a unidade de 3,6-anidro-D-galactitol pela comparação entre as intensidades dos sinais de cada unidade. Se o produto final da desulfatação for o derivado 1,2-anidro, seria esperado no RMN de  $^{13}\text{C}$  de NEC-040-1-TA sinais referentes a esta unidade. No C-1 participando da ligação epóxido haveria um deslocamento para campo mais baixo deste carbono. Entretanto, o espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  DEPT de NEC-040-1-TA (Figura 56) mostra apenas a inversão dos sinais esperados para oligossacarídeos alditóis: 62,9 e 72,8 ppm, correspondente a C-1 e C-6 de 3,6-anidro-D-galactitol respectivamente; 69,5 ppm, correspondente a C-6 de 3,6-anidro- $\alpha$ -D-galactopiranosose 2-sulfato; 60,9 a 61,2 ppm, correspondentes a C-6 das unidades de  $\beta$ -D-galactopiranosose.

O anel epóxido pode ser aberto por tratamento ácido ou alcalino em qualquer um dos seus lados, com a formação do açúcar original (dessulfatado) e de um novo açúcar (DUARTE, 1990). É provável que o anel 1,2-anidro seja um intermediário, tendo se formado e em seguida rompido durante o tratamento alcalino. Este rompimento resultaria na formação de 3,6-anidro-D-galactitol e 3,6-anidro-D-talitol, que não seriam diferenciados por RMN de  $^{13}\text{C}$ .

O carbonato de amônio é um sal básico, que deixou o pH dos eluatos obtidos da coluna de troca aniônica em torno de 8,1. As condições durante a evaporação dos eluatos a pressão reduzida, tanto de pH quanto temperatura, foram bem mais brandas que as realizadas com a fração NEC-040-1, na presença de hidróxido de sódio 1M a 80°C. É muito pouco provável que a formação das unidades de 3,6-anidro-D-galactitol,

encontradas nos oligossacarídeos das várias frações, tenham se formado pela perda do grupo sulfato de C-2 de unidades de 3,6-anidro-D-galactitol 2-sulfato durante a evaporação dos eluatos. O fato da unidade não sulfatada ter sido encontrado em oligossacarídeos presentes na fração NEC-H2O-1, não eluída com carbonato de amônio, juntamente com o isolamento de oligossacarídeos puros nas frações NEC-010-1 e NEC-025-1 contendo somente 3,6-anidro-D-galactitol-2-sulfato como terminal reduzido, descarta a possibilidade de desulfatação durante a concentração dos eluatos. A hipótese mais provável continua sendo que a perda de grupo sulfato da extremidade reduzida, dos oligossacarídeos encontrados nas diversas frações, tenha ocorrido devido às condições da hidrólise redutiva parcial e não por desulfatação alcalina.

**FIGURA 56 - ESPECTRO DE RMN DE  $^{13}\text{C}$  DEPT DE NEC-040-1-TA.**



Experimento realizado a 55°C.

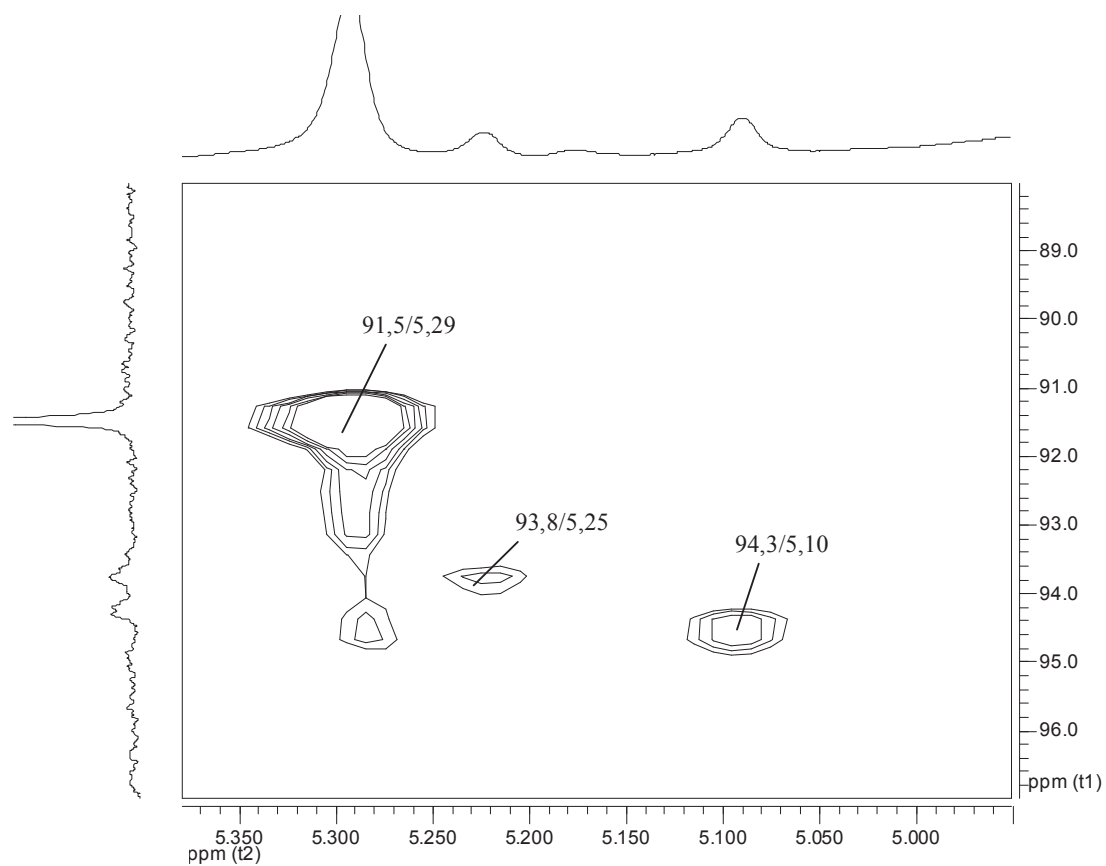
Ainda no espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de NEC-040-1-TA (Figura 54, p. 97) a presença de dois sinais chamaram atenção em 66,0 e 66,9 ppm, sendo apenas este último observado na fração nativa (NEC-040-1). Na revisão publicada por VAN de VELDE et al. (2002) é comentada a possibilidade de *E. denticulatum* sintetizar galactanas contendo resíduos de xilose ligada a C-3 da unidade de  $\alpha$ -D-galactopiranosose (unidade B). Os sinais observados em torno de 66 ppm poderiam ser de C-5 de resíduos de xilose. Entretanto, conforme mostra o espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  DEPT na Figura 56, não houve inversão dos sinais em 66,2 e 67,0 ppm, sendo descartada a presença de xilose.

Outros dois sinais chamaram a atenção nos espectros de  $^{13}\text{C}$ , tanto de NEC-040-1 quanto NEC-040-1-TA em 94,3 e 93,8 ppm (Figuras 53a e 54, p. 95 e 97). Para tentar explicar a origem destes sinais foram realizados experimentos de RMN bidimensionais.

O sinal em 94,3 ppm pertence a C-1 das unidades de 3,6-anidro- $\alpha$ -D-galactopiranosose, conforme mostrou a correlação no espectro de HMQC ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ) (Figura 57) em 94,3/5,10 ppm, uma vez que H-1 destas unidades possui deslocamento químico de 5,10 ppm (VAN de VELDE et al., 2002).

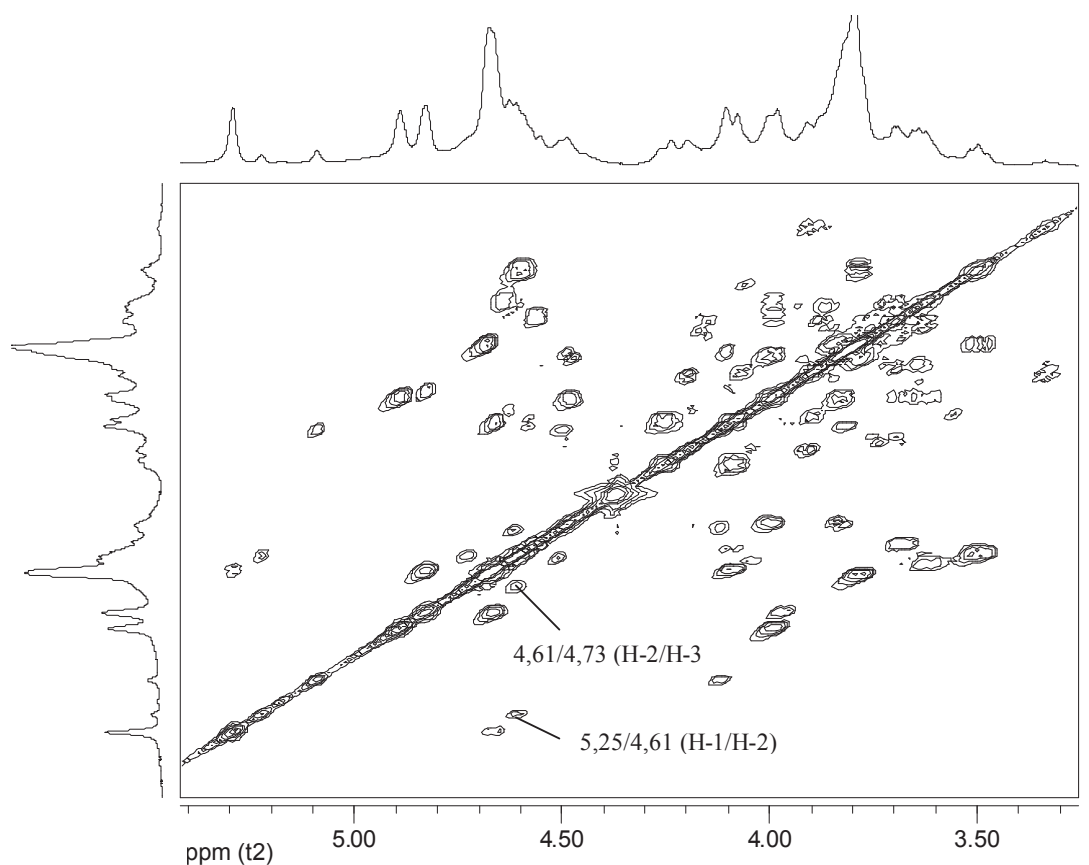
O sinal em 93,8 ppm correlaciona no espectro de HMQC ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ) com o  $^1\text{H}$  anomérico em 5,25 ppm (Figura 57). Utilizando o espectro de COSY (Figura 58) foi possível obter a correlação H-1/H-2 (5,25/4,61) e H-2/H-3 (4,61/4,73) sem, entretanto, ter sido observada a correlação H-3/H-4. Na unidade de 3,6-anidro-D-galactopiranosose a constante de acoplamento H-3/H-4 é muito baixa, de forma que não é observada correlação no espectro de COSY (YU et al., 2002). Estes dados indicam que o sinal em 93,8 ppm corresponde a C-1 de unidade de 3,6-anidro- $\alpha$ -D-galactopiranosose. O deslocamento químico de H-2 desta unidade em campo baixo, 4,61 ppm, indica ainda uma substituição por grupo sulfato em C-2 desta unidade. Os deslocamentos químicos dos prótons H-1 (5,25), H-2 (4,61) e H-3 (4,73) foram semelhantes aos assinalados para a unidade de 3,6-anidro- $\alpha$ -D-galactopiranosose 2-sulfato no tetrassacarídeo carratetraitol 2<sup>1</sup>,2<sup>3</sup>-disulfato obtido por GONÇALVES et al. (em preparo).

**FIGURA 57 - ESPECTRO DE HMQC ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ) DE NEC-040-1-TA. AMPLIAÇÃO DA REGIÃO ANOMÉRICA.**



Experimento realizado a  $55^\circ\text{C}$ .

**FIGURA 58 - ESPECTRO DE COSY DE NEC-040-1-TA.**



Experimento realizado a 55°C.

O deslocamento de C-1 de 3,6-anidro- $\alpha$ -D-galactopiranosse 2-sulfato em 93,8 ppm e não em 91,5 ppm indica que estas unidades estariam ligadas a  $\beta$ -D-galactopiranosse, numa estrutura do tipo *alfa*-carragenana (ver Tabela 1, p. 03). Isto explica a presença dos sinais em 66,0 e 66,9 ppm, que correspondem a C-4 livre das unidades de  $\beta$ -D-galactopiranosse (VAN de VELDE et al., 2002).

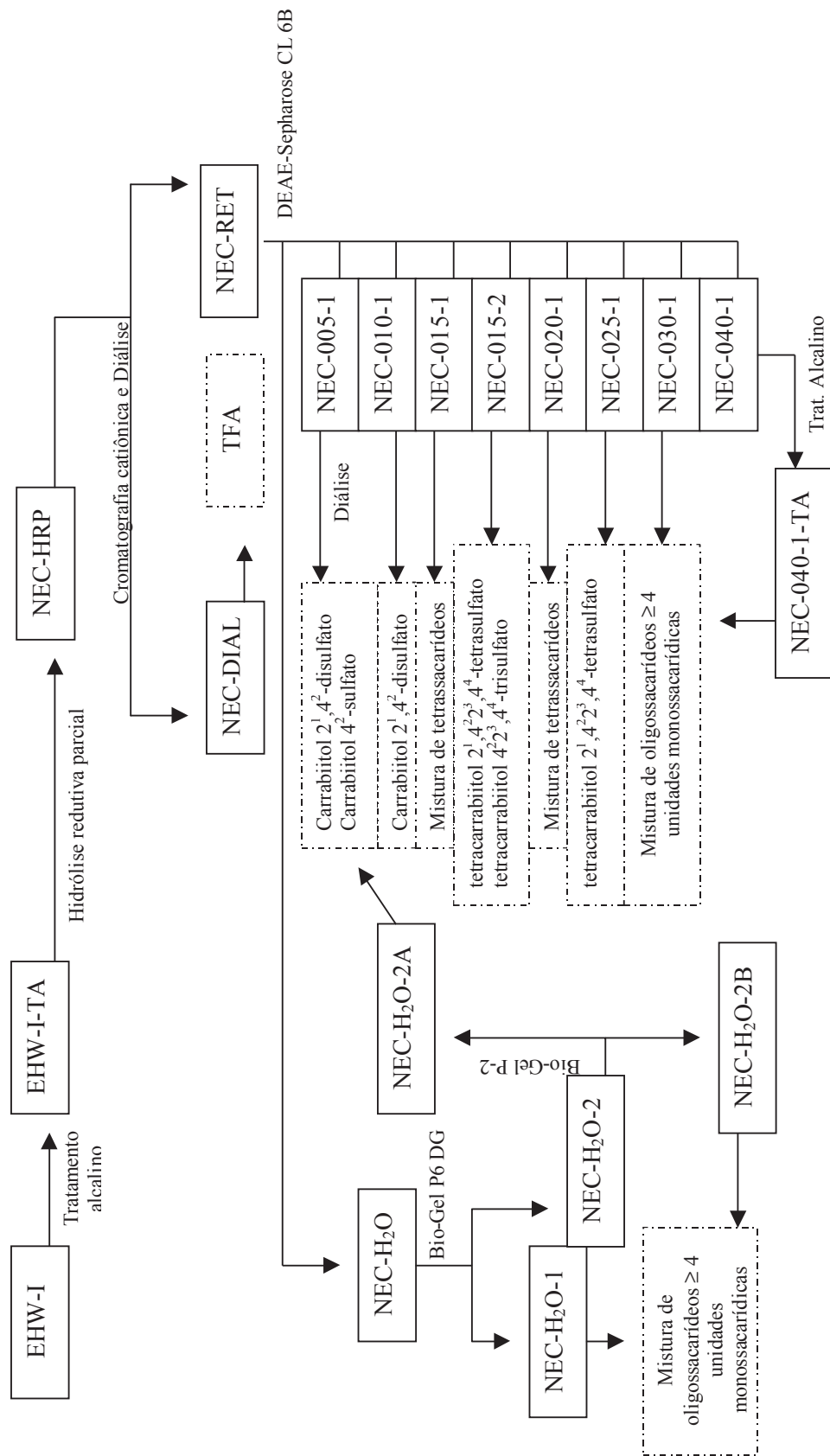
O fato de ter sido encontrado este tipo de estrutura em oligossacarídeos obtidos por hidrólise redutiva parcial não permite afirmar com certeza se estes oligossacarídeos seriam produtos da hidrólise de estruturas polissacarídicas do tipo *alfa*-carragenana, ou produtos gerados a partir da perda de grupo sulfato em C-4 de polissacarídeos do tipo *iota*-carragenana.

Desta forma os principais oligossacarídeos presentes na fração NEC-040-1 são hexassacarídeos derivados de *iota*-carragenana, podendo ter a extremidade reduzida sulfatada ou não em C-2. Os oligossacarídeos contendo estrutura semelhante a *alfa* e *kappa*-carragenana são minoria dentro desta fração.

A Figura 59 mostra, resumidamente, os passos de purificação e oligossacarídeos obtidos da hidrólise redutiva parcial dos polissacarídeos de *E. denticulatum*.



**FIGURA 59 – ESQUEMA DE PURIFICAÇÃO E OLIGOSSACARÍDEOS OBTIDOS A PARTIR DA HIDRÓLISE REDUTIVA PARCIAL DAS CARRAGENANAS DE *E. denticulatum*.**



## 5. CONCLUSÕES

Durante os processos de purificação dos oligossacarídeos obtidos por hidrólise reductiva parcial, a cromatografia de troca catiônica mostrou-se um processo eficiente e fundamental. Através desta cromatografia foi possível retirar a 4-metil-morfolina, subproduto do agente redutor borano 4-metil-morfolina usado em grande quantidade na hidrólise.

Outro processo de purificação que se mostrou fundamental foi a diálise fechada em membrana capaz de reter moléculas com massa molecular maior ou igual a 2000 Da. Este passo de purificação permitiu separar do hidrolisado o ânion trifluoracetato, proveniente do TFA, também utilizado em grandes quantidades no processo hidrolítico.

A cromatografia de troca aniônica, embora não tenha retido totalmente os oligossacarídeos sulfatados durante a purificação dos hidrolisados de *E. denticulatum* e *G. domingensis*, é a melhor forma de separar os oligossacarídeos naturalmente sulfatados obtidos por hidrólise reductiva parcial. A eluição com gradiente descontínuo é preferível, pois permitiu uma purificação mais efetiva dos oligossacarídeos. A utilização de soluções de carbonato de amônio na eluição mostrou-se mais vantajosa que a com cloreto de sódio, pois evitou a necessidade de desalifcação das amostras.

A hidrólise reductiva parcial permitiu isolar fragmentos que representam estruturas polissacarídicas minoritárias sintetizadas pelas algas. Em *E. denticulatum* foi identificada a presença da unidade de 4,6-*O*-(1'-carboxietilideno)- $\beta$ -D-galactopiranoose, nunca antes relatada. Em *G. domingensis* foi observado a presença da unidade de  $\alpha$ -L-galactopiranoose 6-sulfato, precursora da unidade 3,6-anidro.

A presença de tetra e hexassacarídeos, no hidrolisado de *E. denticulatum* e principalmente de dissacarídeos no de *G. domingensis*, indicam um padrão de fragmentação pela hidrólise reductiva altamente dependente dos grupos substituintes dos polissacarídeos. Embora as condições de hidrólise favoreçam a quebra das ligações 3,6-anidro- $\alpha$ -galactosídicas, a quebra das ligações  $\beta$ -galactosídicas também ocorre em menor percentagem. Foi observado também que as condições de hidrólise

facilitam a perda de grupos sulfatos ligados a C-2 das unidades de 3,6-anidro- $\alpha$ -D-galactopiranosose, conforme observado nos oligossacarídeos obtidos de *E. denticulatum*.

Do hidrolisado de *G. domingensis* foram isolados e caracterizados por métodos espectroscópicos os dissacarídeos:

- agarobiitol ( $\beta$ -D-galactopiranosose-(1 $\rightarrow$ 4)-3,6-anidro-L-galactitol);
- 6<sup>2</sup>-O-metil agarobiitol ( $\beta$ -D-galactopiranosose-6-O-metil-(1 $\rightarrow$ 4)-3,6-anidro-L-galactitol);
- agarobiitol 6<sup>2</sup>-sulfato ( $\beta$ -D-galactopiranosose-6-sulfato-(1 $\rightarrow$ 4)-3,6-anidro-L-galactitol).

Do hidrolisado de *E. denticulatum* foram isolados e caracterizados os oligossacarídeos:

- carrabiitol 2<sup>1</sup>,4<sup>2</sup>-disulfato ( $\beta$ -D-galactopiranosose-4-sulfato-(1 $\rightarrow$ 4)-3,6-anidro-D-galactitol-2-sulfato);
- carratetraitol 2<sup>1</sup>,4<sup>2</sup>,2<sup>3</sup>,4<sup>4</sup>-tetrasulfato ( $\beta$ -D-galactopiranosose-4-sulfato-(1 $\rightarrow$ 4)-3,6-anidro- $\alpha$ -D-galactopiranosose-2-sulfato-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-galactopiranosose-4-sulfato-(1 $\rightarrow$ 4)-3,6-anidro-D-galactitol-2-sulfato).

Dos cinco oligossacarídeos obtidos três deles - agarobiitol 6<sup>2</sup>-sulfato, carrabiitol 2<sup>1</sup>,4<sup>2</sup>-disulfato e carratetraitol 2<sup>1</sup>,4<sup>2</sup>,2<sup>3</sup>,4<sup>4</sup>-tetrasulfato – não haviam sido ainda isolados no laboratório de química de carboidratos de algas marinhas da UFPR. Os dois dissacarídeos obtidos a partir da hidrólise das carragenanas de *E. denticulatum* são de estrutura inédita, sendo pela primeira vez isolados e caracterizados.

Os oligossacarídeos foram obtidos com um elevado grau de pureza que permitirá sua utilização em vários estudos (IES-EM, EC, CLAE, entre outros).

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUILAN, J. T.; BROOM, J. E.; HEMMINGSON, J. A.; DAYRIT, F. M.; MONTAÑO, M. N. E.; DANCEL, M. C. A.; NIÑONUEVO, M. R.; FURNEAUX, R. H. Structural analysis of carrageenan from farmed varieties of Philippine seaweed. **Bot. Mar.**, v. 46, p. 179-192, 2003.

ALBAN S. Carbohydrates with anticoagulant and antithrombotic properties. In: WITCZAK, Z. J.; NIEFORTH, K. A. **Carbohydrates in drug design**. M. Dekker, New York, 703 p., 1997.

ANDERSON, N. S.; DOLAN, T. C. S.; REES, D. A. Carrageenans. Part VII. Polysaccharides from *Eucheuma spinosum* and *Eucheuma cottoni*. The covalent structure of  $\iota$ -carrageenan. **J. Chem. Soc.**, v. 19, p. 2182-2187, 1973.

AUGÉ C.; NARVOR, C.; LUBINEAU, A. Enzymatic synthesis of oligosaccharides. **Carbohydrates in Europe**, v. 27, p. 22-32, 1999.

BELLION, C.; HAMER, G. K.; YAPHE, W. The degradation of *Eucheuma spinosum* and *Eucheuma cottoni* carrageenans by  $\iota$ -carrageenases and  $\kappa$ -carrageenases from marine bacteria. **Can. J. Microbiol.**, v. 28, p. 874-880, 1982.

BREITMAIER, E.; VOELTER, W. **Carbon-13 nmr spectroscopy. High-resolution methods and applications in organic chemistry and biochemistry**, 3<sup>a</sup> edição. VHC, New York, 515 p., 1987.

CHIOVITTI, A.; KRAFT, G. T.; BACIC, A.; CRAIK, D. J.; LIAO, M. Chemistry, properties, and phylogenetic implications of the methylated carrageenans from red algae of the genus *Areschougia* (Areschougiaceae, Gigartinales, Rhodophyta). **J. Phycol.**, v. 37, p. 1127-1137, 2001.

De RUITER, G. A.; RUDOLPH, B. Carrageenan biotechnology. **Trends Food Sci. Technol.**, v. 8, p. 389-395, 1997.

DUARTE, M. E. R.; CAUDURO, J. P.; NOSEDA, D. G.; NOSEDA, M. D.; GONÇALVES, A. G.; PUJOL, C. A.; DAMONTE, E. B.; CEREZO, A. S. The structure of the agaran sulfate from *Acanthophora spicifera* (Rhodomelaceae, Ceramiales) and its antiviral activity. Relation between structure and antiviral activity in agarans. **Carbohydr. Res.**, v. 339, p. 335-347, 2004.

DUARTE, M. E. R. Heteropolissacarídeos ácidos isolados de *Laminaria brasiliensis* J. & O.: Ácido alginico e fucanas. **Dissertação (Doutorado em Ciências, Bioquímica)** – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, 202 p., 1990.

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

DUFF, R. B.; PERCIVAL, G. V. Carbohydrate sulphuric esters. Part IV. Production of a derivative of 5:6-anhydroglucose by the hydrolysis of a sulphate. **J. Chem. Soc.**, p. 1675-1678, 1947.

EKEBERG, D.; KNUTSEN, S. H.; SLETMOEN, M. Negative-ion electrospray ionisation-mass spectrometry (ESI-MS) as a tool for analysing structural heterogeneity in kappa-carrageenan oligosaccharides. **Carbohydr. Res.**, v. 334, p. 49-59, 2001.

FERNÁNDEZ, L. E.; VALIENTE, O. G.; MAINARDI, V.; BELLO, J. L. Isolation and characterization of an antitumor active Agar-type polysaccharide of *Gracilaria domingensis*. **Carbohydr. Res.**, v. 190, p. 77-83, 1989.

FRANCIS, D.J.; PARISH, C. R.; MCGARRY, M.; SANTIAGO, F. S.; LOWE, H. C.; BROWN, K. J.; BINGLEY, J. A.; HAYWARD, I. P.; COWDEN, W. B.; CAMPBELL, J. H.; CAMPBELL, G. R.; CHESTERMAN, C. N.; KHACHIGIAN, L. M. Blockade of vascular smooth muscle cell proliferation and intimal thickening after balloon injury by the sulfated oligosaccharide PI-88. **Circulation Research.**, v. 92, p. 70-77, 2003.

GAREGG, P. J.; JANSSON, P.; LINDBERG, B.; LINDH, F. LÖNNGREN, J.; KVARNSTRÖM, I.; NIMMICH, W. Configuration of the acetal carbon atom of pyruvic acid acetals in some bacterial polysaccharides. **Carbohydr. Res.**, v. 78, p. 127-132, 1980.

GONÇALVES, A. G. Oligossacarídeos piruvatados e sulfatados obtidos a partir de galactanas de algas vermelhas (Rhodophyta). **Dissertação (Mestrado em Ciências, Bioquímica)** – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, 102p., 2001.

GONÇALVES, A. G.; DUCATTI, D. R. B.; DUARTE, M. E. R.; NOSEDA, M. D., Sulfated and pyruvylated disaccharide alditols obtained from a red seaweed galactan: ESIMS and NMR approaches. **Carbohydr. Res.** v. 337, p. 2443-2453, 2002.

GORIN, P. A. J.; MAZUREK, M. Further studies on the assignment of signals in <sup>13</sup>C magnetic resonance spectra of aldoses and derived methyl glycosides. **Can. J. Chem.**, v. 53, p. 1212-1222, 1975.

GREER, C. W.; YAPHE, W. Characterization of hybrid (*beta*-kappa-gamma) carrageenan from *Eucheuma gelatinae* J. Agardh (Rhodophyta, Solieriaceae) using carrageenases, infrared and <sup>13</sup>C-nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Bot. Mar.**, v. 27, p. 473-478, 1984.

GUIMARÃES, M. Aspectos fisiológicos de *Gracilaria domingensis* (Gracilariales, Rhodophyta): subsídios para a compreensão da manutenção do polimorfismo pigmentar. **Dissertação (Doutorado em Ciências, Botânica)** – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, 98p., 2000.

GÜVEN, K. C.; ÖZSOY, Y.; ULUTIN, O. N. Anticoagulant, fibrinolytic and antiaggregant activity of carrageenans and alginic acid. **Bot. Mar.**, v. 34, p. 429-432, 1991.

KANDLER, O.; HOPF, H. Occurrence, metabolism and function of oligosaccharides. In: STUMPF, P.K.; CONN, E.E. (eds.). **The biochemistry of plants: a comprehensive treatise – Carbohydrates: structure and function**, New York: Academic Press, v. 3, p. 221-226, 1980.

KÄSBAUER, C. W.; PAPER, D. H.; FRANZ, G. Sulfated  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-galacto-oligosaccharides and their effect on angiogenesis. **Carbohydr. Res.**, v. 330, p. 427-430, 2001.

KATSURAYA, H.; NAKASHIMA, H.; YAMAMOTO, N.; URYU, T. Synthesis of sulfated oligosaccharide glycosides having high anti-HIV activity and the relationship between activity and chemical structure. **Carbohydr. Res.**, v. 315, p. 234-242, 1999.

KNUTSEN, S. H.; GRASDALEN, H. Characterization of water-extractable polysaccharides from norwegian *Furcellaria lumbricalis* (Huds.) Lamour. (Gigartinales, Rhodophyceae) by IR and NMR spectroscopy. **Bot. Mar.**, v. 30, p. 497-505, 1987.

KNUTSEN, S. H.; MYSLABODSKI, D. E.; LARSEN, B.; USOV, A. I. A modified system of nomenclature for red algal galactans. **Bot. Mar.**, v. 37, p. 163-169, 1994.

KNUTSEN, S. H.; GRASDALEN, H. The use of neocarrabiose oligosaccharides with different length and sulphate substitution as model compounds for  $^1\text{H}$ -NMR spectroscopy. **Carbohydr. Res.**, v. 229, p. 233-244, 1992.

KNUTSEN, S. H.; SLETMOEN, M.; KRISTENSEN, T.; BARBEYRON, T.; KLOAREG, B.; POTIN, P. A rapid method for the separation and analysis of carrageenan oligosaccharide released by *iota*- and *kappa*-carrageenase. **Carbohydr. Res.**, v. 331, p. 101-106, 2001.

LAHAYE, M.; YAPHE, W.; VIET, M. T. P.; ROCHAS, C.  $^{13}\text{C}$ -nmr spectroscopic investigation of methylated and charged agarose oligosaccharides and polysaccharides. **Carbohydr. Res.**, v. 190, p. 249-265, 1989.

LINHARDT, R. J.; TOIDA, T. Heparin oligosaccharides: New analogues development and applications. In: WITCZAK, Z. J.; NIEFORTH, K. A. **Carbohydrates in drug design**. M. Dekker, New York, 703p., 1997.

LIU, J.; SHRIVER, Z.; POPE, R. M.; THORP, S. C.; DUNCAN, M. B.; COPELAND, R. J.; RASKA, C. S.; YOSHIDA, K.; EISENBERG, R. J.; COHEN, G.; LINHARDT, R. J.; SASISEKHRARAN, R. Characterization of a heparan sulfate octasaccharide that binds to herpes simplex virus type 1 glycoprotein D. **J. Biol. Chem.**, v. 277, p. 33456-33467, 2002.

MAZUMDER, S.; GHOSAL, P. K.; PUJOL, C. A.; CARLUCCI, M. J.; DAMONTE, E. B.; RAY, B. Isolation, chemical investigation and antiviral activity of polysaccharides from *Gracilaria corticata* (Gracilariaceae, Rhodophyta). **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 31, p. 87-95, 2002.

NOMURA, K.; NAITOH, Y.; MURAMATSU, S.; YOSHIZAWA, Y.; TSUNEHIRO, J.; FUKUI, F.; ITOH, M. New sulfated oligosaccharide produced by *Pseudomonas*  $\beta$ -agarase from *Gracilaria verrucosa* polysaccharide. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v. 62, p. 1190-1195, 1998.

NOSEDA, M. D.; CEREZO, A. S. Alkali modification of carrageenans-II. The cyclization of model compounds containing non-sulfated  $\beta$ -D-galactose units. **Carbohydr. Polym.**, v. 26, p. 1-3, 1995.

NYBERG, K.; EKBLAD, M.; BERGSTRÖM, T.; FREEMAN, C.; PARISH, C. R.; FERRO, V.; TRYBALA, E. The low molecular weight heparan sulfate-mimetic, PI-88, inhibits cell-to-cell spread of herpes simplex virus. **Antiviral Res.**, v. 63, p. 15-24, 2004.

PAINTER, T.J. Algal Polysaccharides. In: ASPINALL, G. **The polysaccharides**, v. 2, p. 195-285, 1982.

PARISH, C. R.; FREEMAN, C.; BROWN, K. J.; COWDEN, W. B., Identification of sulfated oligosaccharides-based inhibitors of tumor growth and metastasis using novel *in vitro* assays for angiogenesis and heparanase activity. **Cancer Res.**, v. 59, p. 3433-3441, 1999.

PENMAN, A.; REES, D. A. Carrageenans. Part XI. Mild oxidative hydrolysis of  $\kappa$  and  $\iota$ -carrageenans and the characterisation of oligosaccharide sulphates. **J. Chem. Soc.**, v. 19, p. 2191-2196, 1973.

RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHORN, S.E. **Biologia vegetal**, 5<sup>a</sup> edição. Guanabara/Koogan, Rio de Janeiro, 728 p. 1996.



RENN, D. Biotechnology and the red seaweed polysaccharide industry: status, needs and prospects. **Trends Biotechnol.**, v. 15, p. 9-14, 1997.

ROCHAS, C.; LAHAYE, M.; YAPHE, W. <sup>13</sup>C-nmr spectroscopic investigation of agarose oligomers. **Carbohydr. Res.**, v. 148, p. 199-207, 1986.

SAKAMOTO, T.; SAKAI, T. Analysis of structure of sugar-beet pectin by enzymatic methods. **Phytochemistry**, v. 39, p. 821-823, 1995.

SHUKLA, D.; LIU, J.; BLAIKLOCK, P.; SHWORAK, N. W.; BAI, X.; ESKO, J. D.; COHEN, G. H.; EISENBERG, R. J.; ROSENBERG, R. D.; SPEAR, P. G. A novel role for 3-O-sulfated heparan sulfate in herpes simplex virus 1 entry. **Cell**, v. 99, p. 13-22, 1999.

STAHL, E. **Thin-layer chromatography**. Springer-Verlag, New York, 1965.

STANEK, J.; CERNY, M.; PACAK, J. **The oligosaccharides**. First Edition. Academic Press, New York, 567 p., 1965.

STEVENSON, T.; FURNEAUX, R. Chemical methods for the analysis of sulphated galactans from red algae. **Carbohydr. Res.**, v. 210, p. 277-298, 1991.

STORTZ, C. A.; CEREZO, A. S. Novel findings in carrageenans, agaroids and hybrid red seaweed galactans. **Curr. Top. Phytoch.**, v. 4, p. 121-134, 2000.

TAKANO, R.; HAYASHI, K.; HARA, S. Highly methylated agars with a high gel-melting point from the red seaweed, *Gracilaria eucheumoides*. **Phytochemistry**, v. 40, p. 487-490, 1995.

TURVEY, J. R. Sulfates of the simple sugars. **Advan. Carbohydrate Chem.**, v. 20, p. 183-218, 1965.

URYU, T.; IKUSHIMA, N.; KATSURAYA, K.; SHOJI, T.; TAKAHASHI, N.; YOSHIDA, T.; KANNO, K.; MURAKAMI, T.; NAKASHIMA, H.; YAMAMOTO, N. Sulfated alkyl oligosaccharides with potent inhibitory effects on human immunodeficiency virus infection. **Biochem. Pharmacol.**, v. 43, p. 2385-2392, 1992.

USOV, A. I.; ELASHVILI, M.Y. Polysaccharides of algae 44. Investigation of sulfated galactan from *Laurencia nipponica* Yamada (Rhodophyta, Rhodomelaceae), using partial reductive hydrolysis. **Bot. Mar.**, v. 34, p. 553-560, 1991.

VALIENTE, O.; FERNÁNDEZ, L. E.; PEREZ, R. M.; MARQUINA, G.; VELEZ H. Agar polysaccharides from the red seaweeds *Gracilaria domingensis* Sonder ex Kützing and *Gracilaria mammillaris* (Montagne) Howe. **Bot. Mar.**, v. 35, p. 77-81, 1992.



VAN de VELDE, F.; KNUTSEN, S. H.; USOV, A. I.; ROLLEMA, H. S.; CEREZO, A. S.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  high resolution NMR spectroscopy of carrageenans: application in research and industry. **Trends Food Sci. Technol.**, v. 13, p. 73-92, 2002.

VIANA, A. G. Estudo de uma porfirana com estrutura não usual obtida da alga vermelha *Porphyra columbina* Montagne (Bangiales, Rhodophyta). **Dissertação (Mestrado em Ciências, Bioquímica)** – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, 97p., 2001.

VIANA, A. G.; NOSEDA, M. D.; DUARTE, M. E. R.; CEREZO, A. S. Alkali modification of carrageenans. Part V. The iota-nu hybrid carrageenan from *Eucheuma denticulatum* and its cyclization to iota-carrageenan. **Carbohydr. Polym.**, v. 58, p. 455-460, 2004.

WALL, D.; DOUGLAS, S.; FERRO, V.; COWDEN, W.; PARISH, C. Characterisation of the anticoagulant properties of a range of structurally diverse sulfated oligosaccharides. **Thromb. Res.**, v. 103, p. 325-335, 2001.

WITCZAK, Z. J. Carbohydrates as new and old targets for future drug design. In: WITCZAK, Z. J.; NIEFORTH, K. A. **Carbohydrates in drug design**. M. Dekker, New York, 703 p., 1997.

WITVROUW, M.; PANNECOUQUE, C.; DE CLERCQ, E. Polysulfates: chemistry and potential as antiviral drugs. In: WITCZAK, Z. J.; NIEFORTH, K. A. **Carbohydrates in drug design**. M. Dekker, New York, 703 p., 1997.

YANG, B. Y.; BRAND, J.; MONTGOMERY, R. Pyruvated galactose and oligosaccharides from *Erwinia chrysanthemi* Ech6 extracellular polysaccharide. **Carbohydr. Res.**, v. 331, p. 59-67, 2001.

YOUNG, K.S.; BHATTACHARJEE, S. S.; YAPHE, W. Enzymic cleavage of the  $\alpha$ -linkages in agarose, to yield agaro-oligosaccharides. **Carbohydr. Res.**, v. 66, p. 207-212, 1978.

YU, G.; GUAN, H.; IOANOVICIU, A.S.; SIKKANDER, S.A.; THANAWIROON, C.; TOBACMAN, J.K.; TOIDA, T.; LINHARDT, R.J. Structural studies on  $\kappa$ -carrageenan derived oligosaccharides. **Carbohydr. Res.**, v. 337, p. 433-440, 2002.

ZENG, Y.; LI, A.; KONG, F. A concise synthesis of arabinogalactan with  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6) galactopyranose backbone and  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 2) arabinofuranose side chains. **Tetrahedron Letters**, v. 44, p. 8325-8329, 2003.

ZHANG, Q.; LI, N.; LIU, X.; ZHAO, Z.; LI, Z.; XU, Z. The structure of a sulfated galactan from *Porphyra haitanensis* and its *in vivo* antioxidant activity. **Carbohydr. Res.**, v. 339, p. 105-111, 2004.