

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

FRANCIELY GROSE COLODI

**ESTRUTURA QUÍMICA E ATIVIDADE ANTIVIRAL DOS PRODUTOS  
DE HIDRÓLISE REDUTIVA PARCIAL DE GALACTANAS SULFATADAS  
DO TIPO DL-HÍBRIDA ISOLADAS DA ALGA *Cryptonemia seminervis*  
(HALYMENIALES, RHODOPHYTA)**

CURITIBA  
2011

FRANCIELY GROSE COLODI

**ESTRUTURA QUÍMICA E ATIVIDADE ANTIVIRAL DOS PRODUTOS  
DE HIDRÓLISE REDUTIVA PARCIAL DE GALACTANAS SULFATADAS  
DO TIPO DL-HÍBRIDA ISOLADAS DA ALGA *Cryptonemia seminervis*  
(HALYMENIALES, RHODOPHYTA)**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências - Bioquímica.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Eugênia Duarte Nosedá

Co-orientador: Prof. Dr. Miguel Daniel Nosedá

CURITIBA  
2011

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Eugênia Duarte Nosedá

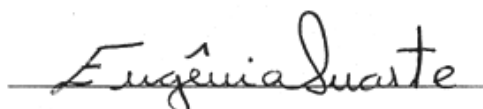
Co-orientador: Prof. Dr. Miguel Daniel Nosedá

# TERMO DE APROVAÇÃO

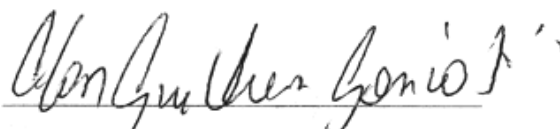
**Franciely Grose Colodi**

**ESTRUTURA QUÍMICA E ATIVIDADE ANTIVIRAL DOS PRODUTOS  
DE HIDRÓLISE REDUTIVA PARCIAL DE GALACTANAS SULFATADAS  
DO TIPO DL-HÍBRIDA ISOLADAS DA ALGA *Cryptonemia seminervis*  
(HALYMENIALES, RHODOPHYTA)**

Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Ciências-Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:



Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Maria Eugênia Duarte Nosedá – Presidente  
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular - UFPR



Prof. Dr. Alan Guilherme Gonçalves  
Departamento de Farmácia - UFPR



Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Rosiane Guetter Mello Zibetti  
Faculdades Pequeno Príncipe - FPP

Curitiba, 17 de fevereiro de 2011.

Aos meus pais Pedro e Fátima, por  
todo amor incondicional, atenção,  
carinho e fé despendidos.

## **AGRADECIMENTOS**

Obrigada Deus!

À professora Maria Eugênia e ao professor Miguel pela orientação e por todos os anos de convivência, ensinamentos, conversas, experiências e paciência... Obrigada por terem me aceitado como aluna de mestrado!

À professora Mutue e sua aluna Ingrid Balasteros pela coleta das algas.

À professora Maria Teresa Romanos pelas análises antivirais e correções.

À Eliz e à Rô pelas análises, compreensão, simpatia e agradável convivência.

Aos professores e alunos que empregam tempo e dedicação para que tudo funcione e aos que “fazem o RMN andar”, meu muito obrigada.

Aos colegas da turma de mestrado 2009 pela convivência agradável durante o cumprimento dos créditos.

Aos colegas e amigos de laboratório pela agradável convivência, auxílio no dia-a-dia e pela prática da arte que é viver em sociedade.

Aos colegas e amigos de laboratórios vizinhos pela agradável convivência, momentos de descontração, conselhos e casuais empréstimos pelo bem da ciência.

Aos que já passaram pelo Departamento de Bioquímica da UFPR e conhecem bem o gostinho de dizer “eu já fui do DPBQ” pela força e reconhecimento.

À minha companheira Lu pela convivência sempre agradável de manhã, de tarde e à noite, durante a semana e fins de semana... Obrigada pelo companheirismo, amizade, força e dedicação. Obrigada pelo apoio, conselhos, conversas e gargalhadas. Você é um suuuuucesso!!

Ah... a “patotinha” da turma de mestrado, uma de cada lado, uma pra cada canto, mas sempre unidas para comer no “massinhas” nas sextas-feiras de referata... Tudo na vida deve ser compartilhado e compartilhar tantos momentos com vocês foi maravilhoso! Obrigada por vocês existirem na minha vida, vocês são muito importantes pra mim.

Aos amigos da Biologia pelo companheirismo e carinho de todos estes anos. Obrigada a turma das “Gatas” por fazer minha vida muito mais alegre e gostosa de se viver!

À minha família maravilhosa, obrigada pai, mãe e Marquito por estarem sempre ao meu lado e acreditarem em mim. Vocês são meu porto seguro, amo vocês! Marcos, gostaria de fazer um agradecimento especial a você pelas noites e madrugadas de companhia, por me aturar lhe pedindo favores, por guardar o último pedaço da torta de limão, por lavar a louça enquanto eu escrevia a dissertação e tantos outros momentos... Puxa, você é o máximo! Muito obrigada!

Ao curso de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica e aos órgãos financiadores de pesquisa no Brasil pelo suporte (MCT/CNPq/MS-SCTIE-DECIT/CT-Saúde (Processo 554671/2006-9) e MCT/CNPq/CT-PETRO (Processo 558044/2009-3)). Bolsa CNPq entre outubro de 2010 e março de 2011 (Processo 152471/2010-3).

*a imaginação é mais importante  
que o conhecimento*

Albert Einstein

## RESUMO

Galactanas sulfatadas do tipo DL-híbrida apresentam grande dispersão estrutural em função da diversidade de substituintes e suas posições, além da presença de unidades B pertencentes a ambas as séries enantioméricas D- e L-, fato que intensifica a complexidade estrutural destes biopolímeros. Neste trabalho utilizou-se o processo de hidrólise redutiva parcial para obtenção de produtos de menor massa molecular (galactanas despolimerizadas) a partir dos polissacarídeos extraídos da alga *Cryptonemia seminervis*. Estes foram extraídos com solução tampão (0,025M; pH 6,5; 1,5% m/v; 80°C, 6h). Os polissacarídeos obtidos (S) foram tratados com KCl 2M originando as frações precipitada SP (5%) e solúvel SS (95%). A fração SS foi submetida à hidrólise redutiva parcial (complexo redutor borano 4-metil-morfolina, concentração final TFA 0,38M, 65°C, 6 h). O hidrolisado resultante (DS) foi dialisado (6 a 8 kDa) originando a fração DSi retida durante a diálise, a qual foi fracionada por cromatografia de troca aniônica (DEAE-Sephacel). As galactanas despolimerizadas (76,5% de rendimento) obtidas DSi-1 (51.600Da), DSi-2e (60.110Da), DSi-3 (63.770Da), DSi-4 (~86.820Da) e DSi-5 (~144.000Da) foram analisadas por métodos químicos e espectroscópicos. As frações homogêneas DSi-1, DSi-2e e DSi-3 são enriquecidas com estruturas de agaranas ( $[\alpha]_D$  -34,0°; -23,5°; -12,0°, respectivamente), enquanto DSi-4 e DSi-5 são ricas em estruturas de carragenanas ( $[\alpha]_D$  +25,0°; +36,0°). A fração DSi-1 (14,1% NaSO<sub>3</sub>) contém uma substituição por acetal de ácido pirúvico a cada 33 unidades e apresenta 25% das unidades A sulfatadas em C-2. As unidades B, na forma anidrogalactosídica são 34% glicosiladas em C-2 por unidade simples de xilose e/ou galactose, enquanto as galactosídicas são 13% sulfatadas em C-6. A fração DSi-2e (23,7% NaSO<sub>3</sub>) contém uma substituição por acetal de ácido pirúvico a cada 22 unidades. As unidades A (45%, G2S e G2SP) e B (29 a 26%, LA2S), são altamente sulfatadas em C-2. A fração DSi-3 (29,9% NaSO<sub>3</sub>) também é piruvatada, com unidades A representadas por  $\beta$ -D-galactose(2S) e  $\beta$ -D-galactose-4,6-O-(1'-carboxietilideno) sulfatadas ou não em C-2, enquanto as unidades B são compostas, em parte, por 3,6-anidro- $\alpha$ -D-galactose e 3,6-anidro- $\alpha$ -L-galactose na proporção de 1:7,4. A fração DSi-4 (31,7% NaSO<sub>3</sub>) apresenta unidades de  $\beta$ -D-galactose, sulfatadas ou não, ligadas principalmente a unidades de  $\alpha$ -D-galactose sulfatadas e 3,6-anidro- $\alpha$ -D-galactose (2S) mostrando aproximadamente 94% das unidades B como D-enantiômeros. A fração DSi-5 (38,5% NaSO<sub>3</sub>) é constituída principalmente por estruturas de carragenanas com unidades de 3,6-anidro- $\alpha$ -D-galactose e 3,6-anidro- $\alpha$ -L-galactose na proporção de 4:1. A galactana S2S-4 (332.400Da) de *C. seminervis*, a amostra polissacarídica SS e as galactanas despolimerizadas DSi-1, DSi-2e e DSi-3, foram avaliadas frente aos vírus Herpes simplex HSV-1 e HSV-2. S2S-4 e SS apresentaram altos índices de seletividade principalmente contra HSV-2 (>11.111 e >18.182, respectivamente). A galactana despolimerizada DSi-1 apresentou baixa atividade contra HSV-1, enquanto DSi-2e e DSi-3 não foram ativas. Estes resultados mostram a dependência da atividade anti-HSV em relação à massa molecular e a proporção e posição dos grupos sulfato nas moléculas ativas. A porcentagem de galactanas despolimerizadas com maior caráter de agaranas está de acordo com os resultados previamente obtidos para as galactanas nativas de *C. seminervis* e com a constituição de blocos de agaranas e carragenanas para as galactanas sulfatadas do tipo DL-híbrida.

Palavras-chave: galactanas DL-híbridas, hidrólise redutiva parcial, *Cryptonemia seminervis*.



## ABSTRACT

DL-hybrid sulfate galactans show highly dispersion of structures due to the amount and position of substituent groups, in addition B units reveal D- or L- configuration that intensify the complexity of their structure. In this work partial reductive hydrolysis was used to produce low molecular weight galactans (depolymerized galactans) from polysaccharides biosynthesized by red seaweed *Cryptonemia seminervis*. The algae was extracted with phosphate buffer (0,025M; pH 6,5; 1,5% w/v; 80°C, 6h) and the polysaccharides (S) were purified by treatment with KCl 2M, giving rise to the precipitated SP (5%) and soluble SS (95%) fractions. SS was submitted to a partial depolymerization (4-methylmorpholine borane, TFA 0,38M final concentration, 65°C, 6 h). The products (DS) were dialyzed (6 to 8 kDa cut off) yielding the retained DSi fraction, which was fractionated by anion-exchange chromatography (DEAE-Sephacel). Depolymerized galactans (76.5% yield) DSi-1 (51,600Da), DSi-2e (60,110Da), DSi-3 (63,770Da), DSi-4 (~86,820Da) and DSi-5 (~144,000Da) were analyzed by chemical and spectroscopic methods. The homogeneous fractions DSi-1, DSi-2e and DSi-3 are enriched by agarans structures ( $[\alpha]_D$  -34.0°; -23.5°; -12.0°, respectively), while DSi-4 and DSi-5 show major carrageenans structures ( $[\alpha]_D$  +25.0°; +36.0°). DSi-1 (14.1% SO<sub>3</sub>Na) contains one pyruvate acetal group every 33 units and presents 25% of 2-O-sulfated A units. Anhydrogalactosidic B units present high degree of glycosylation on C-2 (34%) by xylosyl and galactosyl units besides 13% of galactosidic B units 6-O-sulfated. DSi-2e (23.7% SO<sub>3</sub>Na) contains one pyruvate acetal group/22 units and presents the A and B units highly sulfated on C-2 (45%, G2S and G2SP) and (29 to 26%, LA2S), respectively. DSi-3 (29.9% SO<sub>3</sub>Na) is also pyruvylated. A units are represented by β-D-galactose(2S) and β-D-galactose-4,6-O-(1'-carboxyethylidene)(2S) and B units are composed partly by 3,6-anhydro-α-D-galactose e 3,6-anhydro-α-L-galactose (1:7.4). DSi-4 (31.7% SO<sub>3</sub>Na) presents β-D-galactose (sulfated or not) linked mainly to sulfated α-D-galactoses and 3,6-anidro-α-D-galactose 2-sulfate, accordingly to ~94% of B units belong to D-enantiomeric series. DSi-5 (38.5% SO<sub>3</sub>Na) consists mainly in carrageenans structures, showing 3,6-anhydro-α-D-galactose and 3,6-anhydro-α-L-galactose in a ratio of 4:1. The galactan S2S-4 (332,400Da) obtained from *C. seminervis*, the polysaccharide fraction SS and the depolymerized galactans DSi-1, DSi-2e and DSi-3 were evaluated against Herpes simplex viruses HSV-1 and HSV-2. S2S-4 (332,400 kDa) and SS showed potent antiherpetic activity with very high selectivity indices (HSV-2 >11.111 and >18.182, respectively). DSi-1 exhibited low activity against HSV-1, while DSi-2e and DSi-3 showed no activity. These results indicate anti-HSV activity depends of molecular weight as well as of the ratio/position of sulfate groups. The ratio of agaran-like depolymerized galactans agree with previous results obtained to native galactans from *C. seminervis* and with the block's theory about DL-hybrid sulfated galactans.

Key words: DL-hybrid sulfated galactans, partial reductive hydrolysis, *Cryptonemia seminervis*.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - ESTRUTURA BÁSICA REPETITIVA DAS GALACTANAS.....	3
FIGURA 2 - ESTRUTURA BÁSICA REPETITIVA DE CARRAGENANAS .....	4
FIGURA 3 - ESTRUTURA BÁSICA REPETITIVA DAS AGARANAS .....	6
FIGURA 4 - ESTRUTURA BÁSICA REPETITIVA DE UMA GALACTANA DO TIPO DL-HÍBRIDA .....	8
FIGURA 5 - PRINCIPAIS UNIDADES MONOSSACARÍDICAS PRESENTES NAS GALACTANAS S2S-3 E S2S-4 OBTIDAS DE <i>C. seminervis</i> (ZIBETTI et al., 2009).....	15
FIGURA 6 - PRINCIPAIS DÍADES PRESENTES NA GALACTANA DL-HÍBRIDA S2S- 3 DE <i>C. seminervis</i> (ZIBETTI et al., 2009).....	16
FIGURA 7 - ESQUEMA GERAL DA REAÇÃO DE METILAÇÃO .....	19
FIGURA 8 - ESTEREOISÔMEROS DO COMPOSTO BUTANO 2,3-DISUBSTITUÍDO (n = 2 CENTROS QUIRAIS, POR ISSO 2n = 4 ESTEREOISÔMEROS) (NELSON e COX, 2002) .....	20
FIGURA 9 - ENANTIÔMEROS DA GALACTOSE .....	21
FIGURA 10 -AMINAS QUIRAIS (S)-1-AMINO-2-PROPANOL (a) E (S)- $\alpha$ - METILBENZILAMINA (b).....	23
FIGURA 11 -MECANISMO DE AMINAÇÃO REDUTIVA (SOLOMONS e FRYHLE, 2002) .....	23
FIGURA 12 -RESULTADO DA DUPLA HIDRÓLISE-AMINAÇÃO REDUTIVA PARA UNIDADES DE 3,6-ANIDROGALACTOSE UTILIZANDO-SE (S)- $\alpha$ - METILBENZILAMINA: DIASTEREOISÔMEROS D/(S), L/(S) .....	24
FIGURA 13 - PRODUTOS DE METANÓLISE PARCIAL DE AGARANAS .....	25
FIGURA 14 -PRODUTOS DE HIDRÓLISE ÁCIDA PARCIAL CONVENCIONAL SUAVE EM AGARANAS (MODIFICADO DE GONÇALVES, 2005)....	26
FIGURA 15 -PRODUTOS DE HIDRÓLISE ÁCIDA PARCIAL CONVENCIONAL (a) E OXIDATIVA (b) EM $\kappa$ -CARRAGENANA (MODIFICADO DE DUCATTI, 2005) .....	27
FIGURA 16 -HIDRÓLISE DA AGAROSE POR $\alpha$ - E $\beta$ -AGARASES (MODIFICADO DE DUCATTI, 2005).....	28
FIGURA 17 - HIDRÓLISE DA $\kappa$ -CARRAGENANA POR $\kappa$ -CARRAGENASE.....	29

FIGURA 18 -OLIGOSSACARÍDEOS ALDITÓIS ISOLADOS DE <i>L. nipponica</i> (CERAMIALES, RHODOPHYTA) (USOV E ELASHVILI, 1991).....	31
FIGURA 19 -OLIGOSSACARÍDEO ALDITOL AGAROBIIITOL 4 <sup>2</sup> , 6 <sup>2</sup> -O-(1'-CARBOXIETILIDENO) 2 <sup>2</sup> -SULFATO DE <i>A. spicifera</i> (CERAMIALES) ISOLADO PELA PRIMEIRA VEZ POR GONÇALVES et al. (2002) ....	33
FIGURA 20 -OLIGOSSACARÍDEOS ALDITÓIS (a) CARRABIITOL 2 <sup>1</sup> ,4 <sup>2</sup> -DISULFATO E (b) CARRATETRAITOL 2 <sup>1</sup> ,4 <sup>2</sup> ,2 <sup>3</sup> ,4 <sup>4</sup> -TETRASULFATO ISOLADOS DE <i>G. domingensis</i> E <i>E. denticulatum</i> (DUCATTI, 2005).	33
FIGURA 21 -ALQUILGLICOSÍDEOS SULFATADOS SUBMETIDOS AOS ENSAIOS DE ATIVIDADE ANTI-HSV (GONÇALVES, 2005) .....	39
FIGURA 22 - ESPECTRO DE RMN DE <sup>13</sup> C DA FRAÇÃO SS .....	63
FIGURA 23 - ESPECTRO DE RMN DE <sup>13</sup> C DA FRAÇÃO DSi .....	69
FIGURA 24 -CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO ESTÉRICA (HPSEC-MALLS-IR) DA FRAÇÃO DSi.....	70
FIGURA 25 -PERFIL DE ELUIÇÃO EM HPSEC COM DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO DAS FRAÇÕES SS E DSi .....	71
FIGURA 26 -ESQUEMA DE EXTRAÇÃO E FRACIONAMENTO DOS POLISSACARÍDEOS DESPOLIMERIZADOS DE <i>C. seminervis</i> .....	72
FIGURA 27 -CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO ESTÉRICA (HPSEC-MALLS-IR) DA FRAÇÃO DSi-1.....	73
FIGURA 28 -CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO ESTÉRICA (HPSEC-MALLS-IR) DA FRAÇÃO DSi-2.....	73
FIGURA 29 -CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO ESTÉRICA (HPSEC-MALLS-IR) DA FRAÇÃO DSi-3.....	74
FIGURA 30 -CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO ESTÉRICA (HPSEC-MALLS-IR) DA FRAÇÃO DSi-4.....	74
FIGURA 31 -CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO ESTÉRICA (HPSEC-MALLS-IR) DA FRAÇÃO DSi-5.....	74
FIGURA 32 -CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO ESTÉRICA (HPSEC-MALLS-IR) DA FRAÇÃO DSi -2c.....	75
FIGURA 33 -CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO ESTÉRICA (HPSEC-MALLS-IR) DA FRAÇÃO DSi -2d.....	75

FIGURA 34 - CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO ESTÉRICA (HPSEC-MALLS-IR) DA FRAÇÃO DSi -2e.....	76
FIGURA 35 - SIMETRIA ENTRE AS MOLÉCULAS DE 3-O-METILGALACTOSE E 4-O-METILGALACTOSE APÓS REDUÇÃO COM NaBH <sub>4</sub> .....	82
FIGURA 36 - DIFERENCIAÇÃO DOS AÇÚCARES 3-O-METILGALACTOSE E 4-O-METILGALACTOSE ATRAVÉS DOS FRAGMENTOS DE MASSA DOS DERIVADOS OBTIDOS POR HIDRÓLISE, REDUÇÃO COM NaBD <sub>4</sub> , ACETILAÇÃO E ANÁLISE POR CLG-EM.....	82
FIGURA 37 - COMPARAÇÃO DOS ESPECTROS DE RMN DE <sup>13</sup> C DAS PRINCIPAIS FRAÇÕES DESPOLIMERIZADAS: LOCALIZAÇÃO DOS CARBONOS DAS UNIDADES DE 3,6-ANIDROGALACTITOL C-1 (63,2 ppm), C-2 (71,1 ppm), C-3 (83,5 ppm), C-4 (86,3 ppm), C-5 (75,3 ppm) E C-6 (73,0 ppm).....	89
FIGURA 38 - COMPARAÇÃO DOS ESPECTROS DE RMN DE <sup>13</sup> C DAS PRINCIPAIS FRAÇÕES DESPOLIMERIZADAS: REGIÃO ANOMÉRICA.....	90
FIGURA 39 - ESPECTROS DE RMN DE <sup>13</sup> C DAS FRAÇÕES NATIVA DSi-1 (ACIMA) E DESSULFATADA DSi-1D (ABAIXO): REGIÃO ANOMÉRICA.....	93
FIGURA 40 - ESPECTROS DE RMN DE <sup>13</sup> C DAS FRAÇÕES NATIVA DSi-1 (ACIMA) E DESSULFATADA DSi-1D (ABAIXO): REGIÃO DE ANEL. 94	94
FIGURA 41 - REPRESENTAÇÃO DAS POSSÍVEIS UNIDADES A LIGADAS ÀS EXTREMIDADES DE 3,6-ANIDRO- $\alpha$ -L-GALACTITOL NA GALACTANA DESPOLIMERIZADA DSi-1.....	96
FIGURA 42 - ESPECTRO DE HSQC DA GALACTANA NATIVA DSi-1 .....	98
FIGURA 43 - ESPECTRO DE HSQC DA GALACTANA DESSULFATADA DSi-1 . 99	99
FIGURA 44 - ESPECTROS DE RMN de <sup>1</sup> H DAS FRAÇÕES NATIVA DSi-1 (ACIMA) E DESSULFATADA DSi-1D (ABAIXO): REGIÃO $\alpha$ -ANOMÉRICA....	100
FIGURA 45 - ESPECTROS DE RMN DE <sup>1</sup> H DAS FRAÇÕES NATIVA DSi-1 (ACIMA) E DESSULFATADA DSi-1D (ABAIXO) .....	101
FIGURA 46 - ESPECTROS DE RMN DE <sup>13</sup> C DAS FRAÇÕES NATIVA DSi-2e (ACIMA) E DESSULFATADA DSi-2eD (ABAIXO): REGIÃO ANOMÉRICA.....	104
FIGURA 47 - ESPECTROS DE RMN DE <sup>13</sup> C DAS FRAÇÕES NATIVA DSi-2e (ACIMA) E DESSULFATADA DSi-2eD (ABAIXO): REGIÃO DE ANEL... ..	105

FIGURA 48 -ESPECTROS DE RMN DE $^1\text{H}$ DAS FRAÇÕES NATIVA DSi-2e (ACIMA) E DESSULFATADA DSi-2eD (ABAIXO): REGIÃO $\alpha$ -ANOMÉRICA.....	109
FIGURA 49 -ESPECTROS DE RMN DE $^1\text{H}$ DAS FRAÇÕES NATIVA DSi-2e (ACIMA) E DESSULFATADA DSi-2eD (ABAIXO).....	110
FIGURA 50 -ESPECTROS DE RMN DE $^{13}\text{C}$ DAS FRAÇÕES NATIVA DSi-3 (ACIMA) E DESSULFATADA DSi-3D (ABAIXO): REGIÃO ANOMÉRICA.....	113
FIGURA 51 -ESPECTROS DE RMN DE $^{13}\text{C}$ DAS FRAÇÕES NATIVA DSi-3 (ACIMA) E DESSULFATADA DSi-3D (ABAIXO): REGIÃO DE ANEL.....	114
FIGURA 52 -ESPECTROS DE RMN DE $^1\text{H}$ DAS FRAÇÕES NATIVA DSi-3 (ACIMA) E DESSULFATADA DSi-3D (ABAIXO): REGIÃO $\alpha$ -ANOMÉRICA....	117
FIGURA 53 -ESPECTROS DE RMN DE $^1\text{H}$ DAS FRAÇÕES NATIVA DSi-3 (ACIMA) E DESSULFATADA DSi-3D (ABAIXO) .....	118
FIGURA 54 - ESPECTRO DE RMN DE $^{13}\text{C}$ DA FRAÇÃO DSi-4 .....	121
FIGURA 55 - ESPECTRO DE RMN DE $^1\text{H}$ DA FRAÇÃO DSi-4 .....	124
FIGURA 56 -ESPECTRO DE HSQC DA REGIÃO ANOMÉRICA DA FRAÇÃO DSi-4 .....	125
FIGURA 57 - ESPECTRO DE RMN DE $^{13}\text{C}$ DA FRAÇÃO DSi-5 .....	127
FIGURA 58 - ESPECTRO DE RMN DE $^1\text{H}$ DA FRAÇÃO DSi-5 .....	129
FIGURA 59 -ESPECTRO DE HSQC DA REGIÃO ANOMÉRICA DA FRAÇÃO DSi-5 .....	130
FIGURA 60 -COMPARAÇÃO ENTRE OS VALORES DE MASSA MOLECULAR PONDERAL MÉDIA ( $M_w$ ) DAS GALACTANAS HOMOGÊNEAS DSi-1, DSi-2e, DSi-3, E NÃO HOMOGÊNEAS DSi-4* E DSi-5* .....	138
FIGURA 61 -RENDIMENTO PROPORCIONAL DAS FRAÇÕES DESPOLIMERIZADAS DSi-1, DSi-2e, DSi-3, DSi-4 E DSi-5 (5:2:3:2:1) OBTIDAS A PARTIR DA HRP DA FRAÇÃO POLISSACARÍDICA SS SOLÚVEL EM KCl 2M OBTIDA DE <i>C. seminervis</i> .....	141
FIGURA 62 -ESBOÇO DO PADRÃO DE CLIVAGEM (INDICADO PELAS SETAS) EM DIFERENTES PORÇÕES ESTRUTURAIS DE POLISSACARÍDEOS HIPOTÉTICOS PRESENTES NA FRAÇÃO SS ...	143

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - CLASSIFICAÇÃO DAS CARRAGENANAS DE ACORDO COM ESTRUTURAS IDEALIZADAS PARA AS DÍADES ENTRE UNIDADES A E B .....	5
TABELA 2 - CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS DE GALACTANAS EXTRAÍDAS DE ESPÉCIES DA ORDEM HALYMENIALES .....	13
TABELA 3 - DESLOCAMENTOS QUÍMICOS (ppm) DAS DÍADES PRESENTES NA GALACTANA DESPOLIMERIZADA CS (ZIBETTI et al., 2009).....	35
TABELA 4 - RENDIMENTO E ANÁLISES QUÍMICAS DAS FRAÇÕES SS E SP ....	60
TABELA 5 - COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES TRATADAS COM KCl.....	61
TABELA 6 - RENDIMENTO E ANÁLISES QUÍMICAS DA FRAÇÃO DSi.....	66
TABELA 7 - COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DA FRAÇÃO DSi .....	67
TABELA 8 - MASSA MOLECULAR PONDERAL MÉDIA (M <sub>w</sub> ) CALCULADA PARA AS FRAÇÕES HOMOGÊNEAS .....	76
TABELA 9 - RENDIMENTO E ANÁLISES QUÍMICAS DAS GALACTANAS DESPOLIMERIZADAS .....	77
TABELA 10 -COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS GALACTANAS DESPOLIMERIZADAS .....	79
TABELA 11 -RENDIMENTO E COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS GALACTANAS DESPOLIMERIZADAS OBTIDAS DO REFRACIONAMENTO DE DSi-2 .....	80
TABELA 12 -DETERMINAÇÃO DOS MONOSSACARÍDEOS NATURALMENTE METILADOS 3-O-METIL E 4-O-METILGALACTOSE .....	81
TABELA 13 -COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA E ANÁLISE ENANTIOMÉRICA DAS GALACTANAS DE <i>C. seminervis</i> .....	84
TABELA 14 -COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS GALACTANAS DESPOLIMERIZADAS HOMOGÊNEAS NATIVAS E DESSULFATADAS.....	85
TABELA 15 -CORRELAÇÕES PRESENTES NOS ESPECTROS DE HSQC DAS FRAÇÕES NATIVA DSi-1 E DESSULFATADA DSi-1D ATRIBUÍDAS ÀS UNIDADES DE 3,6-ANIDRO- $\alpha$ -L-GALACTITOL (LAGOH) LIGADAS A DIFERENTES UNIDADES A.....	96

TABELA 16 -PRINCIPAIS ASSINALAMENTOS DE DÍADES PRESENTES NAS GALACTANAS NATIVA DSi-1 E DESSULFATADA DSi-1D .....	102
TABELA 17 -CORRELAÇÕES PRESENTES NOS ESPECTROS DE HSQC DAS FRAÇÕES NATIVA DSi-2e E DESSULFATADA DSi-2eD ATRIBUÍDAS ÀS UNIDADES DE 3,6-ANIDRO- $\alpha$ -L-GALACTITOL (LAGOH) LIGADAS A DIFERENTES UNIDADES A.....	107
TABELA 18 -PRINCIPAIS ASSINALAMENTOS DE DÍADES PRESENTES NAS GALACTANAS NATIVA DSi-2e E DESSULFATADA DSi-2eD .....	111
TABELA 19 -CORRELAÇÕES PRESENTES NOS ESPECTROS DE HSQC DAS FRAÇÕES NATIVA DSi-3 E DESSULFATADA DSi-3D ATRIBUÍDAS ÀS UNIDADES DE 3,6-ANIDRO- $\alpha$ -L-GALACTITOL (LAGOH) LIGADAS A DIFERENTES UNIDADES A.....	116
TABELA 20 -PRINCIPAIS ASSINALAMENTOS DE DÍADES PRESENTES NAS GALACTANAS NATIVA DSi-3 E DESSULFATADA DSi-3D .....	119
TABELA 21 -ANÁLISE DE METILAÇÃO DAS GALACTANAS DESPOLIMERIZADAS DSi-1, DSi-1D, DSi-2e E DSi-2eD .....	132
TABELA 22 -AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL DAS GALACTANAS DE <i>C. seminervis</i> .....	146
TABELA 23 -DOSE EFETIVA PARA REDUZIR O TÍTULO VIRAL EM 50% (ED <sub>50</sub> ) E ÍNDICE DE SELETIVIDADE (IS) DAS GALACTANAS DE <i>C. seminervis</i> .....	147

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

4-MM	- 4-metil-morfolina
AP	- 1-amino-2-propanol
B 4-MM	- complexo borano 4-metil-morfolina
C2S-3	- galactana homogênea obtida da alga <i>Cryptonemia crenulata</i> por Zibetti et al., 2005. Refere-se a uma galactana isolada após extração a quente, solúvel em KCl 2M, eluída em cromatografia aniônica (DEAE-Sephacel) com solução de NaCl 1,0M
CC <sub>50</sub>	- concentração de polissacarídeo necessária para reduzir a viabilidade celular em 50%
Cl <sup>-</sup>	- íons cloreto
CLG	- cromatografia líquido-gasosa
CLG-EM	- cromatografia líquido-gasosa acoplada a espectrometria de massa
CMNT	- concentração máxima não tóxica
CS	- o despolimerizado CS resulta do processo de despolimerização parcial da galactana homogênea S2S-3 biossintetizada por <i>Cryptonemia seminervis</i> com 0,375M de TFA a 65°C por 6h na presença de agente redutor
DEAE-Sephacel	- matriz de troca aniônica fraca à base de celulose sendo que o grupo trocador é o dietilaminoetil
DMSO	- dimetilsulfóxido
DO	- densidade óptica
DS	- produtos de hidrólise redutiva parcial da fração polissacarídica SS
DSi	- fração retida na diálise da fração DS em membrana de 6 a 8 kDa
DSi-1	- fração eluída com solução de NaCl 0,25M durante o fracionamento cromatográfico da fração DSi em DEAE-Sephacel
DSi-2	- fração eluída com solução de NaCl 0,50M durante o fracionamento cromatográfico da fração DSi em DEAE-Sephacel
DSi-2a	- fração eluída com solução de NaCl 0,10M durante o fracionamento cromatográfico da fração DSi-2 em DEAE-Sephacel
DSi-2b	- fração eluída com solução de NaCl 0,20M durante o fracionamento cromatográfico da fração DSi-2 em DEAE-Sephacel



DSi-2c	- fração eluída com solução de NaCl 0,30M durante o fracionamento cromatográfico da fração DSi-2 em DEAE-Sephacel
DSi-2d	- fração eluída com solução de NaCl 0,40M durante o fracionamento cromatográfico da fração DSi-2 em DEAE-Sephacel
DSi-2e	- fração eluída com solução de NaCl 0,50M durante o fracionamento cromatográfico da fração DSi-2 em DEAE-Sephacel
DSi-2f	- fração eluída com solução de NaCl 0,60M durante o fracionamento cromatográfico da fração DSi-2 em DEAE-Sephacel
DSi-2g	- fração eluída com solução de NaCl 0,70M durante o fracionamento cromatográfico da fração DSi-2 em DEAE-Sephacel
DSi-2h	- fração eluída com solução de NaCl 1,0M durante o fracionamento cromatográfico da fração DSi-2 em DEAE-Sephacel
DSi-2w	- fração eluída com água durante o fracionamento cromatográfico da fração DSi-2 em DEAE-Sephacel
DSi-3	- fração eluída com solução de NaCl 0,75M durante o fracionamento cromatográfico da fração DSi em DEAE-Sephacel
DSi-4	- fração eluída com solução de NaCl 1,0M durante o fracionamento cromatográfico da fração DSi em DEAE-Sephacel
DSi-5	- fração eluída com solução de NaCl 1,50M durante o fracionamento cromatográfico da fração DSi em DEAE-Sephacel
DSi-w	- fração eluída com água durante o fracionamento cromatográfico da fração DSi em DEAE-Sephacel
DSo	- fração correspondente a água de diálise da fração DS dialisada em membrana de diálise (6 a 8 kDa)
ED <sub>50</sub>	- dose efetiva (concentração de polissacarídeo) capaz de causar 50% de inibição viral
HPSEC-MALLS-IR	- sigla em inglês para cromatografia de exclusão estérica de alta pressão (HPSEC) acoplada a detector de índice de refração (IR) diferencial e espalhamento de luz em multiângulos (MALLS)
HSV-1	- vírus Herpes simplex tipo 1
HSV-2	- vírus Herpes simplex tipo 2
ICH <sub>3</sub>	- iodometano
IS	- índice de seletividade (CC <sub>50</sub> /ED <sub>50</sub> )
KCl	- cloreto de potássio

MBA	- $\alpha$ -metilbenzilamina
MEM	- meio mínimo essencial de Eagle
$M_w$	- massa molecular ponderal média
$\text{NaBD}_4$	- boroidreto de sódio deuterado
$\text{NaBH}_4$	- boroidreto de sódio
$\text{NaCl}$	- cloreto de sódio
$\text{NaN}_3$	- azida de sódio
$\text{NaNO}_3$	- nitrito de sódio
$\text{NaOH}$	- hidróxido de sódio
$\text{NaSO}_3$	- sulfito de sódio
PI	- porcentagem de inibição viral
S	- fração polissacarídica bruta extraída da alga <i>Cryptonemia seminervis</i>
S2S-3	- galactana homogênea obtida da alga <i>Cryptonemia seminervis</i> por Zibetti et al., 2009. Refere-se a uma galactana isolada após extração a quente, solúvel em KCl 2M, eluída em cromatografia aniônica (DEAE-Sephacel) com solução de NaCl 0,75M
S2S-4	- galactana homogênea obtida da alga <i>Cryptonemia seminervis</i> por Zibetti et al., 2009. Refere-se a uma galactana isolada após extração a quente, solúvel em KCl 2M, eluída em cromatografia aniônica (DEAE-Sephacel) com solução de NaCl 1,0M
SFB	- soro fetal bovino
SP	- refere-se à fração precipitada com KCl 2M após tratamento da fração polissacarídica bruta S extraída da alga <i>Cryptonemia seminervis</i>
SS	- refere-se à fração solúvel em KCl 2M após tratamento da fração polissacarídica bruta S extraída da alga <i>Cryptonemia seminervis</i>
TFA	- ácido trifluoracético

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>2</b>
2.1 ALGAS VERMELHAS .....	2
2.2 GALACTANAS SULFATADAS DE ALGAS VERMELHAS .....	3
2.2.1 GALACTANAS DO TIPO CARRAGENANA .....	3
2.2.2 GALACTANAS DO TIPO AGARANA .....	6
2.2.3 GALACTANAS DO TIPO DL-HÍBRIDA .....	7
2.3 RELEVÂNCIA ECONÔMICA DAS GALACTANAS .....	9
2.4 ALGAS PRODUTORAS DE GALACTANAS DL-HÍBRIDAS .....	11
2.4.1 GALACTANAS DL-HÍBRIDAS PRODUZIDAS POR <i>C. seminervis</i> .....	14
2.5 DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL EM GALACTANAS DL-HÍBRIDAS .....	16
2.5.1 ANÁLISE DE METILAÇÃO .....	17
2.5.2 DETERMINAÇÃO DA CONFIGURAÇÃO ABSOLUTA .....	20
2.5.3 O PAPEL DOS OLIGOSSACARÍDEOS .....	24
2.5.3.1 METANÓLISE PARCIAL .....	25
2.5.3.2 HIDRÓLISE ÁCIDA PARCIAL CONVENCIONAL .....	26
2.5.3.3 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA .....	28
2.5.3.4 HIDRÓLISE REDUTIVA PARCIAL .....	29
2.6 ATIVIDADE BIOLÓGICA DE GALACTANAS .....	36
<b>3 JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>41</b>
<b>4 OBJETIVOS</b> .....	<b>42</b>
4.1 OBJETIVO GERAL .....	42
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	42
<b>5 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>43</b>
5.1 MATERIAL BIOLÓGICO .....	43
5.2 EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS .....	43
5.3 TRATAMENTO DOS POLISSACARÍDEOS .....	43
5.4 MÉTODOS ANALÍTICOS GERAIS .....	44
5.4.1 DOSAGEM DE AÇÚCAR TOTAL .....	44
5.4.2 DOSAGEM DE PROTEÍNAS TOTAIS .....	44
5.4.3 DOSAGEM DE SULFATO .....	45
5.4.4 DETERMINAÇÃO DA ROTAÇÃO ÓPTICA .....	45
5.5 HIDRÓLISES .....	46
5.5.1 HIDRÓLISE ÁCIDA TOTAL .....	46
5.5.2 HIDRÓLISE ÁCIDA TOTAL DO TIPO REDUTIVA .....	46
5.5.3 HIDRÓLISE REDUTIVA PARCIAL .....	47
5.6 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS .....	47

5.6.1	FRACIONAMENTO DAS GALACTANAS OBTIDAS POR HIDRÓLISE REDUTIVA PARCIAL.....	47
5.6.2	CROMATOGRAFIA LÍQUIDO-GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSA (CLG-EM).....	48
5.6.3	CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO ESTÉRICA DE ALTA PRESSÃO (HPSEC) ACOPLADA A DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO (IR) DIFERENCIAL E ESPALHAMENTO DE LUZ EM MULTIÂNGULOS (MALLS) .	49
5.7	DETERMINAÇÃO DA CONFIGURAÇÃO ABSOLUTA .....	49
5.8	DESSULFATAÇÃO POR TRATAMENTO SOLVOLÍTICO .....	50
5.8.1	PREPARO DO SAL DE PIRIDÔNIO.....	50
5.8.2	SOLVÓLISE.....	50
5.9	ANÁLISE DE METILAÇÃO .....	51
5.9.1	PREPARO DO SAL DE TRIETILAMÔNIO.....	51
5.9.2	METILAÇÃO E DERIVATIZAÇÃO .....	51
5.10	RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN).....	52
5.10.1	TÉCNICAS DE RMN MONODIMENSIONAIS.....	52
5.10.1.1	RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE CARBONO-13 (RMN DE <sup>13</sup> C).....	52
5.10.1.2	RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE CARBONO-13 DEPT ( <i>Distortionless Enhancement by Polarization</i> ) .....	52
5.10.1.3	RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE HIDROGÊNIO (RMN DE <sup>1</sup> H).....	53
5.10.2	TÉCNICAS DE RMN BIDIMENSIONAIS.....	53
5.10.2.1	COSY ( <i>Correlation Spectroscopy</i> ).....	53
5.10.2.2	HSQC ( <i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i> ).....	54
5.11	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-HSV DAS GALACTANAS DE <i>C. seminervis</i> .....	54
5.11.1	CÉLULAS.....	54
5.11.2	VÍRUS .....	54
5.11.3	TITULAÇÃO VIRAL.....	55
5.11.4	CITOTOXICIDADE.....	55
5.11.4.1	VERIFICAÇÃO DA ALTERAÇÃO DA MORFOLOGIA CELULAR ....	55
5.11.4.2	VERIFICAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR.....	56
5.11.5	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL.....	56
5.11.5.1	REDUÇÃO DO TÍTULO VIRAL.....	56
5.11.5.2	CINÉTICA DE INIBIÇÃO VIRAL .....	57
<b>6</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>58</b>
6.1	OBTENÇÃO E ANÁLISE DOS POLISSACARÍDEOS DE <i>C. seminervis</i> .....	58
6.1.1	EXTRAÇÃO E OBTENÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS .....	58
6.1.2	TRATAMENTO DA FRAÇÃO S COM KCl 2M .....	59
6.1.3	ANÁLISES QUÍMICAS DAS FRAÇÕES SS E SP .....	60
6.1.4	COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES SS E SP.....	61
6.1.5	ESPECTROSCOPIA DE RMN DA FRAÇÃO SS .....	62

6.2	HIDRÓLISE REDUTIVA PARCIAL DA FRAÇÃO SS: OBTENÇÃO DA FRAÇÃO DSi.....	64
6.2.1	ANÁLISES QUÍMICAS DA FRAÇÃO DSi .....	65
6.2.2	COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DA FRAÇÃO DSi.....	67
6.2.3	ESPECTROSCOPIA DE RMN DA FRAÇÃO DSi .....	68
6.2.4	ANÁLISE POR HPSEC-MALLS-IR DA FRAÇÃO DSi.....	70
6.3	FRACIONAMENTO DAS GALACTANAS DESPOLIMERIZADAS .....	71
6.3.1	ANÁLISE POR HPSEC-MALLS-IR DAS GALACTANAS DESPOLIMERIZADAS.....	73
6.4	ANÁLISE ESTRUTURAL DAS GALACTANAS DESPOLIMERIZADAS .....	76
6.4.1	GALACTANAS DESPOLIMERIZADAS: ANÁLISES QUÍMICAS.....	77
6.4.2	GALACTANAS DESPOLIMERIZADAS: COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA.....	79
6.4.3	GALACTANAS DESPOLIMERIZADAS: ANÁLISE ENANTIOMÉRICA.....	83
6.4.4	DESSULFATAÇÃO DAS GALACTANAS DESPOLIMERIZADAS .....	85
6.5	ESPECTROSCOPIA DE RMN DAS GALACTANAS DESPOLIMERIZADAS: ASPECTOS GERAIS.....	86
6.6	ESPECTROSCOPIA DE RMN DAS GALACTANAS DESPOLIMERIZADAS: ANÁLISES MONO E BIDIMENSIONAIS.....	91
6.6.1	ANÁLISES ESPECTROSCÓPICAS DE DSi-1 E DSi-1D.....	91
6.6.2	ANÁLISES ESPECTROSCÓPICAS DE DSi-2e E DSi-2eD.....	103
6.6.3	ANÁLISES ESPECTROSCÓPICAS DE DSi-3 E DSi-3D.....	112
6.6.4	ANÁLISES ESPECTROSCÓPICAS DE DSi-4.....	120
6.6.5	ANÁLISES ESPECTROSCÓPICAS DE DSi-5.....	125
6.7	ANÁLISE DE METILAÇÃO DAS GALACTANAS DESPOLIMERIZADAS NATIVAS DSi-1 E DSi-2e E DESSULFATADAS DSi-1D E DSi-2eD .....	131
6.8	CLIVAGEM DAS GALACTANAS DE <i>C.semivevis</i> POR HIDRÓLISE REDUTIVA PARCIAL .....	137
6.9	ATIVIDADE ANTI-HSV DAS GALACTANAS DE <i>C. seminervis</i> .....	144
6.9.1	TESTE DE CITOTOXICIDADE DAS GALACTANAS DE <i>C. seminervis</i> S2S-4, SS, DSi, DSi-1, DSi-2e E DSi-3 .....	144
6.9.2	TESTE DE ATIVIDADE ANTIVIRAL DAS GALACTANAS SULFATADAS CONTRA HSV-1 E HSV-2 .....	145
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>150</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>151</b>

## 1 INTRODUÇÃO

As algas são, possivelmente, os organismos mais antigos na história evolutiva do planeta (PAINTER, 1983). A divisão Rhodophyta, que inclui a maioria das algas vermelhas, contempla quase 25% de todos os táxons classificados como algas (ALGAE BASE, 2010), compondo um nível taxonômico de ampla biodiversidade, a qual se reflete nos compostos produzidos por suas espécies.

A utilização de algas como alimento é relatada desde os séculos IV, no Japão, e VI, na China (McHUGH, 2003). Dentre os diversos usos que o ser humano atribui às algas vermelhas, destaca-se a extração de hidrocolóides empregados em vários setores industriais e biotecnológicos, sendo as agaranas e carragenanas os mais valorizados comercialmente. Na Irlanda há relatos da extração de ficocolóides a partir de algas vermelhas desde o século XIX (CAMPO et al., 2009).

Polímeros obtidos de fontes naturais são gradativamente mais valorizados por representarem uma nova categoria de materiais ambientalmente seguros para se explorar as aplicações (ŠIMKOVIC, 2008).

A comercialização de produtos derivados de algas movimentam bilhões de dólares por ano. O setor das indústrias alimentícias contribui com grande parcela deste mercado, pois carragenanas e agaranas apresentam propriedades geleificantes e viscosantes essenciais para o processamento de alimentos (McHUGH, 2003; CAMPO et al., 2009).

Estes polissacarídeos tão apreciados economicamente são polímeros de galactose substituídos por uma grande variedade de grupamentos químicos, que originam compostos extremamente interessantes do ponto de vista biotecnológico.

As galactanas sulfatadas, como são chamados estes polímeros, também se destacam como compostos bioativos, capazes de suprir necessidades atuais de novas drogas para o tratamento de diversas doenças. Deste modo, a caracterização química detalhada destes ficocolóides mostra-se fundamental nos avanços biotecnológicos.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 ALGAS VERMELHAS

Algas vermelhas estão distribuídas principalmente no ambiente marinho, alcançando maior diversidade em regiões tropicais (RAVEN et al., 2001). Elas compõem um grupo taxonômico polifilético de origem evolutiva muito antiga. As espécies distribuídas nas seis classes do filo Rhodophyta, pertencem ao reino Plantae e constituem a grande maioria dos táxons deste filo (ALGAE BASE, 2010). A química de carboidratos de algas vermelhas contempla, em sua maioria, as macrófitas marinhas pertencentes às ordens Ceramiales, Gelidiales, Gigartinales, Gracilariales, Halymeniales, Plocamiales e Rhodymeniales, contidas na classe Florideophyceae que abriga 5.879 espécies.

As paredes celulares da maioria das algas vermelhas incluem um componente interno rígido, que consiste em microfibrilas de polissacarídeos, e uma camada externa mucilaginosa composta geralmente por galactanas sulfatadas, polímeros sulfatados de galactose (RAVEN et al., 2001; PAINTER, 1983).

A flexibilidade e textura escorregadia características das algas vermelhas são decorrentes desta camada mucilaginosa, a qual auxilia na redução da colonização da superfície por organismos oportunistas e reduz a exposição à luz solar. Esta matriz polissacarídica pode estar envolvida com a regulação mecânica, osmótica ou iônica das algas, garantindo a adaptação ao meio marinho, pois polissacarídeos sulfatados não são observados em plantas terrestres e em algas de água doce (KLOAREG e QUATRANO, 1988; RAVEN et al., 2001).

As galactanas sulfatadas apresentam carboidratos singulares com diversos padrões de substituição: éter de metil, éster de sulfato, acetal de ácido pirúvico e glicosilações (PAINTER, 1983; ZIBETTI et al., 2009).

As algas vermelhas também produzem polissacarídeo de reserva, o “amido das florídeas”, que consiste num polímero de  $\alpha$ -D-glucose com ligações glicosídicas  $\alpha(1\rightarrow4)$  e pontos de ramificação em C-6 (PAINTER, 1983).

Além do interesse industrial e biomédico, a determinação da estrutura química de galactanas sulfatadas também pode ser utilizada a fim de esclarecer a posição taxonômica das algas vermelhas, adicionando-se a quimiotaxonomia aos critérios clássicos de morfologia, anatomia e ciclo de vida das algas (USOV, 1998).

## 2.2 GALACTANAS SULFATADAS DE ALGAS VERMELHAS

A estrutura das galactanas está fundamentada em cadeias lineares de resíduos de  $\beta$ -D-galactopiranosose ligados glicosidicamente através das posições 1 e 3 (unidades A) e resíduos de  $\alpha$ -galactopiranosose ligados glicosidicamente através das posições 1 e 4 (unidades B), formando um arranjo alternado de unidades A e B  $(AB)_n$  (Figura 1), as quais são denominadas díades. As unidades A podem apresentar substituições por grupos éster de sulfato e/ou metil em C-2, C-4 ou C-6, além de acetal de ácido pirúvico e algumas vezes outros monossacarídeos. As unidades B podem estar ciclizadas formando unidades de 3,6-anidrogalactose ou substituídas em C-2, C-3 e C-6 por grupos sulfato e/ou metil (PAINTER, 1983; USOV, 1998).

Portanto, apesar da estrutura básica repetitiva, as galactanas apresentam grande diversidade estrutural, devido aos diferentes tipos de substituintes na cadeia principal, o que origina moléculas complexas (PAINTER, 1983).

As galactanas podem ser divididas em grupos conforme a configuração enantiomérica das unidades B ( $\alpha$ -galactopiranosose). Estas unidades podem ser pertencentes às séries estereoquímicas L-, D- ou L- e D- na mesma molécula, caracterizando o grupo das agaranas, carragenanas e galactanas do tipo DL-híbridas, respectivamente.

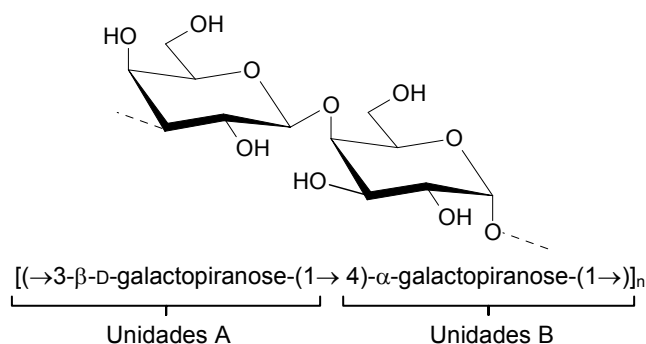


FIGURA 1 - ESTRUTURA BÁSICA REPETITIVA DAS GALACTANAS

### 2.2.1 GALACTANAS DO TIPO CARRAGENANA

As carragenanas são organizadas em unidades alternantes de  $(1\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-galactopiranosose}$  (unidade A) e  $(1\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-galactopiranosose}$  (unidade B) (Figura 2). A



unidade B pode ser encontrada na forma totalmente ciclizada de 3,6-anidro- $\alpha$ -D-galactose, ou ainda na sua forma precursora de anidro-açúcar  $\alpha$ -D-galactose 6-sulfato. Geralmente as carragenanas apresentam uma alta porcentagem de grupos sulfato e uma baixa porcentagem de grupos O-metil naturais (PAINTER, 1983).

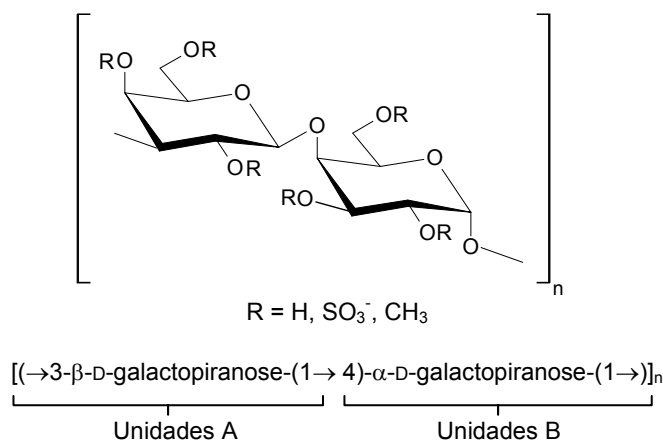


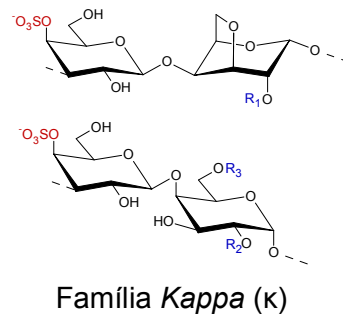
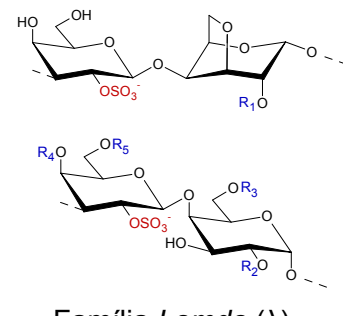
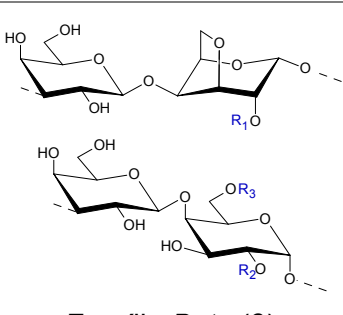
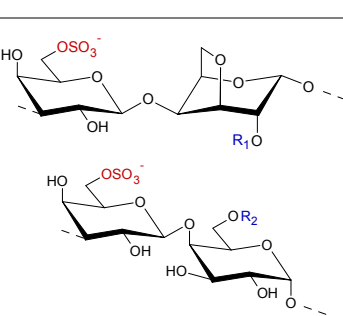
FIGURA 2 - ESTRUTURA BÁSICA REPETITIVA DE CARRAGENANAS

As carragenanas podem ser classificadas de acordo com a posição dos grupos sulfato, além da presença de 3,6-anidro- $\alpha$ -D-galactose. Rees (1963) introduziu um sistema de nomenclatura que associa letras gregas a unidades ideais que se repetem nas carragenanas, de maneira a dividir as carragenanas em quatro famílias: *kappa* ( $\kappa$ ), *lambda* ( $\lambda$ ), *omega* ( $\omega$ ) e *beta* ( $\beta$ ) e alguns subtipos (Tabela 1). No entanto, na natureza, estas famílias de carragenanas podem ocorrer em forma de estruturas híbridas, onde díades das diferentes famílias intercalam-se formando uma cadeia de carragenana com proporções características de *kappa*- e *iota*-carragenanas, por exemplo (PAINTER, 1983).

Esta nomenclatura baseada em letras gregas mantém-se relevante na classificação e estudos estruturais e na comercialização de carragenanas, visto que os polissacarídeos de cada família são obtidos de diferentes fontes dentre as algas produtoras de carragenanas, conhecidas como carragenófitas (CAMPO et al., 2009).

A diversidade de substituintes que modificam as estruturas idealizadas das carragenanas aponta a variabilidade e a complexidade estrutural destes biopolímeros, por isso Knutzen et al. (1994) propuseram uma nomenclatura que simplifica a denominação das díades ideais (Tabela 1).

TABELA 1 - CLASSIFICAÇÃO DAS CARRAGENANAS DE ACORDO COM ESTRUTURAS IDEALIZADAS PARA AS DÍADES ENTRE UNIDADES A E B<sup>1</sup>

Estrutura	Subtipo	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	Díade <sup>2</sup>
 <p>Família <i>Kappa</i> (<math>\kappa</math>)</p>	<i>Kappa</i> ( $\kappa$ )	H	-	-			G4S-DA
	<i>Iota</i> ( $\iota$ )	SO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	-	-			G4S-DA2S
	<i>Mu</i> ( $\mu$ )	-	H	SO <sub>3</sub> <sup>-</sup>			G4S-D6S
	<i>Nu</i> ( $\nu$ )	-	SO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	SO <sub>3</sub> <sup>-</sup>			G4S-D2S,6S
	<i>Omicron</i> ( $\omicron$ )	-	SO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	H			G4S-D2S
 <p>Família <i>Lambda</i> (<math>\lambda</math>)</p>	<i>Lambda</i> ( $\lambda$ )	-	SO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	SO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	H	H	G2S-D2S,6S
	<i>Xi</i> ( $\xi$ )	-	SO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	H	H	H	G2S-D2S
	<i>Pi</i> ( $\pi$ )	-	SO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	H	Pir. <sup>3</sup>	Pir.	GP2S-D2S
	<i>Theta</i> ( $\theta$ )	SO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	-	-	-	-	G2S-DA2S
 <p>Família <i>Beta</i> (<math>\beta</math>)</p>	<i>Beta</i> ( $\beta$ )	H	-	-			G-DA
	<i>Alfa</i> ( $\alpha$ )	SO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	-	-			G-DA2S
	<i>Gamma</i> ( $\gamma$ )	-	H	SO <sub>3</sub> <sup>-</sup>			G-D6S
	<i>Delta</i> ( $\delta$ )	-	SO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	SO <sub>3</sub> <sup>-</sup>			G-D2S,6S
 <p>Família <i>Omega</i> (<math>\omega</math>)</p>	<i>Omega</i> ( $\omega$ )	H	-				G6S-DA
	<i>Psi</i> ( $\psi$ )	-	SO <sub>3</sub> <sup>-</sup>				G6S-D6S

<sup>1</sup> Modificado de KNUTSEN *et al.* (1994) e DUCATTI (2005).

<sup>2</sup> Nomenclatura proposta por Knutsten *et al.*, 1994.

<sup>3</sup> Pir. = substituição por ácido pirúvico.

## 2.2.2 GALACTANAS DO TIPO AGARANA

As galactanas do tipo agarana apresentam a cadeia principal formada por unidades de (1→3)-β-D-galactopiranosose (unidade A) e (1→4)-α-L-galactopiranosose (unidade B), assim diferem das carragenanas na estereoquímica da unidade B. Da mesma maneira como nas carragenanas a unidade B pode estar na forma do seu derivado ciclizado 3,6-anidrogactose (Figura 3) (PAINTER, 1983).

Em meados da década de 50, acreditava-se que as agaranas eram misturas de um polissacarídeo neutro, a agarose, representada por sequências repetidas de [→3]β-D-galactose(1→4)α-L-3,6-anidrogactose(1→] e agaropectina, que seria formada pelas mesmas unidades da agarose, porém suas unidades B poderiam estar substituídas por grupamentos éster de sulfato ou ainda constituídas por D-galactopiranosose substituídas por acetal de ácido pirúvico. Porém, na década de 70, com auxílio de técnicas mais elaboradas, as características das agaranas puderam ser descritas de maneira mais eficaz, porém sua classificação não é tão marcante como nas carragenanas (DUCKWORTH e YAPHE, 1971).

Algumas agaranas com estrutura clássica repetitiva, como a agarose, podem ser obtidas de fontes naturais, contudo a maioria das espécies de algas biossintetizam agaranas com grande dispersão estrutural, de maneira que esta classificação não é eficaz. Agarose é o único termo desta classificação que possui um significado químico correspondente (USOV, 1998).

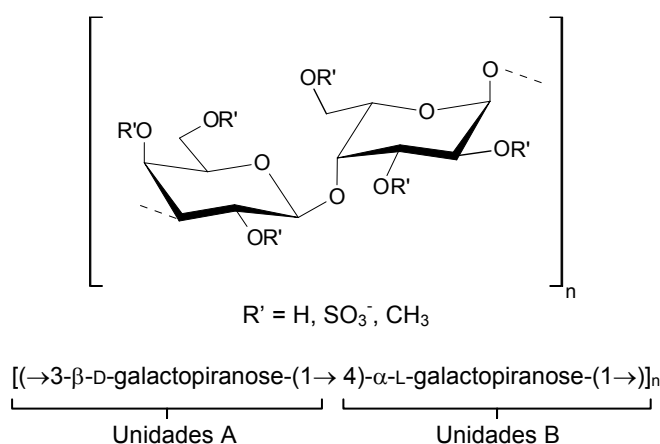


FIGURA 3 - ESTRUTURA BÁSICA REPETITIVA DAS AGARANAS

A agarose representada pela repetição da díade [ $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-galactose-(1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -L-3,6-anidrogalactose-(1 $\rightarrow$ )] é a agarana de maior valor comercial devido a sua capacidade de geleificação. Elevados teores de 3,6-anidrogalactose adicionados de baixos teores de sulfato são essenciais para esta capacidade. Portanto, a presença de grupos substituintes na estrutura da agarose modifica as propriedades deste ficocolóide diminuindo o poder de geleificação e conseqüentemente seu valor comercial (USOV, 1998; McHUGH, 2003).

Agaranas extraídas de algas vermelhas do gênero *Porphyra*, denominadas porfiranas, constituem polissacarídeos sulfatados que possuem unidades alternantes de resíduos de [ $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-galactose-(1 $\rightarrow$ )] e [ $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -L-galactose-(1 $\rightarrow$ )] ou seus derivados, os quais contêm grupos sulfato apenas no C-6 da unidade B, ou ainda grupamentos éter de metil em C-6 das unidades A (NOSEDA et al., 2000).

### 2.2.3 GALACTANAS DO TIPO DL-HÍBRIDA

Algumas ordens do filo Rhodophyta possuem algas que biossintetizam galactanas com estruturas intermediárias às agaranas e carragenanas como polissacarídeo majoritário. Estas estruturas têm sido descritas principalmente entre espécies dos gêneros *Grateloupia*, *Halymenia*, *Pachymenia*, *Phyllymenia* e *Aeodes* na ordem Halymeniales (ZIBETTI et al., 2005). O termo carrágar era utilizado informalmente para denominar tais estruturas mistas (CHOPIN et al., 1999), porém para diferenciar do termo híbrido aceito para as carragenanas, Stortz e Cerezo (2000) adotaram o termo galactana DL-híbrida.

As galactanas DL-híbridas apresentam unidades B pertencentes a diferentes configurações enantioméricas na mesma molécula (Figura 4) e podem ser divididas de acordo com a proporção destas unidades pertencentes a série enantiomérica D- ou L-, em DL-híbrida com um predomínio da estrutura de carragenana e DL-híbrida com um predomínio da estrutura de agarana.

Estas galactanas começaram a ser relatadas em maior freqüência na década de 90, desde então aumenta o número de espécies descritas como produtoras deste tipo de galactana (ZIBETTI, 2005). Isto se deve, possivelmente, aos avanços nas metodologias utilizadas para a análise estrutural de polissacarídeos, principalmente

ao que diz respeito aos estudos em enantiomericidade (ERREA et al., 1998; NAVARRO e STORTZ, 2003).

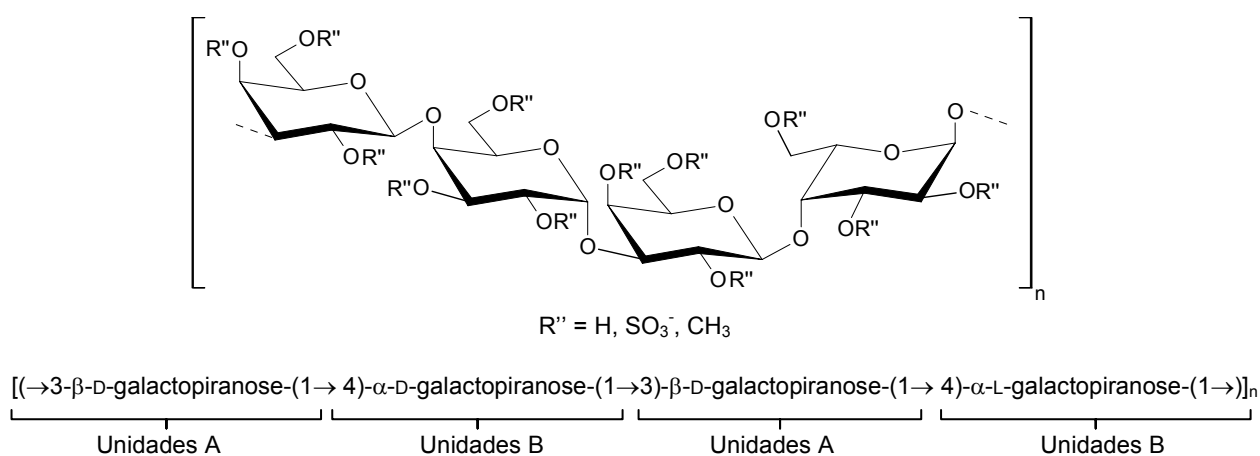


FIGURA 4 - ESTRUTURA BÁSICA REPETITIVA DE UMA GALACTANA DO TIPO DL-HÍBRIDA

O conceito de galactanas DL-híbridas deriva da constatação de galactanas que não correspondem a estruturas “puras” de carragenanas ou agaranas quando submetidas a análise da configuração absoluta. Porém este caráter híbrido também pode ser devido a falta de técnicas que possibilitem a separação de polissacarídeos enantiômeros (ZIBETTI et al., 2009).

Uma metodologia auxiliar no isolamento de galactanas DL-híbridas baseia-se nas propriedades de formação de géis em cadeias regulares de estruturas de *kappaliota*-carragenanas na dependência de interações específicas com o íon potássio. Neste caso, sistemas de galactanas DL-híbridas que contenham cadeias de *kappaliota*-carragenanas precipitam, enquanto cadeias de *mulnu*-carragenanas permanecem solúveis, juntamente com agaranas e cadeias DL-híbridas com estruturas predominantes de agaranas (agaranas DL-híbridas), na fração solúvel em cloreto de potássio na concentração de 2M (ESTEVEZ et al., 2001).

Supõe-se que uma molécula de galactana DL-híbrida apresenta-se em blocos de agaranas e carragenanas, onde um bloco de díades com unidades B na configuração L- liga-se com outro de configuração D-, formando zonas de junção na molécula. Desta forma, estas zonas irregulares apresentam-se mais suscetíveis à quebra hidrolítica, o que acaba por render baixíssimas quantidades de oligossacarídeos DL-híbridos (ESTEVEZ et al., 2001; STORTZ e CERESO, 2000).

Estudos de enantiomericidade correspondem ao principal método de confirmação do caráter híbrido destes biopolímeros, de forma a determinar a configuração predominante no polissacarídeo, caracterizando-o como galactana DL-híbrida com predomínio de agarana ou carragenana (STORTZ e CERREZO, 2000).

### 2.3 RELEVÂNCIA ECONÔMICA DAS GALACTANAS

As galactanas sulfatadas que compõem os ficocolóides extraídos de algas vermelhas apresentam propriedades geleificantes e viscosantes em sistemas aquosos (McHUGH, 2003; CAMPO et al., 2009).

As agaranas são utilizadas como agentes geleificantes em alimentos processados, cosméticos e produtos farmacêuticos. As algas dos gêneros *Gelidium* e *Gracilaria* são as principais fontes para extração de ágar. Espécies de *Gelidium* proporcionam ágar de alta qualidade, medida pela força do gel. As algas do gênero *Gracilaria* eram consideradas impróprias para produção de ágar. Porém com o advento do tratamento alcalino na década de 50 a indústria do ágar teve considerável expansão. A adição de soluções básicas durante a extração do ágar permite maior rendimento em unidades 3,6-anidrogalactosídicas a partir de suas unidades precursoras como  $\alpha$ -galactose 6-sulfato e  $\alpha$ -galactose 2,6-disulfato, de forma que a força do gel é aprimorada (McHUGH, 2003; ZIBETTI et al., 2005).

As carragenanas são amplamente utilizadas na indústria devido a suas propriedades espessantes, geleificantes e estabilizantes. Tais efeitos permitem o melhoramento da textura de alimentos e controle da viscosidade. São capazes de estabilizar preparações para pasta de dentes e absorver fluidos corporais quando utilizados na fabricação de curativos. Também podem ser utilizados como excipientes na fabricação de formas farmacêuticas, devido a sua boa compressibilidade, alta robustez e viscoelasticidade persistente durante a produção do comprimido (CAMPO et al., 2009).

A capacidade de agaranas e carragenanas formarem géis e soluções viscosas é relacionada com a conformação estrutural do polissacarídeo: razão molar entre unidades de 3,6-anidrogalactose e galactose, bem como a presença de grupos sulfato (USOV, 1998; USOV e KLOCHKOVA, 1992).

Unidades monossacarídicas de 3,6-anidrogactopirranose são encontradas somente em galactanas de algas vermelhas, o que as distingue dos demais polissacarídeos produzidos por outros vegetais. As unidades anidrogactosídicas são formadas naturalmente na alga através da atividade da enzima sulfidrolase a partir de unidades precursoras (USOV, 1984; WONG e CRAIGIE, 1978).

A ciclização das unidades precursoras de 3,6-anidrogactose também pode ocorrer em condições alcalinas e presença de temperatura, processo conhecido como tratamento alcalino (ZIBETTI et al., 2005; CIANCIA et al., 1993; NOSEDA e CERZO, 1995; VIANA et al., 2004). Quando há unidades precursoras, estas podem ser ciclizadas de forma que: (1) ocorre ionização do grupo hidroxila em C-3, produzindo a repulsão do oxigênio equatorial em C-3 e do sulfato em C-6 (e do sulfato em C-2 quando a unidade precursora for  $\alpha$ -gactose 2,6-disulfato), e conseqüentemente, a desestabilização da conformação  ${}^4C_1$  da unidade; (2) a mudança para a conformação  ${}^1C_4$  ocorre numa tentativa de posicionar os grupos em C-3 e C-6 (e C-2) o mais distante possível; nesta configuração o oxigênio em C-3 e o sulfato em C-6 estão em posição paralela axial; (3) então ocorre uma reação de substituição nucleofílica bimolecular ( $S_N2$ ), em que o grupo sulfato em C-6 é liberado num processo de eliminação seguido pela formação do anel 3,6-anidro, com a perda de uma molécula de água; (4) finalmente toda a molécula reacomoda-se. Portanto, a força direcional para este processo é a ionização do grupo hidroxila em C-3 de unidades precursoras, o que é proporcionado por temperatura e meio básico (CIANCIA et al., 1993; NOSEDA e CERZO, 1995).

Estudos analíticos da cinética da reação de ciclização permitem adicionar informações importantes para que os processos industriais sejam otimizados, visto que a proporção de unidades 3,6-anidrogactosídicas é relacionada ao poder geleificante dos polissacarídeos.

O estudo das reações de ciclização durante o tratamento alcalino também auxilia na caracterização estrutural das galactanas, de forma que permite quantificar as unidades precursoras de 3,6-anidrogactose e inferir a presença de grupos substituintes, os quais alteram os tempos de reação (CIANCIA et al., 1993; NOSEDA e CERZO, 1995; VIANA et al., 2004).

## 2.4 ALGAS PRODUTORAS DE GALACTANAS DL-HÍBRIDAS

As ordens Rhodymeniales e Halymeniales destacam-se pela produção de galactanas DL-híbridas.

Oligossacarídeos obtidos da alga *Lomentaria catenata* (Lomentariaceae, Rhodymeniales) indicam a co-existência de estruturas de agarose e carragenana. Uma das frações possui razão agarose:carragenana de 1:1,7, o que aponta para uma galactana DL-híbrida com predomínio de agarana (TAKANO et al., 1994).

A extinta ordem Cryptonemiales somada à ordem Gigartinales compreendiam 60% das famílias da divisão Rhodophyta, sendo difícil a diferenciação dentre espécies das duas ordens.

Os dados moleculares do seqüenciamento do gene do rRNA 18S de espécies representantes da ordem Cryptonemiales (famílias Dumontiaceae, Endocladaceae, Halymeniaceae e Kallymeniaceae) e da ordem Gigartinales (famílias de Mychodeaceae, Phyllophoraceae, Schizymeniaceae e Sebdeniaceae) permitiram validar a junção taxonômica da ordem Cryptonemiales à ordem Gigartinales. As famílias excluídas do agrupamento, passaram a formar a ordem Halymeniales (SAUNDERS e KRAFT, 1996).

A ordem Halymeniales possui 268 espécies. É representada apenas pela família Halymeniaceae, na qual se destacam os gêneros *Cryptonemia*, *Grateloupia* e *Halymenia*, correspondentes a 71% das espécies (ALGAE BASE, 2010).

Observa-se um alto grau de heterogeneidade química nas galactanas produzidas por algas pertencentes a ordem Halymeniales. As galactanas biossintetizadas são semelhantes a carragenanas, porém com L-galactose em baixas porcentagens, graus variáveis de metoxilação e padrões incomuns de sulfatação (STORTZ e CEREZO, 2000).

Dentre os polissacarídeos das algas já estudadas pertencentes a 8 diferentes gêneros da ordem Halymeniales destacam-se *lambda-kappa-liota-* e *pi-*carragenanas, além de aeodanas e galactanas DL-híbridas (Tabela 2).

As aeodanas, assim nomeadas porque foram obtidas pela primeira vez de algas do gênero *Aeodes*, nunca tiveram sua estrutura geral claramente estabelecida. Acredita-se que as aeodanas possuem uma estrutura básica de carragenana com uma pequena porcentagem de  $\alpha$ -L-galactose, enquanto os grupos sulfato se localizam apenas nas unidades A, principalmente em C-2 e C-4, e os grupos metoxil



estão localizados em C-6 das unidades A e em C-2 das unidades B (NUNN e PAROLIS, 1968; ALLSOBROOK et al., 1971 e 1975; USOV et al., 1980).

A galactana biossintetizada pela alga *Grateloupia indica* (Halymeniaceae, Halymeniales) foi caracterizada como do tipo DL-híbrida. Os autores analisaram o produto da metanólise parcial do polissacarídeo nativo e encontraram uma proporção de carrabiose:agarobiose de 1:0,21. Já o polímero dessulfatado e metilado permitiu a quantificação de unidades B pertencentes às séries D- e L- (D-galactose:L-galactose = 1:1,81). Este polímero ainda apresentou uma potente atividade anticoagulante (SEN et al., 2002). É importante ressaltar que anteriormente o polissacarídeo biossintetizado pela mesma espécie *G. indica* foi classificado como uma galactana do tipo *lambda*-carragenana (PAREKH et al., 1989), no entanto neste estudo o polímero foi analisado apenas por espectroscopia de infravermelho e dosagem colorimétrica do teor de 3,6-anidrogalactose e sulfato.

A espécie *Pachymenia lusoria* (Halymeniaceae, Halymeniales) produz uma galactana com alto grau de complexidade, constituída por galactose, 6-O-metil e 2-O-metilgalactose, 3,6-anidrogalactose, 2-O-metil-3,6-anidrogalactose e xilose. A estrutura desta galactana foi estudada por Miller et al. (1995) com auxílio de distintos métodos: (1) hidrólise redutiva total e parcial, para determinar a composição de açúcares bem como analisar os tipos de ligações entre eles; (2) trideuteriometilação, para determinar a posição dos derivados naturalmente metilados; (3) dessulfatação; (4) tratamento alcalino; (5) ressonância magnética nuclear, além de (6) derivatização química com um álcool quiral para determinação da configuração absoluta dos açúcares neutros. As unidades dos monossacarídeos, 6-O e 2-O-metilgalactose, pertencem exclusivamente a série D-, enquanto as unidades de D- e L-galactose apresentam-se em uma proporção de aproximadamente 4:1 (MILLER et al., 1995). Entende-se que polissacarídeos complexos demandam técnicas diferenciadas para que sua estrutura seja analisada, porém devido a esta complexidade é muito difícil determinar a sequência monossacarídica destas galactanas (ZIBETTI et al., 2005).

TABELA 2 - CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS DE GALACTANAS EXTRAÍDAS DE ESPÉCIES DA ORDEM HALYMENIALES<sup>a</sup>

Espécies	Sulfato <sup>b</sup> [α] <sub>D</sub>	G2S	AG	2AG	2Gal/ 4Gal/ 6Gal	Gal D : L	Unidade B (D e L)	Xil	Pir.	Tipo de galactana
<i>Grateluopia lanceola</i>	30,0	+54,9	+ 10,2	-	+ / - / +	+	n.d.	n.d.	n.d.	λ-carragenana
<i>G. divaricata</i>	21,0	+41,9	n.d.	7,1(L)	n.d.	4:1	+	+	n.d.	λ-carragenana + agarana
<i>G. elliptica</i>	25,0	+45,0	n.d.	8,1(D)	tr (L) + (L) / + (D) / -	9:1	+	+	2,9	κ- e λ-carragenana
<i>G. filicina</i>	20,4	n.d.	+	3,7	n.d.	+	n.d.	n.d.	0,2	λ- e π-carragenana
<i>G. indica</i> <sup>1</sup>	17,3	+62,0	n.d.	1,8	n.d.	+	n.d.	n.d.	n.d.	λ-carragenana
<i>G. indica</i> <sup>2</sup>	20,3	+47,0	n.d.	15(D) 3(L)	-	1:1,8	+	tr	n.d.	DL-Híbrida
<i>G. turuturu</i>	26,0	+32,1	n.d.	3(L)	+ / + / +	4:1	+	+	2,9	λ-carragenana + agarana
<i>Pachymenia lusoria</i>	n.d.	n.d.	+	10(L)	+(D) / - / + (D)	4:1	+	+	+	
<i>P. hymantophora</i>	n.d.	n.d.	+	4(D)	-	+	n.d.	tr	n.d.	Aeodana
<i>P. carnosa</i>	32,5	+70,0	+	1,4	+(D) / + (D e L) / + (D)	+	+	-	n.d.	Aeodana
<i>P. crassa</i>	n.d.	n.d.	n.d.	4	+ / - / +	+	n.d.	-	n.d.	
<i>Aeodes ulvoidea</i>	19,9	+34,0	+	1,4	+(D) / + (L) / + (D)	+	+	tr	+	Aeodana
<i>A. orbitosa</i>	n.d.	+79,0	+	0,1	+(D) / + (L) / +	58	n.d.	+	n.d.	Aeodana + λ-carragenana
<i>Phyllymenia cornea</i>	19,6	+63,3	+	0,4 - 0,56	+(D) / + (L) / + (D)	+	+	+	+	Philiimenana
<i>P. hieroglyphica</i>	20,5	+44,0	+	<1	-	+	n.d.	n.d.	n.d.	Aeodana
<i>Halymenia ceylaica</i>	34,3	n.d.	n.d.	7,0	n.d.	n.d.	n.d.	+	0,4	
<i>H. porphyroides</i>	23,4	+56,3	n.d.	2,95	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	λ-carragenana
<i>H. venusta</i>	29,8	+72,5	n.d.	5,08	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	λ-carragenana
<i>H. floridana</i> <sup>3</sup>	26,3	+8,5	+	8,3	+(D e L) / - / -	3,8:1	+	+	n.d.	DL-Híbrida
<i>Cryptonemia crenulata</i> <sup>4</sup>	25,6	+25,6	n.d.	14,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	λ-carragenana
<i>C. crenulata</i> <sup>5</sup>	28,3	+23,5	+	15,8	+(D e L) / - / -	10,6:1	+	+	2,8	DL-Híbrida
<i>C. seminervis</i> <sup>6</sup>	27,2	-8,0	+	16,7	+(D e L) / + / +	5,7:1	+	+	5,1	DL-Híbrida

<sup>a</sup> Modificado de CHOPIN et al. (1994) e ZIBETTI (2005); n.d. = não determinado

<sup>b</sup> Sulfato = % de sulfato, [α]<sub>D</sub> = rotação óptica específica, G2S = presença de β-D-galactose 2-sulfato, AG = % de 3,6-anidrogactose, 2AG = % de 3,6-anidro-2-O-metilgalactose, 2Gal = presença de 2-O-metilgalactose, 4Gal = presença de 4-O-metilgalactose, 6Gal = presença de 6-O-metilgalactose, Gal D:L = proporção de D-galactose e L-galactose, Xil = presença de xilose e Pir. = % de ácido pirúvico. <sup>1</sup>PAREKH et al., 1989; <sup>2</sup>SEN et al. (2002); <sup>3</sup>COLODI (2007); <sup>4</sup>SAITO e OLIVEIRA (1990); <sup>5</sup>ZIBETTI et al. (2005); <sup>6</sup>ZIBETTI et al. (2009).

Em 1990 foi realizada uma revisão das algas encontradas na costa brasileira. Neste trabalho, a alga *Cryptonemia crenulata* (Halymeniaceae, Halymeniales) foi classificada como produtora de *iota*-carragenana (SAITO e OLIVEIRA, 1990). No entanto, Zibetti et al. (2005) estudaram os polissacarídeos de *C. crenulata* por métodos químicos e espectroscópicos, demonstrando que esta alga sintetiza galactanas DL-híbridas, com alto grau de sulfatação em C-2, tanto nas unidades A ( $\beta$ -D-galactose 2-sulfato) quanto nas unidades B (3,6-anidro- $\alpha$ -L-galactose 2-sulfato). Neste estudo foram obtidas duas galactanas homogêneas majoritárias substituídas também por acetal de ácido pirúvico em C-4 e C-6. A galactana sulfatada C2S-3 apresentou 55% da sua estrutura com característica de agarana e 45% com característica de carragenana.

Estes estudos estruturais de polissacarídeos biossintetizados por diferentes espécies de algas da ordem Halymeniales demonstram que além da diversidade de agaranas e carragenanas produzidas, muitas espécies sintetizam galactanas DL-híbridas. Estes polímeros DL-híbridos produzidos por algas da ordem Halymeniales apresentam características estruturais recorrentes (Tabela 2), como presença de  $\beta$ -D-galactose 2-sulfato e unidades de  $\alpha$ -galactose e/ou 3,6-anidro- $\alpha$ -galactose nas configurações L- e D-, as quais podem estar metoxiladas em C-2.

#### 2.4.1 GALACTANAS DL-HÍBRIDAS PRODUZIDAS POR *C. seminervis*

A espécie *Cryptonemia seminervis*, estudada por Zibetti et al. (2009), sintetiza galactanas do tipo DL-híbridas sulfatadas em C-2 das unidades A ( $\beta$ -D-galactose 2-sulfato) e piruvatadas, com 70% da sua estrutura com característica de agarana e 30% com característica de carragenana. As galactanas são compostas por  $\alpha$ -D- e  $\alpha$ -L-galactose e 3,6-anidro-D- e L-galactose e em menor quantidade unidades metiladas como 2-O-metil-3,6-anidro- $\alpha$ -L-galactose, 2-O-metil-, 4-O-metil- e 6-O-metilgalactoses, indicando a produção de polímeros altamente complexos.

Esta variabilidade estrutural está baseada em cinco fatores estruturais: (1) a quantidade e a posição dos grupos substituintes sulfato, acetal de ácido pirúvico, metoxilações e glicosilações (cadeias laterais de 4-O-metilgalactose e/ou xilose); (2) a proporção de galactose/3,6-anidrogalactose nas unidades B; (3) a razão de D,L-

galactoses e D,L-3,6-anidrogactoses nas unidades B; (4) formação de díades e (5) a sequência de díades na cadeia polissacarídica.

Em decorrência desta variabilidade encontra-se no mínimo 18 unidades monossacarídicas distintas que se arranjam de forma a constituir galactanas com alto grau de complexidade estrutural. A caracterização estrutural das duas frações majoritárias S2S-3 e S2S-4 permitiram determinar a composição de cinco monossacarídeos principais (Figura 5):  $\beta$ -D-galactose 2-sulfato,  $\beta$ -D-galactose 2-sulfato 4,6-O-(1'-carboxietilideno),  $\beta$ -D-galactose 2,6-sulfato, 3,6-anidro- $\alpha$ -L-galactose e 3,6-anidro- $\alpha$ -L-galactose 2-sulfato, além de outras unidades em menor quantidade.

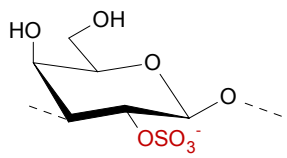
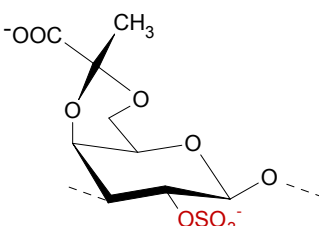
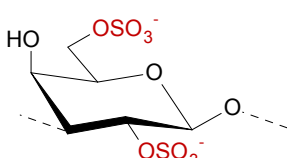
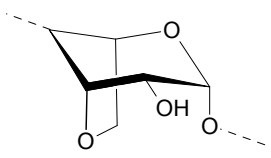
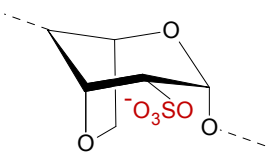
	Derivado	S2S-3 (mol %)	S2S-4 (mol %)
	$\beta$ -D-galactose 2-sulfato	20,0	11,9
	$\beta$ -D-galactose 2-sulfato 4,6-O-(1'-carboxietilideno)	8,9	6,0
	$\beta$ -D-galactose 2,6-disulfato	5,4	18,6
	3,6-anidro- $\alpha$ -L-galactose	11,4	7,3
	3,6-anidro- $\alpha$ -L-galactose 2-sulfato	4,9	15,4

FIGURA 5 - PRINCIPAIS UNIDADES MONOSSACARÍDICAS PRESENTES NAS GALACTANAS S2S-3 E S2S-4 OBTIDAS DE *C. seminervis* (ZIBETTI et al., 2009)

O tratamento alcalino preparativo realizado para a galactana S2S-3 de *C. seminervis* assinala a estimável formação de unidades de 3,6-anidro- $\alpha$ -L-galactose a partir de unidades precursoras. Sendo que os estudos cinéticos da ciclização destas unidades precursoras apontam para presença de díades do tipo G  $\rightarrow$  L6S/2,6S.

A estrutura majoritária da galactana S2S-3 está sumarizada na Figura 6. Análises químicas, espectroscópicas e os estudos cinéticos sugerem que a galactana S2S-3 é composta principalmente por díades características de agaranas.

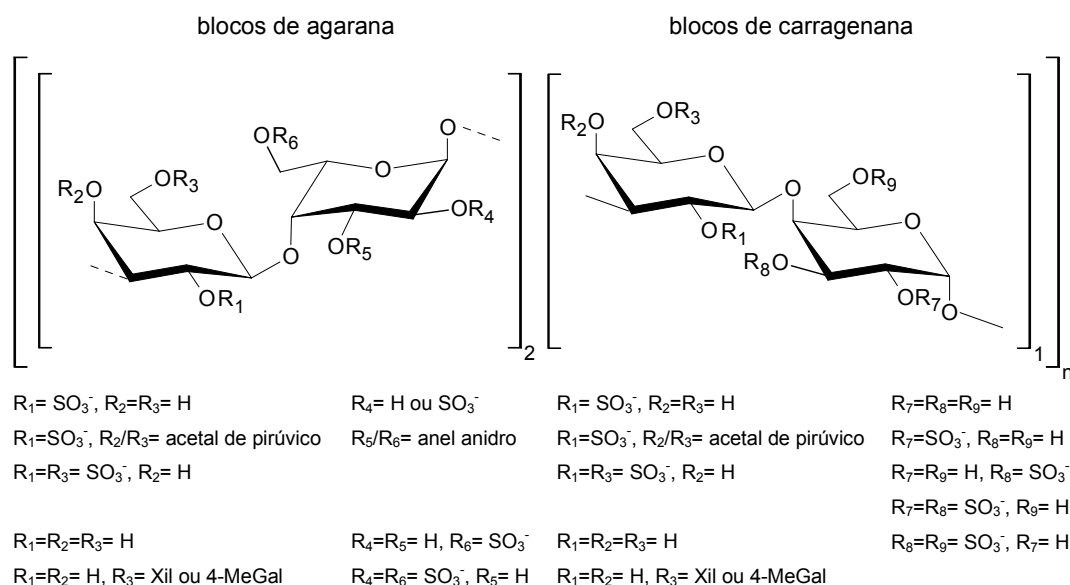


FIGURA 6 - PRINCIPAIS DÍADES PRESENTES NA GALACTANA DL-HÍBRIDA S2S-3 DE *C. seminervis* (ZIBETTI et al., 2009)

Diante da complexidade estrutural apresentada pelas galactanas sulfatadas torna-se indispensável a composição de diferentes estratégias para a completa elucidação estrutural de galactanas DL-híbridas.

## 2.5 DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL EM GALACTANAS DL-HÍBRIDAS

A determinação estrutural detalhada em polissacarídeos requer o conhecimento da sequência, posição das ligações, anomericidade e configuração absoluta dos monossacarídeos constituintes, bem como a posição dos diversos substituintes (GEYER e GEYER, 1994).

Galactanas DL-híbridas apresentam estruturas muito mais complexas do que agaranas e carragenanas. Portanto, sua caracterização estrutural dispõe de diversos métodos, dentre os quais se destacam (1) métodos analíticos gerais de dosagem de carboidratos totais, grupos sulfato, proteína, ácido pirúvico, determinação da rotação óptica específica; (2) estudos espectroscópicos de RMN de  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$  em suas modalidades mono e bidimensionais; (3) métodos cromatográficos; (4) métodos químicos de dessulfatação, metilação, acetilação, tratamento alcalino, hidrólises e derivatizações que auxiliam a determinação da configuração absoluta dos monossacarídeos constituintes. Deste modo alguns detalhes destes métodos são enfatizados a seguir, outros são aprofundados em Materiais e Métodos.

Espectroscopia de RMN de  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$  consistem num instrumento essencial para a determinação de detalhes estruturais específicos como a conexão entre resíduos de açúcares em polissacarídeos que apresentam grau significativo de regularidade estrutural (USOV, 1984), bem como no monitoramento das modificações químicas realizadas. Análises espectroscópicas de RMN são muito úteis nos estudos estruturais de galactanas sulfatadas, porém a alta complexidade apresentada nos espectros, muitas vezes, não permite que as diferentes estruturas diastereoisômeras de unidades de 3,6-anidrogactopiranosose sejam detectadas. Portanto, análises de metilação e a determinação da enantiomericidade somadas aos dados de espectrometria de RMN são ferramentas importantes utilizadas no estudo detalhado das galactanas DL-híbridas (ESTEVEZ et al., 2001).

### 2.5.1 ANÁLISE DE METILAÇÃO

Grande parte do enorme potencial para a diversidade química e estrutural dos polissacarídeos decorre da variedade de formas de ligação entre os açúcares. Portanto uma das etapas fundamentais para se entender a estrutura tridimensional dos carboidratos é determinar como os monossacarídeos estão ligados. O método mais amplamente utilizado na determinação da posição das ligações entre os monômeros de um polissacarídeo é a análise de metilação por cromatografia líquido-gasosa de derivados alditóis acetato de açúcares neutros parcialmente metilados (CARPITA e SHEA, 1990).

Apesar dos avanços metodológicos, a estratégia básica permanece: os grupos hidroxila livres do polissacarídeo são completamente metilados e uma subsequente hidrólise do polímero metilado expõe novas hidroxilas, as quais indiretamente revelam a posição da ligação glicosídica clivada durante a hidrólise. A redução dos carbonos anoméricos aos seus respectivos alcoóis, com auxílio de um agente redutor, permite a acetilação de todas as posições remanescentes, estabelecendo quais carbonos participam das ligações glicosídicas (CARPITA e SHEA, 1990).

Com o advento da combinação entre cromatografia e espectrometria de massa as técnicas de análise têm se refinado, sendo que pequenas quantidades de amostra são suficientes para fornecer informações sobre ligações e substituições em polissacarídeos complexos (CARPITA e SHEA, 1990).

A literatura esclarece que galactanas sulfatadas possuem dois tipos de ligações glicosídicas bem estabelecidas (unidades A ligadas 1→3 e unidades B ligadas 1→4) (PAINTER, 1983), de forma que outras posições que não são metiladas correspondem a substituintes.

As galactanas DL-híbridas apresentam grupos sulfato em posições variáveis. Após o processo de metilação tais posições permanecem com grupos sulfato e não são acetiladas, de forma que podem resultar em enganos quanto a posição das ligações e substituições. Por conseguinte é importante realizar a dessulfatação solvolítica do material. A análise de metilação do polissacarídeo dessulfatado comparado ao nativo permite identificar a posição dos grupos sulfato na galactana original (MILLER et al., 1995; FALSHAW e FURNEAUX, 1995).

A posição dos grupos O-metil naturais pode ser confundida com grupos metil adicionados na metilação química. Este problema pode ser resolvido através da metilação com agente metilante deuterado (trideuterometilação), assim os espectros de massa indicarão o aumento de três unidades nos fragmentos  $m/z$  dos derivados metilados, enquanto aqueles com grupos metil naturais permanecem com relação de  $m/z$  normais. Um exemplo deste método: unidades A (3 ligadas) substituídas em C-2, que são derivatizadas em 4,6-di-O-CD<sub>3</sub>-metilgalactose após a trideuterometilação, resultam em fragmentos  $m/z$  167, 107 e 48, enquanto unidades A (3 ligadas) substituídas em C-2 e metiladas naturalmente em C-6 são derivatizadas em 4-O-CD<sub>3</sub>-metilgalactose, resultando em fragmentos  $m/z$  164, 104 e 45. Ao correlacionar a

intensidade dos fragmentos é possível quantificar os derivados (CARPITA e SHEA, 1990; MILLER et al., 1995).

O processo de metilação é uma síntese de Williamson múltipla. Os grupos hidroxila dos monossacarídeos são mais ácidos que os alcoóis comuns, pois monossacarídeos possuem muitos átomos de oxigênio eletronegativo, todos os quais exercem efeitos indutivos de retirada de elétron sobre os grupos hidroxila vizinhos. Em meio alcalino, os grupos hidroxila são convertidos a íons alcóxidos, e cada um deles, por sua vez, reage com o agente metilante em uma reação de substituição nucleofílica bimolecular ( $S_N2$ ) para produzir o polissacarídeo metilado (Figura 7a). Este processo é chamado de metilação exaustiva e ocorre em solvente polar aprótico (DMSO) com agente metilante em excesso. O solvente aprótico é necessário para que haja a formação do íon alcóxido na presença de NaOH, o qual ioniza as hidroxilas. O meio alcalinizado acaba por produzir reações paralelas entre o agente metilante ( $ICH_3$ ) e o NaOH, por isso é necessário  $ICH_3$  em excesso (Figura 7b). A presença da base permite a formação do íon alcóxido, mas ela atua também como agente dessecante, pois a característica higroscópica do NaOH permite a retirada da água formada durante a reação de metilação (CIUCANU e KEREK, 1984; SOLOMONS e FRYHLE, 2002).

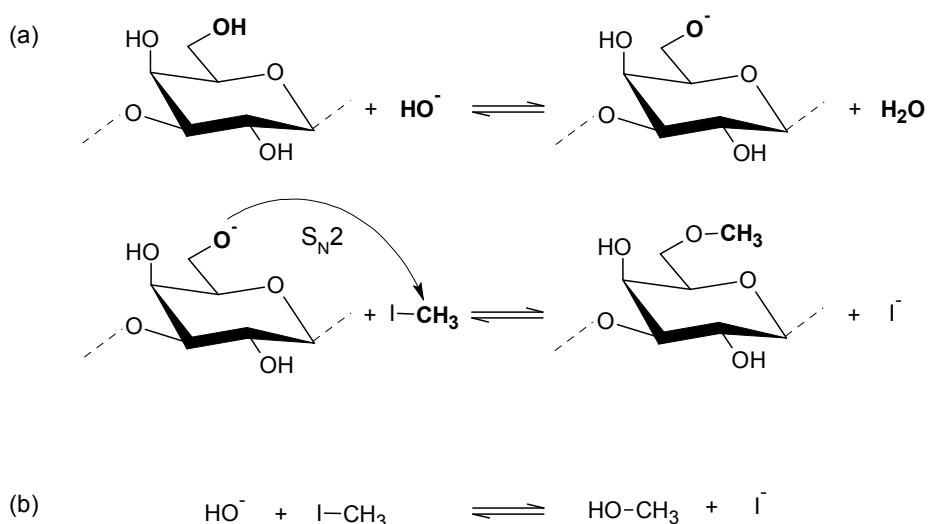


FIGURA 7 - ESQUEMA GERAL DA REAÇÃO DE METILAÇÃO



## 2.5.2 DETERMINAÇÃO DA CONFIGURAÇÃO ABSOLUTA

Faz-se necessário entender como são realizadas as derivatizações químicas que permitem identificar as quantidades relativas de enantiômeros presentes nas galactanas DL-híbridas, frente à importância do método na caracterização destes biopolímeros.

Isômeros são definidos como compostos químicos diferentes que possuem a mesma fórmula molecular. Compostos isômeros que possuem a mesma conectividade, mas diferem no arranjo dos átomos no espaço são denominados estereoisômeros. Existem dois grupos de compostos estereoisômeros: (1) enantiômeros: compostos que são imagens especulares um do outro e que não se sobrepõem; (2) diastereoisômeros: compostos que não são imagens especulares um do outro (Figura 8). A enantiomeria ocorre apenas com compostos que possuem centros quirais, sendo que o termo utilizado para designar o arranjo espacial em três dimensões dos átomos de uma molécula no espaço denomina-se estereoquímica (SOLOMONS e FRYHLE, 2002).

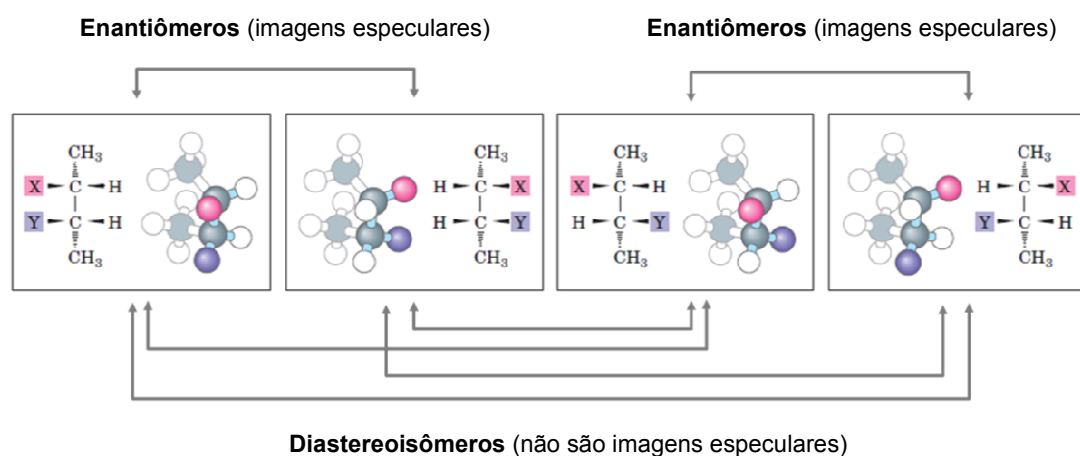


FIGURA 8 - ESTEREOISÔMEROS DO COMPOSTO BUTANO 2,3-DISUBSTITUÍDO ( $n = 2$  CENTROS QUIRAIS, POR ISSO  $2n = 4$  ESTEREOISÔMEROS) (NELSON e COX, 2002)

Diferentemente dos compostos diastereoisômeros, os quais diferem quanto ao ponto de fusão, solubilidade e pressão de vapor, compostos enantiômeros possuem as mesmas propriedades físicas. O único fator capaz de diferenciá-los é a rotação do plano de luz plano-polarizada, pois enantiômeros são opticamente ativos.

Ninguém antes de 1951 foi capaz de demonstrar com certeza qual era o arranjo espacial real dos grupos em qualquer molécula quiral e determinar a configuração absoluta de um composto opticamente ativo. Portanto apenas a configuração relativa das moléculas quirais era conhecida.

O sistema de designação estereoquímica relativa para química de carboidratos foi montada em 1906 e considerava a configuração dos açúcares com relação às moléculas dos enantiômeros do (+)-gliceraldeído e (-)-gliceraldeído, os quais foram convencionalmente denominados D-gliceraldeído e L-gliceraldeído, respectivamente. Mesmo com o desenvolvimento de técnicas que permitem determinar a configuração absoluta, a nomenclatura permaneceu usual em química de carboidratos: açúcares enantiômeros como (+)-galactose e (-)-galactose são denominados D-galactose e L-galactose, respectivamente (SOLOMONS e FRYHLE, 2002).

A determinação da configuração absoluta dos açúcares D-galactose e L-galactose é difícil porque eles consistem em imagens especulares um do outro (Figura 9), de forma que ambos possuem as mesmas propriedades físicas. Logo as técnicas cromatográficas convencionais são incapazes de separá-los.

Desta forma os métodos para resolução de enantiômeros envolvem duas estratégias: (1) separação com auxílio de enzimas, as quais possuem especificidade pelo substrato e são capazes de realizar modificações estruturais que permitam a separação de uma mistura de enantiômeros; (2) reação da mistura de enantiômeros com um único enantiômero de algum outro composto, sendo esta segunda opção mais interessante para a química de carboidratos.

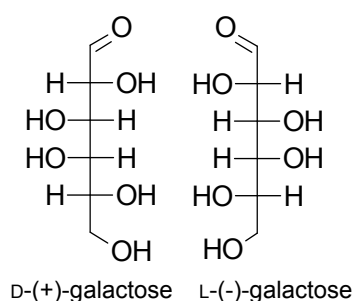


FIGURA 9 - ENANTIÔMEROS DA GALACTOSE

Interações moleculares são invariavelmente estereoespecíficas, portanto requerem estereoquímica específica nas moléculas interativas. Quando uma mistura de enantiômeros (D- e L-) interage com apenas um único enantiômero (D- ou L-) forma-se uma mistura de diastereoisômeros, os quais são suscetíveis a separação por métodos cromatográficos, pois possuem solubilidade diferenciada em solventes comuns e pontos de ebulição e fusão diferentes (SOLOMONS e FRYHLE, 2002).

A determinação da configuração absoluta através de análise em GLC de açúcares neutros derivatizados com alcoóis quirais (2-butanol e 2-octanol) foi proposta em 1978 (GERWIG et al., 1978; LEONTEIN et al., 1978). Porém quando estes métodos são aplicados a açúcares complexos resultam em cromatogramas difíceis de serem resolvidos, devido a variedade dos monossacarídeos.

Em 1995 foi proposta a utilização de aminas quirais: 1-amino-2-propanol (AP) e  $\alpha$ -metilbenzilamina (MBA) para a derivatização de açúcares enantiômeros em um método capaz de determinar a configuração absoluta de açúcares monometilados (CASES et al., 1995).

Porém apenas em 1998 desenvolveu-se um método capaz de determinar a configuração absoluta das unidades de 3,6-anidrogactose. De acordo com Errea e colaboradores (1998) os enantiômeros são submetidos a hidrólise oxidativa levando a formação de ácidos aldônicos, os quais são derivatizados com alcoóis quirais, esterificados e então acetilados para análise em GLC. A determinação do açúcar dimetilado 2,6-di-O-metilgactose foi proposta em 2001, considerando a derivatização com a amina quiral MBA (ERREA et al., 2001).

Devido as diversas etapas reacionais (ERREA et al., 1998) propôs-se um processo mais simples que envolve dupla hidrólise acoplada a aminação redutiva com aminas quirais para determinar a configuração absoluta de unidades metiladas e 3,6-anidrogactosídicas (NAVARRO e STORTZ, 2003).

Este método sugere o uso da amina quiral (S)-1-amino-2-propanol (AP) (Figura 10a) para resolução dos enantiômeros de gactose, 6-O-metilgactose, 4-O-metilgactose e 3-O-metilgactose, enquanto a (S)- $\alpha$ -metilbenzilamina (MBA) (Figura 10b) deve ser utilizada na derivatização dos açúcares 2-O-metilgactose, 3,6- anidrogactose e 2-O-metil- 3,6-anidrogactose.

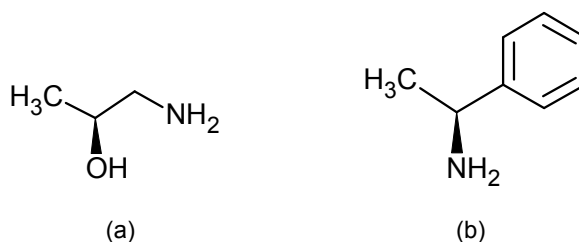


FIGURA 10 - AMINAS QUIRAIS (S)-1-AMINO-2-PROPANOL (a) E (S)- $\alpha$ -METILBENZILAMINA (b)

A resolução dos enantiômeros perfaz cinco passos reacionais: (1) hidrólise suave que cliva as ligações glicosídicas pertencentes a unidades de 3,6-anidrogactose; (2) primeira aminação redutiva (Figura 11) que pode ser realizada com AP ou MBA e resulta na aminação das unidades de 3,6-anidrogactose, as quais estavam em sua forma aldeídica e são facilmente reduzidas após uma substituição nucleofílica unimolecular ( $S_N1$ ), reação em que o carbono aldeídico da unidade de 3,6-anidrogactose sofre um ataque nucleofílico da amina primária, formando o intermediário hemiaminal ou imina, os quais, por sua vez, sofrem redução formando o derivado aminado; (3) hidrólise forte que cliva o restante das ligações glicosídicas, originando monossacarídeos na forma aldeídica; (4) segunda aminação redutiva (com a mesma amina quiral) em que todos os monossacarídeos são derivatizados em seus correspondentes compostos aminados; (5) acetilação (NAVARRO e STORTZ, 2003).

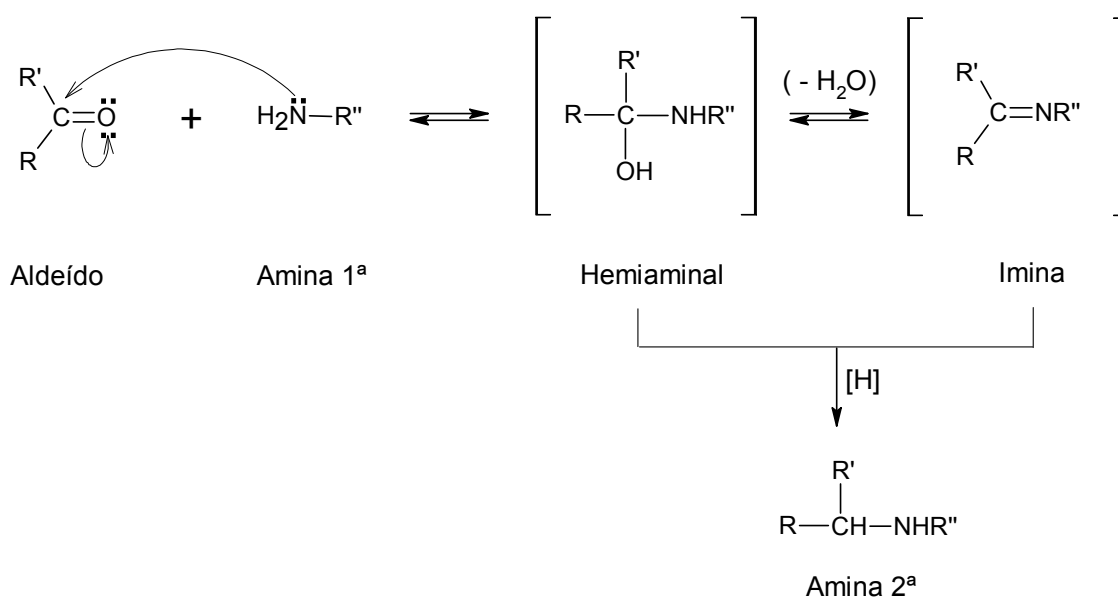


FIGURA 11 - MECANISMO DE AMINAÇÃO REDUTIVA (SOLOMONS e FRYHLE, 2002)

O resultado final do processo de dupla hidrólise-aminação redutiva com uma amina S (Figura 12) é uma mistura de diastereoisômeros: D/(S) e L/(S), os quais possuem tempos de eluição diferenciais e, portanto podem ser separados e quantificados através de cromatografia líquido-gasosa acoplada a espectrometria de massa (CLG-EM) (NAVARRO e STORTZ, 2003).

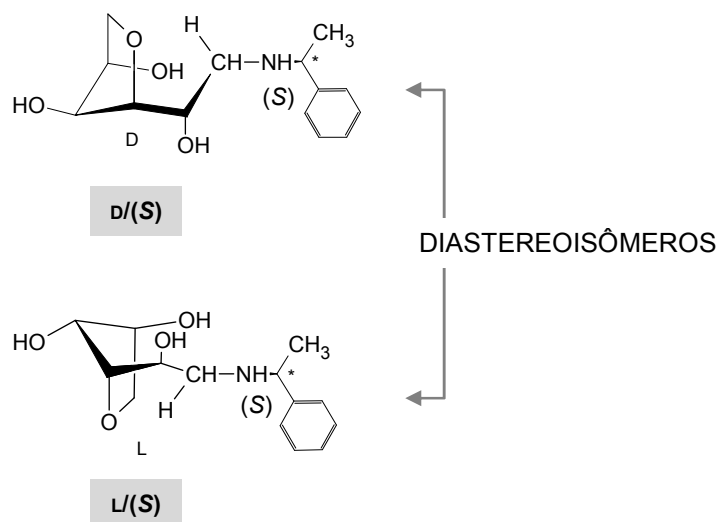


FIGURA 12 - RESULTADO DA DUPLA HIDRÓLISE-AMINAÇÃO REDUTIVA PARA UNIDADES DE 3,6-ANIDROGALACTOSE UTILIZANDO-SE (S)- $\alpha$ -METILBENZILAMINA: DIASTEREOISÔMEROS D/(S), L/(S)

### 2.5.3 O PAPEL DOS OLIGOSSACARÍDEOS

A identificação de oligossacarídeos constitui uma tática tradicional na determinação da sequência de unidades nos polissacarídeos (FALSHAW e FURNEAUX, 1995). Estudos de RMN em moléculas com menor grau de polimerização produzem informações estruturais importantes (LAHAYE et al., 1989).

As estratégias utilizadas na obtenção de oligossacarídeos empregam metanólise parcial (ARAKI e HIRASE, 1954; IZUMI, 1973; TAKANO et al., 1998), hidrólise ácida parcial convencional (HIRASE, 1957; IZUMI, 1973; YU et al., 2002; PENMAN e REES, 1973), hidrólise enzimática (YOUNG et al., 1978; ROCHAS et al., 1986; DE RUITER e RUDOLPH, 1997) e hidrólise redutiva parcial (USOV e ELASHVILI, 1991; USOV e KLOCHKOVA, 1992; FALSHAW e FURNEAUX, 1995; ZIBETTI, et al., 2005; ZIBETTI et al., 2009).

### 2.5.3.1 METANÓLISE PARCIAL

Reações de substituição nucleofílica na qual o nucleófilo é uma molécula do solvente são chamadas solvólise. Logo metanólise é a clivagem mediada por moléculas de metanol presentes no meio reacional (SOLOMONS e FRYHLE, 2002).

Na década de 50 o tratamento do ágar comercial com ácido clorídrico e metanol em refluxo originou uma fração cristalina identificada como agarobiose dimetilacetal (ARAKI e HIRASE, 1954). No início dos anos 70, com auxílio de metanólise parcial foram feitas análises comparativas de RMN de  $^1\text{H}$  entre agarobiose e polissacarídeos extraídos de algas vermelhas, sendo identificados dissacarídeos dimetilacetal de 4,6-O-(1'-carboxietilideno)-agarobiose (IZUMI, 1973).

Oligossacarídeos obtidos com este método auxiliaram a identificação de algumas díades constituintes dos polissacarídeos extraídos de *Gloiopeltis furcata* (Gigartinales, Rhodophyta) (TAKANO et al., 1998).

A reação de metanólise parcial origina oligossacarídeos contendo 3,6-anidrogactose dimetilacetal como unidades terminais, pois as ligações 3,6-anidrogactosídicas são metanolizadas de maneira preferencial (Figura 13) (ARAKI e HIRASE, 1954; IZUMI, 1973; TAKANO et al., 1998).

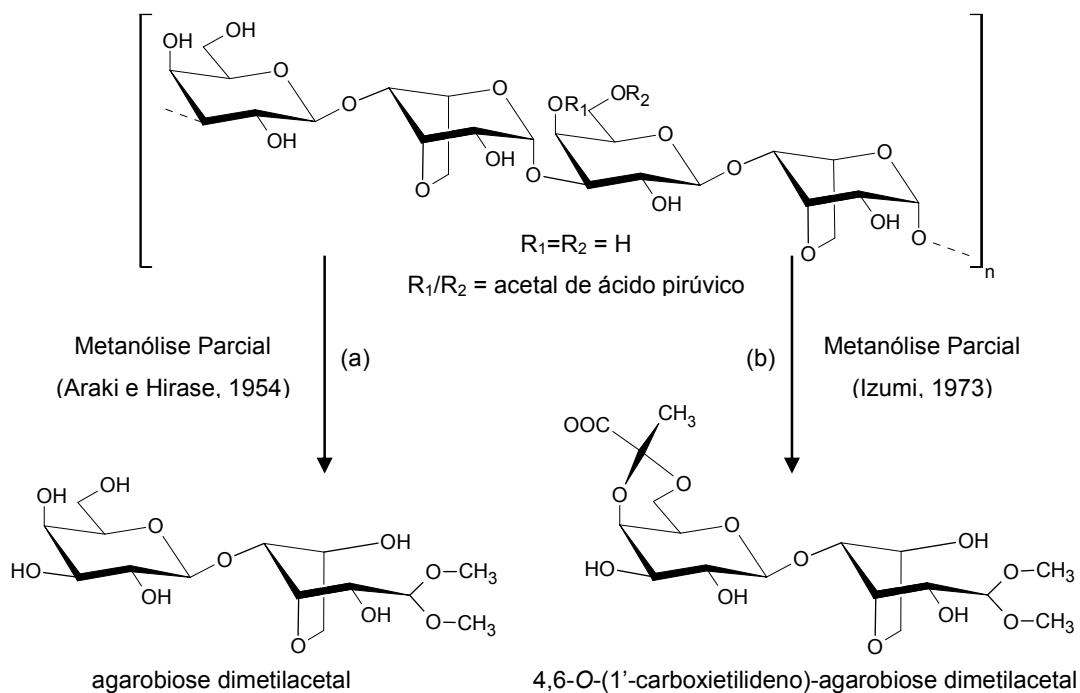


FIGURA 13 - PRODUTOS DE METANÓLISE PARCIAL DE AGARANAS

### 2.5.3.2 HIDRÓLISE ÁCIDA PARCIAL CONVENCIONAL

As condições da hidrólise ácida parcial convencional determinam os tipos de oligossacarídeos produzidos. Tipos de monossacarídeos, de anel e configuração das ligações glicosídicas interferem no tempo de hidrólise (ADAMS, 1965).

Agaranas hidrolisadas em condições suaves originam oligossacarídeos com número par de unidades, semelhantes aos obtidos por degradação enzimática, rendendo principalmente agarobiose em sua forma de aldeído hidratado (Figura 14) (IZUMI, 1973).

Em condições de hidrólise mais intensa ocorre a degradação das unidades de 3,6-anidrogactose, o que resulta em oligossacarídeos com número ímpar de unidades monossacarídicas. Assim as extremidades são sempre unidades A na forma de terminais redutores e não redutores (Figura 15a) (YU et al., 2002).

Com o propósito de localizar a posição dos grupos sulfato em polissacarídeos sulfatados com alta proporção de 3,6-anidrogactose, Penman e Rees (1973) desenvolveram uma hidrólise oxidativa com  $H_2SO_4$  0,25M na presença de bromo. Nestas condições ocorre quebra das ligações 3,6-anidrogactosídicas e posterior oxidação pelo bromo dos resíduos de 3,6-anidrogactose a ácido 3,6-anidrogactônico (Figura 15b).

As condições de hidrólise devem ser muito bem controladas, pois as variações estruturais dos polissacarídeos (repetitividade estrutural e distribuição das ligações glicosídicas mais suscetíveis) podem promover uma despolimerização parcial da qual se obtêm misturas de oligossacarídeos com massa molecular relativamente baixa e, em alguns casos, fragmentos resistentes (PAINTER, 1983).

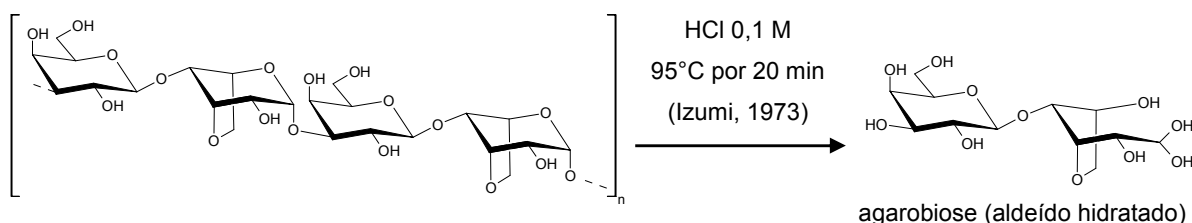


FIGURA 14 - PRODUTOS DE HIDRÓLISE ÁCIDA PARCIAL CONVENCIONAL SUAVE EM AGARANAS (MODIFICADO DE GONÇALVES, 2005)

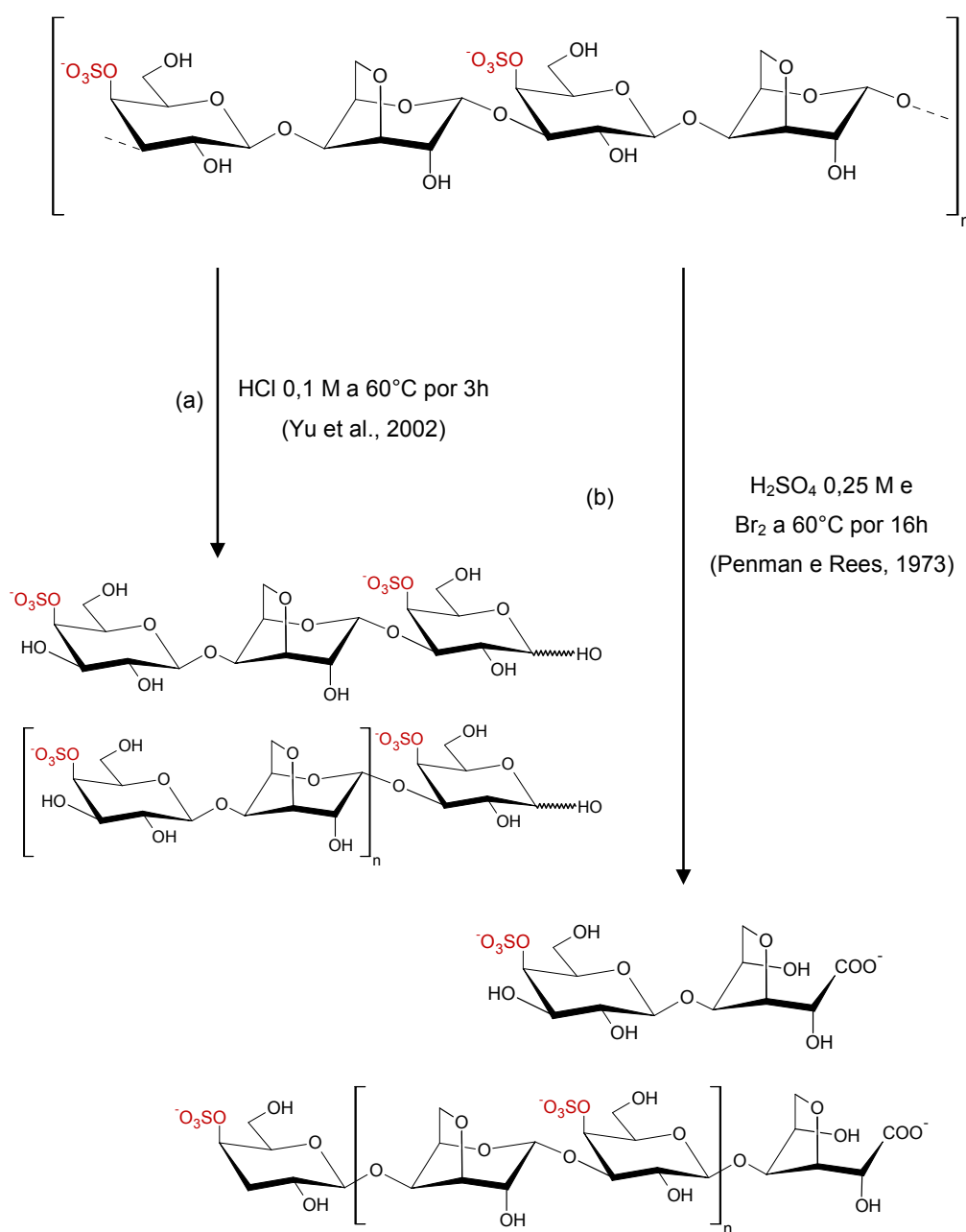


FIGURA 15 - PRODUTOS DE HIDRÓLISE ÁCIDA PARCIAL CONVENCIONAL (a) E OXIDATIVA (b) EM  $\kappa$ -CARRAGENANA (MODIFICADO DE DUCATTI, 2005)



### 2.5.3.3 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

Outra possibilidade para obtenção de oligossacarídeos reside na utilização de enzimas como  $\beta$ - e  $\alpha$ -agarases capazes de fornecer oligossacarídeos redutores e oligossacarídeos redutores na forma de seu aldeído hidratado, respectivamente (ROCHAS et al., 1986; YOUNG et al., 1978) (Figura 16). Dentre as carragenases estudadas, as principais possuem a  $\kappa$ - e  $\iota$ -carragenanas como substratos principais. A enzima  $\kappa$ -carragenase, isolada da bactéria *Alteromonas carrageenovora*, tem atividade de  $\beta$ -hidrolase e cliva ligações  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) envolvendo os resíduos de galactose 4-sulfato (unidade A) e 3,6-anidrogactose (unidade B) e produz oligossacarídeos contendo 3,6-anidrogactose como terminal não redutor (Figura 17) (DE RUITER e RUDOLPH, 1997).

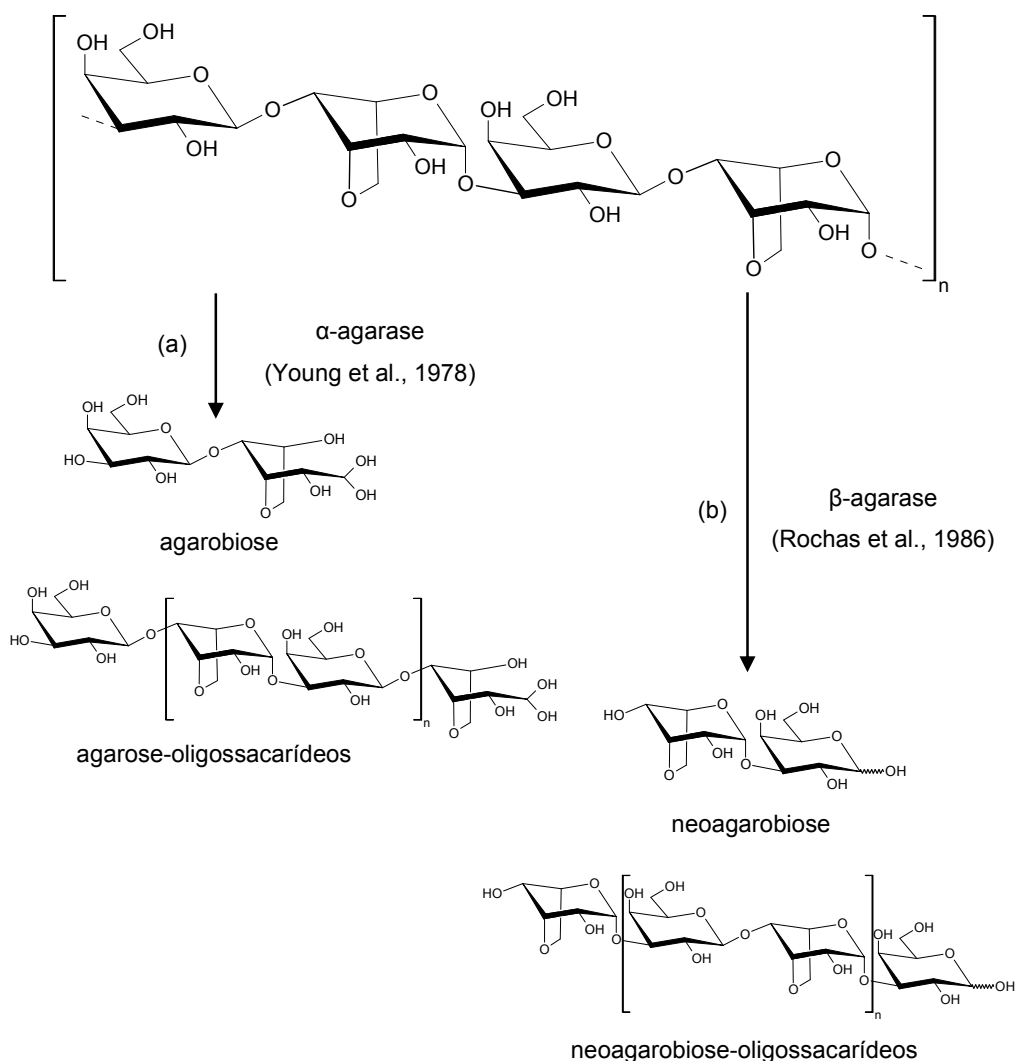


FIGURA 16 - HIDRÓLISE DA AGAROSE POR  $\alpha$ - E  $\beta$ -AGARASES (MODIFICADO DE DUCATTI, 2005)

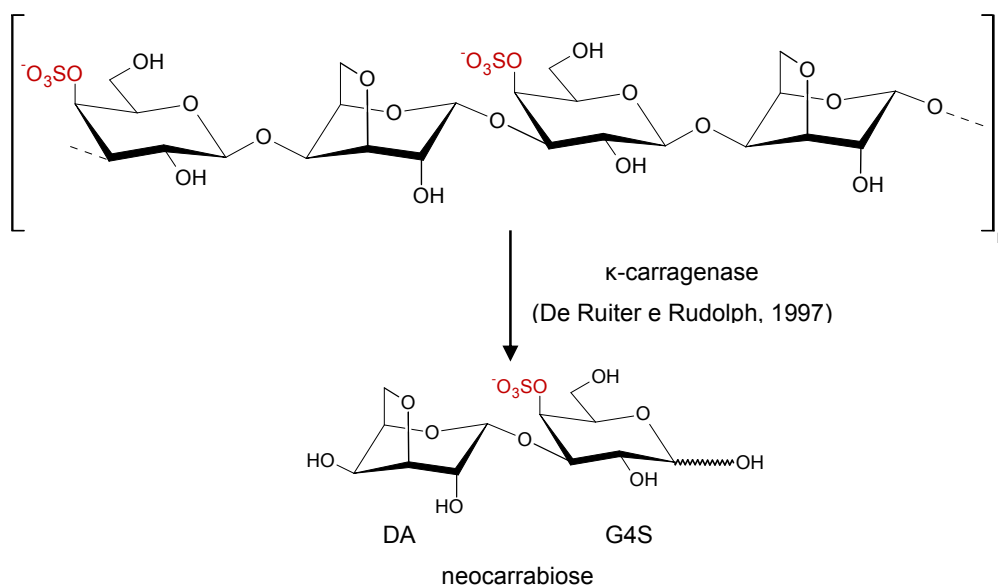


FIGURA 17 - HIDRÓLISE DA  $\kappa$ -CARRAGENANA POR  $\kappa$ -CARRAGENASE

Contudo, considerando o estudo de galactanas complexas, altamente substituídas, a utilização de enzimas torna-se não muito atraente, visto que a atividade de agarases e carragenases é dependente do padrão de substituição do polissacarídeo. Além disso, o uso de enzimas significa encarecimento metodológico.

#### 2.5.3.4 HIDRÓLISE REDUTIVA PARCIAL

Unidades monossacarídicas de 3,6-anidrogactose são degradadas na condição padrão de hidrólise ácida em meio aquoso utilizada no estudo estrutural de oligo e polissacarídeos. As alternativas até o final da década de 80 eram metanólise (ARAKI e HIRASE, 1954) ou mercaptólise (HIRASE e ARAKI, 1954) para evitar a perda das unidades lábeis em meio ácido. A estratégia encontrada foi a adição do complexo redutor borano 4-metil-morfolina, resistente a degradação em meio ácido, durante o processo de hidrólise. Assim os monossacarídeos liberados sob condição ácida são rapidamente reduzidos a alditóis (GAREGG et al., 1988).

Deste modo protocolos de hidrólise reductiva total e parcial foram estabelecidos na presença do complexo borano 4-metil-morfolina.

A hidrólise reductiva total é utilizada na obtenção da composição monossacarídica total de oligos e polissacarídeos. Este método consiste em duas etapas: (1) primeiro realiza-se uma hidrólise em condições suaves capaz de clivar

apenas as ligações 3,6-anidrogalactosídicas, então o complexo borano 4-metil-morfolina reduz as extremidades de 3,6-anidrogalactose bem como unidades liberadas pela hidrólise, (2) então se realiza uma segunda hidrólise mais drástica após adição de mais agente redutor. Desta forma todas as ligações glicosídicas são clivadas e por fim adiciona-se novamente agente redutor. As amostras são acetiladas em meio ácido e podem ser analisadas por CLG e ou CLG-EM (STEVENSON e FURNEAUX, 1991).

A hidrólise redutiva parcial emprega uma condição suave de hidrólise em presença do complexo redutor borano 4-metil-morfolina que resulta na clivagem seletiva das ligações 3,6-anidrogalactosídicas e origina oligossacarídeos com unidades terminais de 3,6-anidrogalactitol<sup>1</sup> em sua extremidade redutora. Observa-se retenção substancial dos grupos sulfato (USOV e ELASHVILI, 1991).

Os oligossacarídeos alditóis produzidos neste tipo de hidrólise são usualmente denominados de acordo com sua origem e número de unidades, adicionando-se o sufixo *itol*. Quando apresentam unidades precursoras de 3,6-anidrogalactose (galactose 6-sulfato), acrescenta-se o prefixo *pre*.

Os oligossacarídeos resultantes da hidrólise redutiva parcial são mais estáveis e mais convenientes para separação por métodos cromatográficos em comparação com os produtos de metanólise ou hidrólise parcial com ácidos inorgânicos (USOV e ELASHVILI, 1991).

Desta forma a hidrólise redutiva parcial constitui um método barato que apresenta uma especificidade interessante para obtenção de oligossacarídeos e auxílio na determinação estrutural de galactanas complexas.

Este método consiste na solubilização do polissacarídeo em água (1,3% m/v), aquecimento da solução a 60°C e adição do complexo redutor borano 4-metil-morfolina (6,75g/1g de polissacarídeo), seguida da adição de TFA 2M (25mL/1g de polissacarídeo) e incubação a 65°C por 8h (USOV e ELASHVILI, 1991).

Usov e Elashvili (1991) utilizaram a hidrólise redutiva parcial para analisar as galactanas sulfatadas produzidas pela alga *Laurencia nipponica* (Ceramiales, Rhodophyta). O hidrolisado foi submetido a cromatografia de exclusão por tamanho, originando uma fração de alto peso molecular (HMF, 10% de rendimento) e uma mistura de oligossacarídeos neutros e carregados.

---

<sup>1</sup> A nomenclatura correta seria 1,4-anidrogalactitol, porém para facilitar a relação com o monossacarídeo de origem mantém-se aqui o termo 3,6-anidrogalactitol.

A mistura de oligossacarídeos foi separada por cromatografia de troca iônica e de fase reversa originando oligossacarídeos neutros e sulfatados: agarobiitol, 2<sup>1</sup>-O-metil-agarobiitol, agarobiitol 2<sup>2</sup>-sulfato, preagarotetraitol 2<sup>2</sup>,6<sup>3</sup>-dissulfato, preagarotetraitol 6<sup>3</sup>,2<sup>4</sup>-dissulfato e preagarotetraitol 3<sup>3</sup>-xilosil-6<sup>3</sup>,2<sup>4</sup>-dissulfato.

A fração HMF de alto peso molecular diferencia-se da fração polissacarídica parental quanto a composição monossacarídica: não apresenta 3,6-anidrogactose e é enriquecida com xilose, galactoses metiladas e sulfato. Todos os assinalamentos de RMN de <sup>13</sup>C característicos dos tetrassacarídeos isolados (preagarotetraitol 2<sup>2</sup>,6<sup>3</sup>-dissulfato, preagarotetraitol 6<sup>3</sup>,2<sup>4</sup>-dissulfato e preagarotetraitol 3<sup>3</sup>-xilosil-6<sup>3</sup>,2<sup>4</sup>-dissulfato) foram encontrados para HMF juntamente com ressonâncias em 58,9 ppm e 57,3 ppm referentes aos grupos metil dos resíduos de 6-O-metil- e 3-O-metilgalactose. Os oligossacarídeos isolados da alga *L. nipponica* por hidrólise redutiva parcial são resumidos na Figura 18.

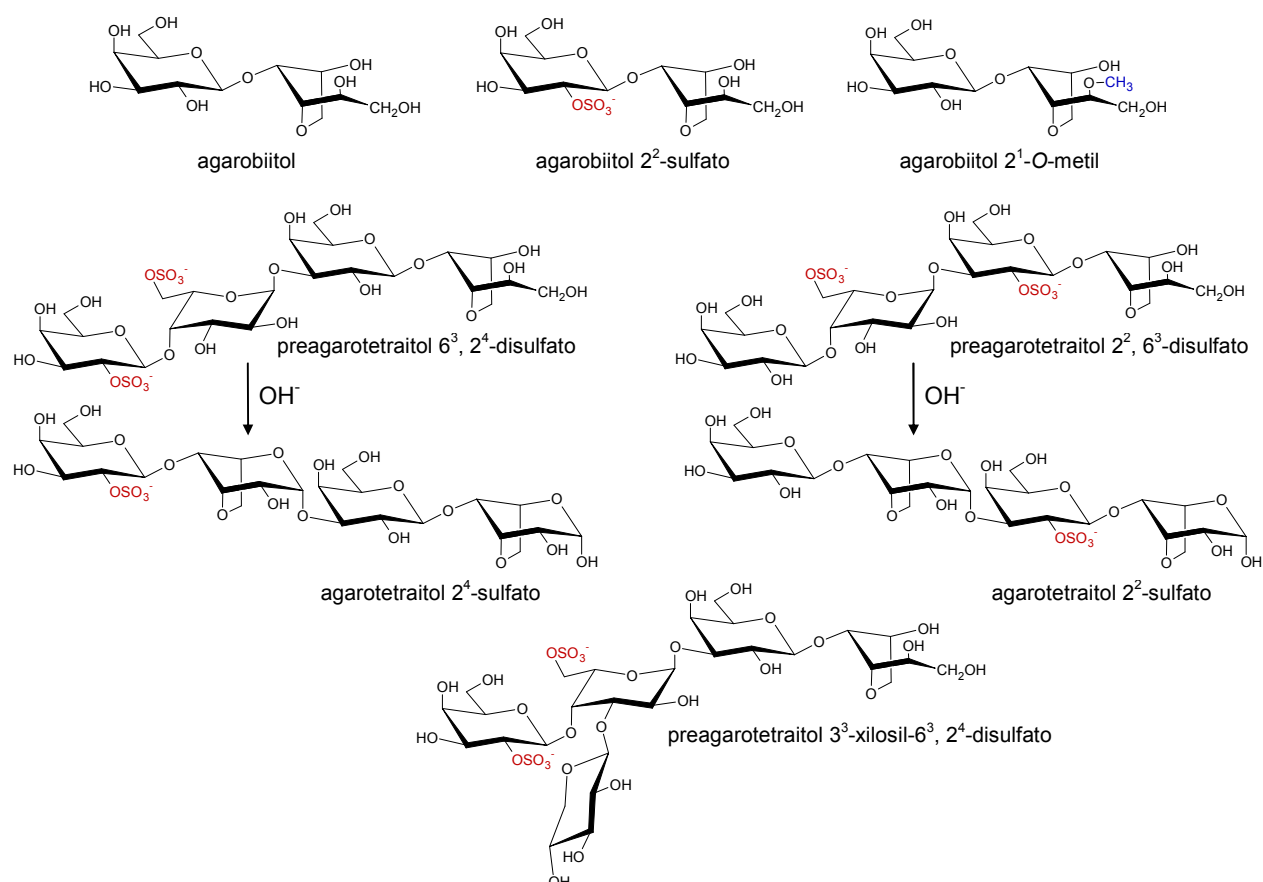


FIGURA 18 - OLIGOSSACARÍDEOS ALDITÓIS ISOLADOS DE *L. nipponica* (CERAMIALES, RHODOPHYTA) (USOV E ELASHVILI, 1991)

Os autores enfatizam que a hidrólise redutiva parcial é muito eficaz no auxílio da caracterização estrutural de polissacarídeos complexos de agarana. Posta sua capacidade de clivar seletivamente ligações 3,6-anidro- $\alpha$ -L-galactosídicas sem alterar a posição de outros substituintes, rendendo oligossacarídeos que mantêm grupos sulfato e substituições por xilose. Os principais produtos da hidrólise constituem derivados de agarobiitol e tetrassacarídeos, característicos de porfiranas, em menor quantidade. A obtenção de fragmentos de alto peso molecular, desprovidos de unidades de 3,6-anidro- $\alpha$ -L-galactose, proporcionam informações importantes quanto a estrutura e o grau de regularidade do polissacarídeo parental (USOV e ELASHVILI, 1991).

O processo de hidrólise ácida parcial aplicado a biomassa algal sem o prévio isolamento dos polissacarídeos foi realizado por Usov e Klochkova (1992). A abordagem foi realizada na análise de espécies de algas pertencentes a diferentes ordens da divisão Rhodophyta. A identificação dos dissacarídeos agarobiitol e carrabiitol por CLG obtidos na hidrólise redutiva parcial permitiu distribuir as algas como produtoras de agaranas ou carragenanas. A maioria das algas analisadas produz agaranas, mas foi observada a presença simultânea de agarobiitol e carrabiitol nos gêneros *Callophyllis* e *Cirrulicarpus*. Dentre as mais de 40 espécies analisadas apenas seis produziram carrabiose (USOV e KLOCHKOVA, 1992).

Destaca-se ainda que o rendimento dos dissacarídeos redutores agarobiitol e carrabiitol obtidos por hidrólise redutiva parcial é dependente não apenas da proporção de 3,6-anidrogalactose e galactose, mas também do grau regularidade na molécula de polissacarídeo (USOV e KLOCHKOVA, 1992).

Oligossacarídeos neutros e ácidos foram obtidos através da hidrólise redutiva parcial de uma agarana de *Acanthophora spicifera* (Ceramiales) previamente tratada com álcali por Gonçalves et al. (2002). Os dissacarídeos alditóis foram caracterizados por ionização por *eletrospray* acoplada a espectrometria de massa e RMN mono e bidimensionais. Foram isolados: (A) agarobiitol; (B) agarobiitol 4<sup>4</sup>,6<sup>2</sup>-O-(1'-carboxietilideno); (C) agarobiitol 2<sup>2</sup>-sulfato e (D) agarobiitol 4<sup>2</sup>,6<sup>2</sup>-O-(1'-carboxietilideno) 2<sup>2</sup>-sulfato, um dissacarídeo inédito até então (Figura 19).

Utilizando hidrólise redutiva parcial, Ducatti (2005) obteve oligossacarídeos a partir das carragenanas de *Gracilaria domingensis* (Gracilariales) e das agaranas de *Eucheuma denticulatum* (Gigartinales) com o objetivo de determinar a estrutura dos compostos isolados através de técnicas de RMN, além de comparar métodos de

purificação e fracionamento dos oligossacarídeos. Foram purificados e caracterizados cinco oligossacarídeos: agarobiitol; 6<sup>2</sup>-O-metil agarobiitol; agarobiitol 6<sup>2</sup>-sulfato; carrabiitol 2<sup>1</sup>,4<sup>2</sup>-dissulfato e carratetraitol 2<sup>1</sup>,4<sup>2</sup>,2<sup>3</sup>,4<sup>4</sup>-tetrasulfato, sendo os dois últimos isolados pela primeira vez (Figura 20) (DUCATTI, 2005).

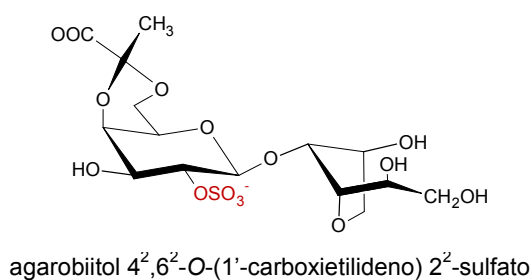


FIGURA 19 - OLIGOSSACARÍDEO ALDITOL AGARABIITOL 4<sup>2</sup>, 6<sup>2</sup>-O-(1'-CARBOXIETILIDENO) 2<sup>2</sup>-SULFATO DE *A. spicifera* (CERAMIALES) ISOLADO PELA PRIMEIRA VEZ POR GONÇALVES et al. (2002)

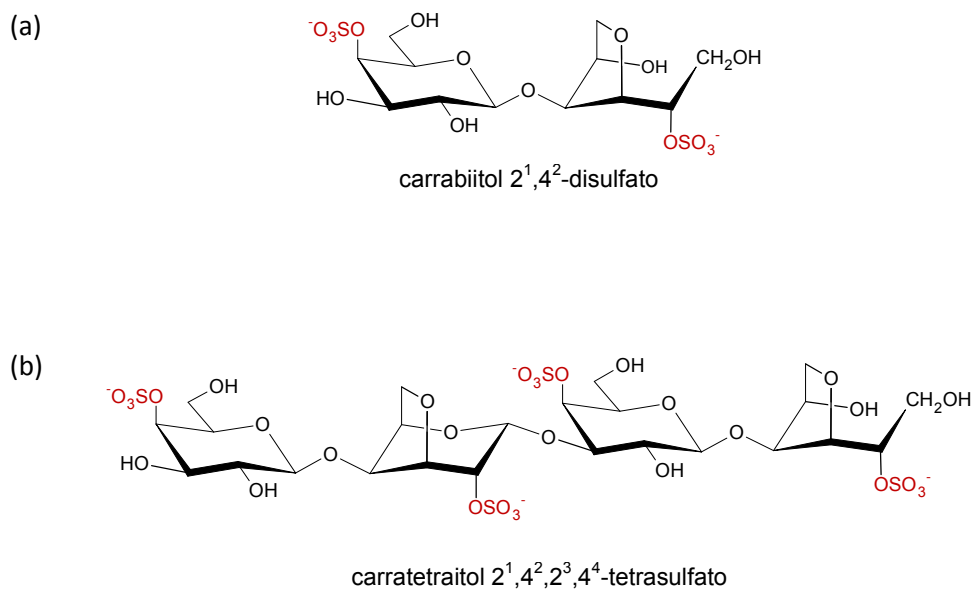


FIGURA 20 - OLIGOSSACARÍDEOS ALDITÓIS (a) CARRABIITOL 2<sup>1</sup>,4<sup>2</sup>-DISULFATO E (b) CARRATETRAITOL 2<sup>1</sup>,4<sup>2</sup>,2<sup>3</sup>,4<sup>4</sup>-TETRASULFATO ISOLADOS DE *G. domingensis* E *E. denticulatum* (DUCATTI, 2005)

A hidrólise reductiva parcial utilizada por Zibetti et al. (2005) na galactana majoritária (C2S-3) produzida por *Cryptonemia crenulata*, apresenta algumas diferenças quanto ao tempo e concentração do ácido, proporcionando condições mais suaves de hidrólise. Assim, os oligossacarídeos formados apresentam grau de polimerização maior do que os compostos isolados por de Usov e Elashvili (1991), Usov e Klochkova (1992), Gonçalves et al. (2002) e Ducatti (2005).

A fração C2S-3 ( $M_w$  236.200 Da) sulfatada homogênea foi despolimerizada com 0,375M de TFA a 65°C por 6h e a mistura obtida foi submetida a cromatografia de troca aniônica. Foi isolada uma fração homogênea correspondente a massa molar de 25.000 Da. A análise espectrométrica de RMN de  $^{13}C$  desta fração aponta a presença das díades: G (104,3 ppm) → D(6S) (96,1 ppm) ou D2M (93,3 ppm); G(P) (103,1 ppm) → L(6S) (100,7 ppm) e G(P) (102,1 - 102,5 ppm) → LA2M (98,7 ppm) ou LA2S (96,1 - 96,7 ppm) (ZIBETTI et al., 2005).

O mesmo tipo de abordagem foi realizada na galactana homogênea S2S-3 biossintetizada por *Cryptonemia seminervis* (ZIBETTI et al., 2009). Esta fração foi também submetida ao processo de despolimerização parcial com 0,375M de TFA a 65°C por 6h na presença de agente redutor, originando o despolimerizado CS.

O oligossacarídeo sulfatado CS (21,4% NaSO<sub>3</sub>) é constituído principalmente por galactose e 3,6-anidrogactose (54,0 e 25,8 mol%), além de 3,6-anidro-2-O-metilgalactose, 2-O-metilgalactose, 3e/ou4-O-metilgalactose, 6-O-metilgalactose e xilose em menores quantidades (5,6; 4,7; 3,6; 1,0 e 5,3 mol%, respectivamente).

A análise de metilação da fração CS mostra um perfil complexo compatível com a galactana original S2S-3, diferenciando-se principalmente pelo aumento do derivado 2,4,6-tri-O-metilgalactose e concomitante diminuição do derivado 4,6-di-O-metilgalactose.

As análises de ressonância magnética nuclear (RMN) de  $^{13}C$  indicam a presença de unidades piruvatadas bem como o predomínio de unidades B pertencentes a série enantiomérica L- no despolimerizado CS (Tabela 3).

TABELA 3 - DESLOCAMENTOS QUÍMICOS (ppm) DAS DÍADES PRESENTES NA GALACTANA DESPOLIMERIZADA CS (ZIBETTI et al., 2009)

Díade	Unidade A	Unidade B
G → D	104,2	96,1
G(P) → LA2M	102,7	98,3
G(P) → LA	102,5	98,3
G2S → LA	100,7	98,3
G(P)2S → LA	100,7	98,3
G(P) → L	n.d.	100,5
G(P) → LA2S	n.d.	96,7

n.d.= não determinado

As galactanas produzidas pelas algas *C. seminervis* e *C. crenulata* possuem algumas similaridades: (1) todas unidades de 3,6-anidro-2-O-metilgalactose pertencem a série enantiomérica L-; (2) quase todas unidades de 2-, 4- e 6-O-metilgalactose pertencem a série enantiomérica D-. Enquanto que as principais diferenças entre as famílias destas galactanas consistem: (1) na elevada quantidade de L-açúcares nas galactanas de *C. seminervis*, a qual corrobora com estruturas majoritárias de agaranas e valores de rotação óptica negativa. Enquanto que nas galactanas de *C. crenulata* prevalecem estruturas de carragenanas, o que resulta em valores de rotação óptica positiva; (2) na natureza e posição das glicosilações, que podem ser compostas por D-xilose e/ou D-galactose em C-6 das unidades A para as galactanas de *C. crenulata* e D-xilose e/ou 4-O-metil-D-galactose dispostas em C-6 das unidades A e/ou em C-2 das unidades de 3,6-anidro-L-galactose (unidades B) para as galactanas de *C. seminervis*; (3) em *C. crenulata* há substituições por acetal de ácido pirúvico a cada 30-40 unidades monoméricas, enquanto que em *C. seminervis* estas substituições ocorrem a cada 8-12 unidades.

É importante ressaltar que valores absolutos altos (60-70°) e negativos de rotação óptica específica condizem com galactanas do tipo agaranas, as quais possuem unidades B pertencentes à série enantiomérica L-. Enquanto valores absolutos altos e positivos estão correlacionados com galactanas do tipo carragenanas (unidades B pertencentes à série D-). As galactanas majoritárias sintetizadas pelas algas do gênero *Cryptonemia* possuem rotação óptica com valores intermediários entre os extremos (-8,0° para *C. seminervis* e +23,5° para *C. crenulata*), de forma que a rotação óptica negativa ou positiva indica a prevalência



entre as estruturas de agaranas ou carragenanas (ESTEVEZ et al., 2001; ZIBETTI et al., 2005; ZIBETTI et al., 2009).

Outra particularidade na estrutura das galactanas de *C. crenulata* e *C. seminervis* é a característica dos grupos substituintes: hidrofóbicos (metoxil e unidades ciclizadas em 3,6-anidrogactose) e hidrofílicos (sulfato e glicosilações), os quais estão presentes em diferentes unidades estruturais. Somando-se a estes grupos ainda ocorre a substituição por acetal de ácido pirúvico, o qual encerra ambas as características, hidrofobicidade do grupo metil e hidrofiliçidade do grupo carboxil (ZIBETTI et al., 2009).

Destaca-se que a galactana majoritária de *C. crenulata* apresenta atividade biológica contra alguns vírus envelopados (TALARICO et al., 2004; TALARICO et al., 2005; TALARICO et al., 2007).

## 2.6 ATIVIDADE BIOLÓGICA DE GALACTANAS

As diversas funções desempenhadas por carboidratos em sistemas biológicos correlacionam-se com a complexidade e diversidade estrutural destas moléculas. Polissacarídeos e oligossacarídeos agem no reconhecimento e adesão célula-célula, migração celular, resposta imune, cicatrização de lesões, entre outros. De forma que carboidratos apontam como moléculas com grande potencial biotecnológico.

O caráter ácido das galactanas sulfatadas as permite ligar proteínas de caráter básico, em diferentes níveis de especificidade. Esta característica direciona suas propriedades físico-químicas, de forma que podem se ligar e modificar a atividade de diversas proteínas, acarretando atividades biológicas não específicas. No entanto, diversos sistemas polissacarídicos com diferentes padrões de sulfatação destacam-se por conferir alta afinidade por uma proteína em particular e sinalizam eventos de reconhecimento celular e molecular. Interações complexas entre proteínas e galactanas sulfatadas influenciam a difusão das proteínas através dos tecidos e modelam a resposta celular a estas moléculas (MULLOY, 2005).

Sabe-se que substâncias polianiônicas causam efeitos inibitórios na replicação de diversos vírus. Por isso os polissacarídeos sulfatados obtidos de algas marinhas apresentam grande potencial antiviral (WITVROUW e DE CLERQC, 1997).

A atividade antiviral contra vírus envelopados (vírus que apresentam uma camada lipídica envolvendo o capsídeo viral) aumenta com o aumento da massa molecular e com o grau de sulfatação. O mecanismo de ação antiviral de polissacarídeos sulfatados pode estar correlacionado com o bloqueio dos sítios carregados negativamente localizados nas glicoproteínas do envelope viral. Estas são essenciais na aderência do vírus à superfície celular. A camada de heparan sulfato na superfície da célula é o sítio de ligação primário, depois outras interações mais específicas ocorrem entre receptores CD4 e células CD4<sup>+</sup>, portanto, em geral, as galactanas sulfatadas atuam bloqueando a adesão dos vírus às células (WITVROUW e DE CLERQC, 1997).

As carragenanas da alga *Gigartina skottsbergii* (Gigartinales) foram testadas contra o vírus *Herpes simplex* (HSV) tipos 1 e 2 e revelaram uma inibição seletiva na replicação viral *in vitro*. A atividade antiviral foi correlacionada com os resíduos de  $\alpha$ -D-galactose 2,6-disulfato presentes no polissacarídeo. Possivelmente estes resíduos mimetizam os grupos sulfato das unidades de  $\alpha$ -D-glucosamina 2,6-disulfato do heparan sulfato presente na superfície celular. Galactanas submetidas a tratamento alcalino (maior número de unidades ciclizadas em 3,6-anidrogactose) tiveram atividade antiviral consideravelmente reduzida (CARLUCCI et al., 1997).

O grau de sulfatação, a posição dos grupos sulfato e o peso molecular dos polissacarídeos estão correlacionados com a atividade antiviral destas moléculas.

Duarte et al. (2001) testaram a atividade de agaranas sulfatadas obtidas de *Bostrychia montagnei* (Ceramiales) frente aos vírus HSV-1 e HSV-2, causadores do herpes labial e genital, respectivamente. As frações polissacarídicas testadas apresentam sulfato em C-6 e C-4 das unidades A e em C-3 das unidades B. A atividade antiviral mostrou-se durante o período de adsorção viral às células, porém apenas para as galactanas com maior grau de sulfatação (22,0-24,0% NaSO<sub>3</sub>) e maior peso molecular (34.000-43.700 Da). Os autores destacam que o padrão de sulfatação observado não é estritamente necessário para o bloqueio da infecção viral, visto que as galactanas com o mesmo padrão de substituições por sulfato, baixo peso molecular e baixo grau de sulfatação não apresentam atividade. Deste modo, a atividade diferencial dos extratos pode estar correlacionada com a distribuição dos grupos sulfato e conseqüentemente com a conformação estrutural das cadeias polissacarídicas.

Agarinas sulfatadas com unidades A altamente sulfatadas em C-2 e unidades B 6-O-sulfatadas, obtidas da alga *Acanthophora spicifera* (Ceramiales), apresentam altos índices de atividade contra os vírus HSV-1 e HSV-2. Estas agarinas parecem repetir em suas unidades dissacarídicas um padrão de sulfatação que se assemelha à sequência mínima de ligação ao heparan sulfato e pode ser responsável pela atividade antiviral (DUARTE et al., 2004).

Modelos moleculares das zonas de ligação iônicas mínimas verificados na presença de grupos 2-O e 6-O-sulfato direcionados para o mesmo lado da molécula apresentam superfícies mais ou menos hidrofóbicas devido a ligações C-H axiais e orbitais com pares de elétrons não compartilhados. O ajuste das cargas negativas e superfícies hidrofóbicas do polissacarídeo à zona de ligação da glicoproteína C viral pode ser facilitado pela rotação das unidades de açúcar através de suas ligações glicosídicas. As forças iônicas e hidrofóbicas atuam em conjunto na formação do complexo polissacarídeo sulfatado-superfície viral, resultando num efeito sinérgico de estabilização. As forças hidrofóbicas são fortalecidas pela alta força iônica produzida pelos grupos carregados (DUARTE et al., 2004).

O dissacarídeo agarobiitol 2<sup>2</sup>-sulfato e glicosídeos semi-sintéticos sulfatados e alquilados (compostos **12**, **13**, **22** e **iso-mix**<sup>2</sup> - Figura 21), obtidos de polissacarídeos sulfatados de algas marinhas e modificados quimicamente, foram submetidos a ensaios de atividade antiviral frente aos vírus HSV-1 (F), HSV-2 (G) e HSV-1 (MS) (cepa responsável por casos de herpes genital em pacientes acometidos por esclerose múltipla). Os resultados mostram que o composto **22** é ativo contra as três cepas de HSV estudadas, apresentando CI<sub>50</sub><sup>3</sup> igual a 29,82; 24,80 e 15,08 µg/mL contra HSV-1 (F), HSV-2 (G) e HSV-1 (MS), respectivamente; a mistura **iso-mix** é ativa apenas contra HSV-1 (F) (CI<sub>50</sub> igual a 36,1 µg/mL), porém com atividade inferior ao composto **22**; e os compostos **12**, **13** e agarobiitol 2<sup>2</sup>-sulfato não apresentaram atividade significativa contra HSV-1 (F) e portanto não foram testados perante outras cepas (GONÇALVES, 2005).

---

<sup>2</sup> iso-mix é uma mistura de isômeros disulfatados/monoalquilados, em que o principal componente é o glicosídeo β-D-galactopiranosose 3,6-dissulfato-(1→4)-3,6-anidro-1-tetradecil-L-galactitol.

<sup>3</sup> CI<sub>50</sub> = concentração inibitória 50%, que corresponde à concentração de determinado composto que ocasiona 50% de inibição na formação de placas de virais.

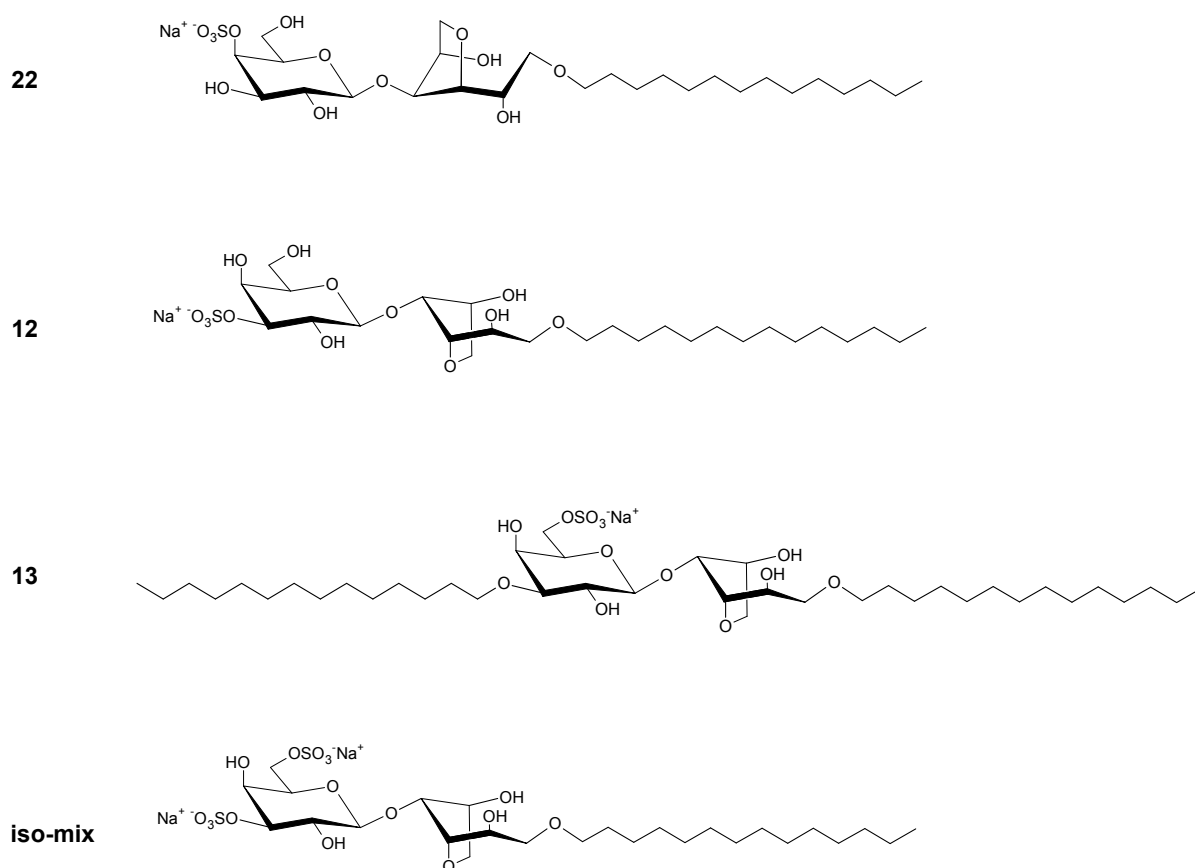


FIGURA 21 - ALQUILGLICOSÍDEOS SULFATADOS SUBMETIDOS AOS ENSAIOS DE ATIVIDADE ANTI-HSV (GONÇALVES, 2005)

A relação entre alta massa molecular e a atividade antiviral é afirmada pela falta de atividade do dissacarídeo agarobiitol 2<sup>2</sup>-sulfato, enquanto seu polissacarídeo precursor, agarose 2-sulfato, apresenta atividade anti-HSV (DUARTE et al., 2004). Ainda é possível inferir que o fator hidrofobicidade é menos importante que o grau de sulfatação, visto os resultados para o composto **13** e mistura **iso-mix**. As únicas diferenças entre os compostos **12** e **22** consistem na posição dos grupos sulfato e na configuração absoluta das unidades galactitol. De forma que a atividade antiviral do composto **22** foi correlacionada com o grupo sulfato em C-4 do anel  $\beta$ -galactosídico e/ou com a isomeria óptica da unidade de 3,6-anidrogactitol, pertencente a série D (GONÇALVES, 2005).

No entanto, segundo Duarte et al. (2004), a enantiomeria das unidades B não consiste em fator de primeira importância na atividade antiviral. A configuração destas unidades influenciaria apenas na possibilidade dos polissacarídeos em adequar sua forma para posicionar os grupos sulfato na formação do complexo polissacarídeo-vírus.

Estudos com a galactana homogênea C2S-3 de *C. crenulata* mostram a atividade anti-HSV desta fração contra cepas de HSV-1 e HSV-2 resistentes a Acyclovir<sup>®</sup> com baixíssima citotoxicidade (TALARICO et al., 2004). Segundo Zibetti et al. (2005), o detalhe estrutural representado pela díade G2S → D(L)6S, presente na fração C2S-3, é estruturalmente análogo a sequência mínima de ligação necessária para a interação do heparan sulfato com a glicoproteína gC do vírus da herpes e portanto responsável pela promissora atividade anti-HSV observada. Esta galactana apresentou ainda uma potente inibição seletiva contra a multiplicação do subtipo DENV-2 do vírus da dengue em células Vero, com efetividade muito maior que a heparina, polissacarídeo padrão de referência (TALARICO et al., 2005 e 2007).

### 3 JUSTIFICATIVA

A obtenção de oligossacarídeos a partir de galactanas complexas através de hidrólise redutiva parcial auxilia na caracterização estrutural destas moléculas. Porém o rendimento dos oligossacarídeos é dependente dos padrões de substituição e regularidade do polissacarídeo, o que pode resultar em baixos rendimentos dos oligossacarídeos isolados após purificação.

Além disso, oligossacarídeos de tamanho muito reduzido, em geral, mesmo que sulfatados, não apresentam atividade antiviral.

Tendo em vista a complexidade estrutural da família de galactanas biossintetizada por *C. seminervis* e o potencial antiviral se seus polissacarídeos, a utilização da hidrólise redutiva parcial em condições suaves quanto a concentração de ácido e tempo de hidrólise, permite a obtenção de moléculas despolimerizadas que podem esclarecer a dispersão estrutural dos polissacarídeos produzidos pela alga, bem como podem ser testadas em ensaios de atividade biológica como atividade antiviral.

A determinação da estrutura química fina das frações despolimerizadas poderá permitir correlações entre estrutura química e atividade antiviral.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho teve por objetivo geral o estudo da estrutura química dos produtos de hidrólise redutiva parcial obtidos a partir de galactanas sulfatadas do tipo DL-híbrida isoladas da macroalga *Cryptonemia seminervis* (Halymeniales, Rhodophyta), bem como a avaliação da atividade antiviral destes compostos.

### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Extração em meio aquoso das galactanas sulfatadas de *C. seminervis*
- Hidrólise redutiva parcial das galactanas sulfatadas para obtenção de produtos de menor massa molecular (galactanas despolimerizadas)
- Purificação das galactanas despolimerizadas por método cromatográfico
- Determinação da estrutura química das galactanas despolimerizadas homogêneas por métodos químicos e espectroscópicos
- Avaliação da atividade anti-HSV das galactanas sulfatadas despolimerizadas obtidas de *C. seminervis*
- Correlação entre estrutura química de galactanas sulfatadas e atividade anti-HSV

## 5 MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Exemplares da alga *Cryptonemia seminervis* (C. Agardh) J. Agardh, pertencente à divisão Rhodophyta, classe Florideophyceae, ordem Halymeniales, família Halymeniaceae, foram coletados em substratos rochosos da praia de Marataízes, no estado do Espírito Santo, Brasil, em fevereiro de 2009.

Os exemplares de alga foram lavados com água doce, secos à sombra, moídos em moinho de faca (WILEY MILL) e depois submetidos aos processos de extração.

### 5.2 EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS

A alga seca e moída (30 g) foi submetida a nove extrações sequenciais com tampão fosfato 0,025M, pH 6,5 (1,5% m/v) sob agitação mecânica por seis horas a 80°C. Os extratos foram reunidos e centrifugados (10.000 g por 5 minutos). Após evaporação à pressão reduzida a fim de se reduzir o volume, o sobrenadante foi adicionado de três volumes de etanol. A solução ficou em repouso a 4°C por 90 minutos então foi adicionado acetato de potássio (0,1% m/v), que auxilia na precipitação dos polissacarídeos. Após centrifugação (10.000 g por 10 minutos), o precipitado etanólico foi ressolubilizado em água destilada e dialisado seqüencialmente contra água destilada, NaCl 1M, água destilada e liofilizado, originando a fração polissacarídica bruta S. A retirada do sal em excesso na diálise foi monitorada com o teste do AgNO<sub>3</sub> (ASSUMPÇÃO e MORITA, 1968), que indica a presença dos íons Cl<sup>-</sup>.

### 5.3 TRATAMENTO DOS POLISSACARÍDEOS

A fração S foi solubilizada em água destilada (0,25% m/v) e adicionada de KCl sólido (concentração final 2M) sob agitação até completa solubilização, permanecendo em repouso por seis horas a 2°C. A centrifugação (11.100 g por 30



minutos) do extrato polissacarídico tratado originou um precipitado e um sobrenadante, os quais foram dialisados contra água destilada e liofilizados. De forma que o tratamento com KCl 2M originou a fração SP insolúvel em KCl 2M e a fração SS solúvel (Figura 26).

## 5.4 MÉTODOS ANALÍTICOS GERAIS

### 5.4.1 DOSAGEM DE AÇÚCAR TOTAL

As dosagens de açúcar total (carboidratos) foram realizadas pelo método colorimétrico do fenol - ácido sulfúrico (DUBOIS et al., 1956), que possui intervalo linear entre 10 - 85  $\mu\text{g}$  de galactose. As amostras foram preparadas em triplicata e as leituras foram realizadas em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 490nm. As curvas-padrão foram montadas a cada dosagem utilizando-se como padrão galactose em concentrações equivalentes a 10, 30, 50, 70 e 80  $\mu\text{g}$  de açúcar. As amostras foram diluídas em soluções aquosas de 1mg/mL, sendo utilizados 70 $\mu\text{L}$  desta solução para a dosagem.

### 5.4.2 DOSAGEM DE PROTEÍNAS TOTAIS

As dosagens de proteínas totais foram realizadas por método colorimétrico (LOWRY et al., 1951) com intervalo linear entre 5 - 100  $\mu\text{g}$  de proteína. As amostras foram preparadas em triplicata e as leituras foram realizadas em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 660nm. As curvas-padrão foram preparadas a cada dosagem utilizando-se como padrão soro-albumina bovina cristalina em concentrações equivalentes a 10, 20, 40, 60 e 80  $\mu\text{g}$  de proteína. As amostras foram diluídas em água na concentração de 1mg/mL, sendo utilizados 500 $\mu\text{L}$  da solução de amostra na dosagem.

#### 5.4.3 DOSAGEM DE SULFATO

Os teores de sulfato foram determinados pelo método de Dodgson (1961), após hidrólise das amostras com HCl 1M durante 5 horas a 105-110°C. Às amostras adiciona-se o reativo gelatina-bário, no qual o cloreto de bário está solúvel e ao entrar em contato com o sulfato da amostra forma o sal insolúvel sulfato de bário, que fica suspenso no fluido gelatinoso, resultando na turbidez do meio reacional. O padrão utilizado consiste em uma solução de sulfato de sódio diluída em HCl 1M, na concentração 1mg/mL. As amostras foram organizadas em triplicata e as leituras foram realizadas em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 360nm. A linearidade do método é de 20 - 200 µg de sulfato. As curvas-padrão foram preparadas a cada dosagem utilizando-se o padrão em concentrações equivalentes a 30, 60, 90, 120 e 150 µg de sulfato de sódio. O peso das amostras variou entre 2 a 4 mg antes da solubilização em HCL 1M para hidrólise. Os valores das massas pesadas foram anotados para correção da porcentagem de sulfato após a dosagem.

#### 5.4.4 DETERMINAÇÃO DA ROTAÇÃO ÓPTICA

A determinação da rotação óptica específica ( $[\alpha]_D$ ) foi realizada a 20°C em polarímetro Rudolph Research, modelo Autoplol III, com as amostras na concentração de 0,2% (m/v) em água. Os valores de rotação óptica específica foram calculados pela seguinte fórmula:

$$[\alpha]_D = \alpha \cdot 100 / L \cdot C$$

$\alpha$  é a rotação observada em graus (valor obtido no equipamento)

L é o comprimento do caminho óptico em dm

C é a concentração da solução em g/100mL

As amostras foram centrifugadas antes da análise e após liofilização do precipitado, o material recuperado permitiu a correção da concentração utilizada na análise.

## 5.5 HIDRÓLISES

### 5.5.1 HIDRÓLISE ÁCIDA TOTAL

A hidrólise ácida total (MATULEWICZ et al., 1990) na presença de ácido fórmico 45% a 100°C por 16 horas foi realizada para a quantificação de 3-O-metil e 4-O-metilgalactose. As amostras foram reduzidas com boroidreto de sódio deuterado (NaBD<sub>4</sub>) por 12 horas e depois neutralizadas com ácido acético para retirada do excesso de agente redutor. Posteriormente as amostras foram co-distiladas três vezes com metanol, o que permite a retirada do ácido bórico produzido, na forma de borato de trimetila, um composto volátil. Após liofilização, as amostras foram adicionadas de ácido acético anidro e aquecidas por 90 minutos a 120°C.

As amostras na forma de alditol acetato com a ponta redutora adicionada de um deutério foram submetidas a cromatografia líquido-gasosa acoplada a espectrometria de massa (CLG-EM).

### 5.5.2 HIDRÓLISE ÁCIDA TOTAL DO TIPO REDUTIVA

As composições monossacarídicas foram determinadas com 0,7 - 1 mg de polissacarídeo, de acordo com o método de Jol et al. (1999), modificado de Stevenson e Furneaux (1991), que se processa pela chamada hidrólise ácida total do tipo hidrólise redutiva, que utiliza ácido trifluoracético (TFA) e agente redutor complexo borano 4-metil-morfolina (B 4-MM) na concentração de 80mg/mL.

O método se processa em duas etapas de hidrólise: (1) as amostras são adicionadas de 100 µL de TFA 6M e agente redutor B 4-MM (100 µL) e aquecidas a 80°C por 30 minutos; após a hidrólise suave adiciona-se mais agente redutor (100 µL) e as amostras são evaporadas até adquirirem aspecto de xarope; (2) a hidrólise intensa é realizada na presença de 100 µL de TFA 4M e 100 µL de agente redutor a 120°C por 90 minutos; após a segunda hidrólise são adicionados 100 µL de agente redutor, as amostras são evaporadas até secura e acetiladas.

A acetilação foi realizada em presença de TFA. Os derivados alditóis foram solubilizados em ácido acético anidro e TFA na proporção de 2:1, mantidos a 50°C por 15 minutos. As amostras na forma de alditol acetato foram extraídas em clorofórmio, lavadas com bicarbonato de sódio e água, para retirada dos ácidos e

sais formados. Após evaporação do clorofórmio as amostras foram analisadas por cromatografia líquido-gasosa acoplada a espectrometria de massa (CLG-EM).

### 5.5.3 HIDRÓLISE REDUTIVA PARCIAL

A hidrólise reductiva parcial foi realizada segundo o método de Usov e Elashvili (1991) (TFA 2M, 65°C por 8h na presença do complexo redutor borano 4-metil-morfolina), salvas algumas modificações na concentração do TFA e no tempo de hidrólise, conforme as condições utilizadas por ZIBETTI et al. (2005 e 2009). A fração polissacarídica SS (1,1 g) foi solubilizada em água destilada (73 mL) e adicionada de complexo borano 4-metil-morfolina (6,6 g). A dissolução de do agente redutor foi realizada com auxílio de temperatura (65°C). Então foi adicionado TFA 1,5M (25 mL) (concentração final 0,38M de TFA). A mistura foi mantida a 65°C por 6 horas. Ao término deste intervalo o resíduo de TFA foi removido por co-distilação com água destilada à pressão reduzida. Para a retirada do resíduo de agente redutor utilizou-se diálise contra água destilada em membrana de 6.000 - 8.000 Da. Assim moléculas maiores que 6.000 Da foram retidas pela membrana, enquanto oligossacarídeos menores e resíduos reacionais permaneceram na água de diálise.

Os produtos da hidrólise reductiva parcial da fração polissacarídica SS foram denominados DS. Esta fração DS, após o processo de purificação por diálise, originou as frações DSi e DSo, que correspondem a fração retida na membrana e à água de diálise, respectivamente.

## 5.6 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

### 5.6.1 FRACIONAMENTO DAS GALACTANAS OBTIDAS POR HIDRÓLISE REDUTIVA PARCIAL

A fração DSi (789 mg) foi submetida a cromatografia de troca aniônica em coluna de vidro (24 cm x 5 cm d.i.) contendo DEAE-Sephacel (Cl<sup>-</sup>). A amostra foi eluída com água destilada e soluções de cloreto de sódio em concentrações crescentes (0,25; 0,50; 0,75; 1,0; 1,5 e 2,0M de NaCl). As eluições foram monitoradas pelo teste colorimétrico do fenol - ácido sulfúrico (DUBOIS et al., 1956).

As amostras recuperadas do fracionamento por troca iônica, após evaporação à pressão reduzida e diálise em água destilada até  $\text{Cl}^-$  negativo (teste do  $\text{AgNO}_3$  - ASSUMPÇÃO e MORITA, 1968) foram liofilizadas e denominadas DSi-w, para a fração eluída com água e DSi-1, DSi-2, DSi-3, DSi-4, DSi-5 e DSi-6 para as frações eluídas com soluções de NaCl 0,25; 0,50; 0,75; 1,0; 1,5 e 2,0M, respectivamente.

A fração DSi-2, de maior rendimento, foi recromatografada nas mesmas condições que DSi, originando as frações DSi-2w, DSi-2a, DSi-2b, DSi-2c, DSi-2d, DSi-2e, DSi-2f, DSi-2g e DSi-2h eluídas com água e soluções de NaCl 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7 e 1,0M, respectivamente (Figura 26).

### 5.6.2 CROMATOGRAFIA LÍQUIDO-GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSA (CLG-EM)

As análises cromatográficas em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas foram realizadas em cromatógrafo a gás da marca Varian 3800, equipado com coluna capilar de sílica fundida (30 m x 0,25 mm d.i., 0,25  $\mu\text{m}$ ) DB-225MS (Durabond) e um espectrômetro de massa do tipo *Ion Trap*, marca Varian Saturn 2000R. A temperatura do injetor foi de 250°C e a temperatura inicial do forno foi de 50°C, seguido de aumento gradual de 40°C por minuto, até 220 °C para alditol acetato e 210°C para alditol acetato parcialmente metilado, mantendo-se constante a partir de 25 e 30 minutos, respectivamente. Utilizou-se como gás de arraste o gás hélio com fluxo de 1,0 mL/minuto. Os espectros de massas foram obtidos por impacto de elétrons a 70 eV, com  $m/z$  (relação massa/carga) de 80 a 220. Os cromatogramas foram analisados e integrados em software Saturn Workstation 5.1. Esse método foi utilizado para quantificação relativa de acetatos de alditóis e acetatos de alditóis permetilados, sendo identificados por meio de seus tempos de retenção e perfis característicos de fragmentação por impacto de elétrons (JANSSON et al., 1976) e comparados com padrões produzidos por SASSAKI et al. (2005).

### 5.6.3 CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO ESTÉRICA DE ALTA PRESSÃO (HPSEC) ACOPLADA A DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO (IR) DIFERENCIAL E ESPALHAMENTO DE LUZ EM MULTIÂNGULOS (MALLS)

Para as análises de homogeneidade e de determinação da massa molecular ponderal média ( $M_w$ ) foram preparadas soluções de 1 mg de amostra em 1 mL de nitrito de sódio ( $\text{NaNO}_3$  0,1M) e azida de sódio ( $\text{NaN}_3$  200ppm) dissolvidas em água MilliQ. As amostras foram filtradas em membrana Millipore (acetato de celulose) de  $0,22\mu\text{m}$ .

Os ensaios de homogeneidade e determinação da massa molecular foram realizados em cromatógrafo de exclusão estérica de alta pressão (HPSEC) WATERS, equipado com um detector de índice de refração (IR) diferencial WATERS modelo 2410 e com detector de espalhamento de luz em multiângulos (MALLS) WAYTT TECHNOLOGY, modelo DAWN DSP, com 18 detectores dispostos ao redor da fotocélula em diferentes ângulos. Utilizaram-se quatro colunas de gel filtração WATERS, com limites de exclusão de  $7 \times 10^6$ ,  $4 \times 10^5$ ,  $8 \times 10^4$  e  $5 \times 10^3$  (Colunas Ultrahydrogel<sup>tm</sup> 2000, 500, 250 e 120, respectivamente) em série. O eluente utilizado foi uma solução de nitrito de sódio ( $\text{NaNO}_3$  0,1M) contendo azida de sódio ( $\text{NaN}_3$  200 ppm), pressão de 920 psi a  $20^\circ\text{C}$ .

A taxa de variação do índice de refração com relação à concentração ( $dn/dc$ ) foi determinada para amostras homogêneas, utilizando soluções de 0,2; 0,4; 0,6 e 0,8 mg das amostras em 1 mL de nitrito de sódio ( $\text{NaNO}_3$  0,1M) e azida de sódio ( $\text{NaN}_3$  200 ppm). As massas molares foram determinadas a partir do perfil de eluição e valores de  $dn/dc$ . Os cálculos foram efetuados pelo software ASTRA.

## 5.7 DETERMINAÇÃO DA CONFIGURAÇÃO ABSOLUTA

A determinação da configuração absoluta das unidades de galactose e suas variantes foi realizada pelo método descrito por Navarro e Stortz (2003). Nesta metodologia os polissacarídeos sofrem aminação redutiva (agente redutor cianoborohidreto de sódio), na presença da amina quiral (S)-1-amino-2-propanol ou (S)- $\alpha$ -metilbenzilamina e acetilação, formando assim os derivados 1-deoxi-1-(2'-hidroxipropilamina) ou 1-deoxi-1-(1'-feniletilamina) alditóis, respectivamente. Os

alditóis são separados e quantificados por CLG-EM. Para verificação da enantiomericidade da galactose e dos seus derivados naturalmente metilados 6-O-, 4-O- e 3-O-metilgalactose utiliza-se a amina quiral (S)-1-amino-2-propanol, enquanto que a os monossacarídeos 2-O-metilgalactose, 3,6-anidrogactose e 2-O-metil-3,6-anidrogactose devem ser derivatizados com (S)- $\alpha$ -metilbenzilamina.

A análise dos derivados aminados foi realizada por cromatografia líquido-gasosa acoplada a espectrometria de massa (CLG-EM) em equipamento Varian 3800, detector do tipo *Ion Trap* 4000 MS, utilizando-se coluna Agilent/Varian VF1-MS (30m x 0,25mm d.i.), hélio como gás de arraste com fluxo de 1mL/minuto, pressão de 17,7 psi com razão de split de 1:10. O programa de injeção utilizado para os derivados 1-deoxi-1-(2'-hidroxipropilamina) alditóis foi iniciado com 50°C, mantido por 1 minuto, seguido de aumento gradual de 20°C por minuto, até 200°C, então 5°C por minuto até 250°C completando 40 minutos. Para os derivados 1-deoxi-1-(1'-feniletilamina) alditóis o programa de injeção foi iniciado com 50°C, mantido por 1 minuto, seguido de aumento gradual de 20°C por minuto, até 230°C.

## 5.8 DESSULFATAÇÃO POR TRATAMENTO SOLVOLÍTICO

### 5.8.1 PREPARO DO SAL DE PIRIDÔNIO

O processo de solvólise foi conduzido com os polissacarídeos na forma de sal de piridônio. Este sal é formado através da solubilização dos polissacarídeos em água e adição da resina catiônica Dowex 50 x 8 na forma H<sup>+</sup>, sob agitação magnética a temperatura ambiente por 30 minutos. O filtrado foi neutralizado com piridina, até pH 7,0 e liofilizado (NAGASAWA et al., 1979).

### 5.8.2 SOLVÓLISE

O polissacarídeo, na forma de sal de piridônio, foi solubilizado em uma mistura de dimetilsulfóxido (DMSO), metanol e piridina, na proporção de 89:10:1 v/v/v, respectivamente, respeitando-se a relação de 10 mg de polissacarídeo para 3 mL de mistura (NAGASAWA et al., 1979).

A solução resultante foi mantida a 100°C durante 4 horas. Após o resfriamento, as amostras solvolisadas foram dialisadas contra água destilada e então liofilizadas. Os polissacarídeos dessulfatados foram identificados pela adição da letra “D” (dessulfatados) ao nome da fração original e analisados quanto a sua composição monossacarídica (5.5.2) e teor de sulfato (5.4.3).

## 5.9 ANÁLISE DE METILAÇÃO

### 5.9.1 PREPARO DO SAL DE TRIETILAMÔNIO

Os polissacarídeos devem apresentar-se na forma de sal de trietilamônio para que possam permanecer solúveis no meio reativo do processo de metilação (STEVENSON e FURNEAUX, 1991). Desta forma, 5 - 10 mg das amostras polissacarídicas foram solubilizadas em água e colocadas em diálise contra solução de trietilamina 1% (m/v) durante 24h. Depois de 5h em diálise contra água destilada com três trocas da água de diálise, os polissacarídeos foram liofilizados.

### 5.9.2 METILAÇÃO E DERIVATIZAÇÃO

O processo de metilação dos polissacarídeos na forma de sal de trietilamônio foi conduzido de acordo com o método de Ciucanu e Kerek (1984). Após solubilização dos polissacarídeos em DMSO (1 mL/15 mg de polissacarídeo), adicionou-se hidróxido de sódio (NaOH) pulverizado (30 mg) e a mistura permaneceu sob agitação mecânica vigorosa por 30 minutos. Após esse intervalo de tempo, adicionou-se ao meio iodometano (ICH<sub>3</sub>) (0,1 mL/15 mg de polissacarídeo) sob agitação mecânica vigorosa por mais 30 minutos. Este processo (adição de NaOH e iodometano) foi repetido por mais duas vezes, completando-se assim a primeira etapa de metilação. As frações sofreram duas ou três etapas de metilação, sendo que após cada etapa as frações foram neutralizadas (ácido acético), dialisadas contra água destilada e liofilizadas, seguindo-se de hidrólise ácida total do tipo hidrólise redutiva (Jol et al., 1999), acetilação (5.5.2) e análise por CLG-EM, na forma de acetatos de alditóis parcialmente metilados.



## 5.10 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)

As análises de ressonância magnética nuclear mono e bidimensionais foram realizadas em espectrômetro da marca BRUKER, modelo DRX 400, série Avance, em tubos de 5 mm de diâmetro, sendo as amostras dissolvidas em água deuterada 99% (D<sub>2</sub>O). Os deslocamentos químicos, expressos em ppm, foram determinados utilizando acetona como padrão interno, tanto para as análises de <sup>13</sup>C (30,20 ppm) como para <sup>1</sup>H (2,224 ppm).

### 5.10.1 TÉCNICAS DE RMN MONODIMENSIONAIS

#### 5.10.1.1 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE CARBONO-13 (RMN DE <sup>13</sup>C)

Os espectros desacoplados de RMN de <sup>13</sup>C foram obtidos na frequência base de 100,61 MHz, com intervalo de aquisição de sinal de 0,6 segundos, fazendo-se, em média, 66.400 aquisições, utilizando-se um intervalo de 0,1 segundo entre os pulsos. As amostras foram dissolvidas em D<sub>2</sub>O, em uma concentração de ~40 mg/mL.

#### 5.10.1.2 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE CARBONO-13 DEPT (*Distortionless Enhancement by Polarization*)

Os experimentos de DEPT diferem quanto ao ângulo de transferência de polarização ( $\theta_z = 45^\circ, 90^\circ$  ou  $135^\circ$ ) para observar os carbonos (<sup>13</sup>C) acoplados a hidrogênios (<sup>1</sup>H). A variação do ângulo na transferência de polarização permite a visualização de carbonos CH, CH<sub>2</sub> e/ou CH<sub>3</sub> como sinais negativos em relação à linha de base, sendo que em qualquer experimento de DEPT os sinais de carbonos não ligados diretamente a hidrogênios não aparecem.

Nos experimentos de RMN de <sup>13</sup>C-DEPT foram utilizados o ângulo  $\theta_z$  de  $135^\circ$ , situação em que os carbonos CH e CH<sub>3</sub> aparecem em fase positiva em relação à linha de base, enquanto carbonos CH<sub>2</sub> aparecem em fase negativa. Os espectros foram obtidos na frequência base de 100,61 MHz, com intervalo de aquisição de sinal de 0,6 segundos, fazendo-se, em média, 23.000 aquisições, utilizando-se um

intervalo de 0,1 segundo entre os pulsos. As amostras foram dissolvidas em D<sub>2</sub>O, em uma concentração de ~40 mg/mL.

#### 5.10.1.3 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE HIDROGÊNIO (RMN DE <sup>1</sup>H)

Os espectros de RMN de <sup>1</sup>H foram obtidos na frequência base de 400,13 MHz, sendo necessário promover a troca dos hidrogênios das hidroxilas por deutério e a remoção das moléculas de água presentes, através da dissolução das frações em D<sub>2</sub>O, congelamento e liofilização (este processo foi repetido por, no mínimo, três vezes), com a finalidade de diminuir a intensidade do sinal relativo ao hidrogênio ligado a oxigênio, o qual prejudica a qualidade do espectro obtido. As amostras foram dissolvidas em D<sub>2</sub>O, em uma concentração de ~10 mg/mL.

#### 5.10.2 TÉCNICAS DE RMN BIDIMENSIONAIS

##### 5.10.2.1 COSY (*Correlation Spectroscopy*)

Esta é uma técnica homonuclear utilizada para correlacionar os deslocamentos químicos dos núcleos de <sup>1</sup>H que estão acoplados um com o outro. Assim, nos carboidratos o H-1 de um monossacarídeo apresenta acoplamento com o H-2 da mesma unidade, sendo possível observar esta interação na forma de um pico cruzado (*cross peak*) entre os mesmos sinais, quantificar esta interação através da determinação da constante de acoplamento (<sup>3</sup>J) e ainda determinar o deslocamento químico do H-2 a partir do H-1. Desta forma a partir do sinal de H-2 pode ser determinado o H-3 e assim sucessivamente ao longo do anel. Como cada unidade monossacarídica apresenta um padrão de constantes de acoplamento característico, com estes resultados é possível determinar o tipo de açúcar presente na estrutura.

#### 5.10.2.2 HSQC (*Heteronuclear Single Quantum Coherence*)

Esta técnica heteronuclear, permite determinar quais átomos de hidrogênio ( $^1\text{H}$ ) estão ligados aos respectivos átomos de carbono ( $^{13}\text{C}$ ) a partir de sinais de  $^{13}\text{C}$  conhecidos ou de  $^1\text{H}$  já determinados por COSY ou pela literatura.

As amostras para os experimentos bidimensionais seguem o mesmo protocolo do preparo para RMN de  $^1\text{H}$ .

### 5.11 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-HSV DAS GALACTANAS DE *C. seminervis*

As análises antivirais apresentadas neste trabalho foram realizadas no laboratório de Virologia do Departamento de Virologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) pelo grupo de pesquisa orientado pela Professora Dra. Maria Teresa Villela Romanos.

#### 5.11.1 CÉLULAS

As células utilizadas nos ensaios antivirais foram células Vero (linhagem de células de rim de macaco verde africano *Cercopitheccus aethiops*), crescidas em meio mínimo essencial de Eagle (MEM) suplementado com L-glutamina 2mM, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$  de gentamicina, 2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$  de fungizona e 10% de soro fetal bovino (SFB), mantidas a 37°C em ambiente contendo 5% de  $\text{CO}_2$ .

#### 5.11.2 VÍRUS

Os vírus Herpes simplex tipos 1 e 2 (HSV-1 e HSV-2) foram isolados de lesões labiais e genitais, respectivamente, no Departamento de Virologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). As amostras foram tipadas por reação em cadeia da polimerase (PCR) usando *primers* específicos (MARKOULATOS et al., 2001).

### 5.11.3 TITULAÇÃO VIRAL

A titulação dos vírus foi realizada com a finalidade de estabelecer a dose capaz de produzir efeito citopatogênico em 50% das células em cultura (TCID<sub>50</sub>/mL), de acordo com o cálculo estabelecido por Reed e Muench (1938).

Foram feitas diluições logarítmicas decimais ( $10^{-1}$  a  $10^{-7}$ ) das suspensões virais, utilizando-se o meio de manutenção celular (MEM sem SFB) como diluente. Em seguida, cada diluição foi inoculada em culturas de células anteriormente preparadas em microplacas de 96 poços, onde o meio de crescimento (MEM com 10% de SFB) foi retirado e substituído pelo meio de manutenção. As culturas inoculadas foram incubadas a 37°C por 48 horas em ambiente contendo 5% de CO<sub>2</sub>.

### 5.11.4 CITOTOXICIDADE

A toxicidade foi determinada baseando-se na alteração morfológica das células (DE CLERCQ et al., 1980) e na viabilidade celular (NEYNDORFF et al., 1990).

#### 5.11.4.1 VERIFICAÇÃO DA ALTERAÇÃO DA MORFOLOGIA CELULAR

A galactana homogênea S2S-4, a fração polissacarídica SS solúvel em KCl 2M extraída e as frações despolimerizadas antes (DSi) e depois da purificação em cromatografia aniônica (DSi-1, DSi-2e e DSi-3) obtidas da alga *C. seminervis* foram submetidas a diluições seriadas na razão 2 (200 a 3,1 µg/mL), utilizando-se MEM sem SFB como diluente e colocadas em contato com a monocamada de células confluentes em microplacas de 96 poços previamente preparadas. As culturas foram incubadas a 37°C durante 48 horas em ambiente contendo 5% de CO<sub>2</sub> sendo examinadas ao microscópio óptico invertido (Leitz) e comparadas ao controle de células, que não entrou em contato com os polissacarídeos. A maior concentração empregada em que não foi observada alteração morfológica foi denominada concentração máxima não tóxica (CMNT).

#### 5.11.4.2 VERIFICAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR

O efeito da fração polissacarídica SS, das galactanas despolimerizadas (DSi, DSi-1, DSi-2e e DSi-3) e da galactana homogênea S2S-4 na viabilidade celular foi determinado através da técnica denominada *dye-uptake* (NEYNDORFF et al., 1990), com pequenas modificações. A técnica consiste na incorporação do corante vermelho neutro pelas células vivas e sua posterior quantificação por leitura em espectrofotômetro, em comprimento de onda de 492 nm. A porcentagem de células viáveis foi obtida pela fórmula:  $[(DO \text{ do extrato}) - (DO \text{ do controle de células})] / [(DO \text{ do Vermelho Neutro}) - (DO \text{ do controle de células})] \times 100$ . A concentração citotóxica 50% (CC<sub>50</sub>) foi calculada como a concentração do polissacarídeo necessária para reduzir a viabilidade celular em 50% quando comparada ao controle.

#### 5.11.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL

##### 5.11.5.1 REDUÇÃO DO TÍTULO VIRAL

Inicialmente foi feita uma triagem dos polissacarídeos sulfatados quanto à atividade antiviral, empregando a concentração máxima não tóxica. Culturas de células foram inoculadas com HSV-1 ou HSV-2 na presença dos polissacarídeos na CMNT ou do meio de cultura (controle de vírus). As culturas de células foram incubadas a 37°C por 48 horas. Após incubação os sobrenadantes dos testes e do controle foram titulados com base no método estatístico de Reed e Muench (1938).

O grau de atividade antiviral foi expresso em índice de inibição viral (IIV) e porcentagem de inibição (PI).

O IIV foi obtido pela fórmula proposta por Lagrota (1978):

$$IIV = B - A$$

B é o título do vírus na cultura de células sem substância (controle)

A é o título do vírus na cultura de células com substância

A PI foi calculada de acordo com a fórmula proposta por Nishimura, Toku e Fukuyashu (1977):

$$PI = [1 - (\text{antilog } T / \text{antilog } C)] \times 100$$

T corresponde às unidades infecciosas na cultura de células tratadas com a substância

C corresponde às unidades infecciosas na cultura de células não tratadas (controle)

#### 5.11.5.2 CINÉTICA DE INIBIÇÃO VIRAL

Os polissacarídeos sulfatados foram diluídos a partir da CMNT e avaliados de acordo com a metodologia de redução do título viral em relação ao controle. O título viral encontrado em cada concentração foi plotado no gráfico concentração dos polissacarídeos sulfatados x porcentagem de inibição (PI), sendo determinada a dose efetiva capaz de causar 50% de inibição ( $ED_{50}$ ) e, a partir desse dado, foi calculado o índice de seletividade ( $IS = CC_{50} / ED_{50}$ ), que corresponde a relação entre a concentração do polissacarídeo necessária para reduzir a viabilidade celular em 50% e a concentração de polissacarídeos capaz de causar 50% de inibição viral.

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1 OBTENÇÃO E ANÁLISE DOS POLISSACARÍDEOS DE *C. seminervis*

#### 6.1.1 EXTRAÇÃO E OBTENÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS

A alga *Cryptonemia seminervis* coletada na praia de Marataízes-ES em fevereiro de 2009, foi lavada com água doce e seca à sombra, originando 30 g de material após moagem. O material moído foi submetido a nove extrações aquosas sequenciais (1,5% m/v) a 80°C em tampão fosfato 0,025M, pH 6,5 por seis horas. Considerando a característica ácida das galactanas sulfatadas, a extração a quente em solução tampão visa afastar a possibilidade de autohidrólise e perda de unidades lábeis como 3,6-anidrogactose. Este tipo de extração foi realizada por Miller et al. (1995) durante os estudos dos polissacarídeos da alga *Pachymenia lusoria* (Halymeniales).

Os nove extratos obtidos de *C. seminervis* foram reunidos e centrifugados. O sobrenadante foi adicionado de três volumes de etanol absoluto para precipitação dos polissacarídeos. O precipitado etanólico foi ressolubilizado em água destilada e dialisado sequencialmente contra água destilada, NaCl 1M e água destilada. Desta forma garante-se que os polissacarídeos estão na forma sódica, seus grupos carregados negativamente levam o mesmo contra íon, sódio.

Após diálise, os polissacarídeos foram liofilizados originando a fração S (1,80g) com rendimento de 6% (m/m) em relação a alga seca submetida à extração. Este valor está de acordo com o rendimento obtido por Zibetti et al. (2009) para a mesma alga durante as extrações a quente.

Os rendimentos em peso seco dos polissacarídeos obtidos de algas da ordem Halymeniales apresentam-se variáveis. Observa-se que algas do gênero *Grateloupia* possuem os maiores rendimentos (32 - 74%), enquanto o gênero *Halymenia* traz rendimentos intermediários (26 - 59%) e os menores rendimentos são encontrados em algas dos gêneros *Phyllymenia*, *Pachymenia*, *Aeodes* e *Cryptonemia*, que variam entre 5 a 10% (CHOPIN et al., 1994). Isto pode estar correlacionado às características das frondes das espécies. A alga *Grateloupia turuturu*, que apresenta 74% de rendimento em polissacarídeos, possui frondes largas e grandes, sem

muitos recortes, enquanto *Grateloupia filicina* (32% de rendimento) apresenta característica filiforme e tende a formar espécimes de menor tamanho. As espécies de *Cryptonemia* possuem frondes estreitas, não muito espessas, além alcançar tamanhos menores (ALGAE BASE, 2011). É possível que a produção de polissacarídeos em espécimes de maior tamanho possa ser mais estimulada pela planta, pois a espessura e a superfície a serem recobertas são maiores.

### 6.1.2 TRATAMENTO DA FRAÇÃO S COM KCl 2M

Com o objetivo de purificar os polissacarídeos brutos, a fração S foi submetida ao tratamento com cloreto de potássio (KCl).

Na família de galactanas extraída da alga *Gymnogongrus torulosus* (Gigartinales) os polissacarídeos que permanecem solúveis em KCl 2M são agaranas e galactanas DL-híbridas (ESTEVEZ et al., 2001).

As galactanas DL-híbridas produzidas por algas da ordem Halymeniales (*Cryptonemia crenulata* e *C. seminervis*) permanecem na fração solúvel após tratamento com KCl 2M. A fração solúvel teve maior rendimento e as frações precipitadas apresentaram baixo rendimento, altas quantidades de proteína, baixo teor de sulfato e significativa presença de glucose (ZIBETTI et al., 2005 e 2009).

Íons potássio interagem com regiões negativas de carragenanas com estruturas repetitivas, neutralizando a repulsão e permitindo a formação de duplas-hélices e conseqüentemente ocasionando a geleificação. Diferentes galactanas, de acordo com o grau de sulfatação, geleificam em diferentes concentrações de KCl (CEREZO, 1967; NOSEDA, 1994). Este método foi descrito para fracionar os diferentes tipos de carragenanas, porém seu uso revelou-se numa ferramenta de purificação, pois também permite a precipitação de elementos pigmentados e proteínas, considerados contaminantes das frações polissacarídicas.

O método original prevê a adição 0,1M de KCl aos poucos (0,1 em 0,1M) até a concentração final de 2M (CEREZO, 1967), contudo foi modificado de forma a obter diretamente a fração solúvel em KCl 2M (ZIBETTI et al., 2005 e 2009).

Assim, a partir da fração polissacarídica S foram obtidas as frações solúvel SS e precipitada SP (de acordo com o descrito no ponto 5.3).



### 6.1.3 ANÁLISES QUÍMICAS DAS FRAÇÕES SS E SP

As frações solúvel SS e precipitada SP apresentam, respectivamente, 95 e 5% de rendimento com relação ao polissacarídeo recuperado após tratamento (Tabela 4). Resultados semelhantes foram obtidos no tratamento dos polissacarídeos de *C. seminervis* com KCl 2M por Zibetti et al. (2009).

Os espécimes de *C. seminervis* estudados por Zibetti et al. (2009) foram coletados em Marataízes-ES em março de 2002. A extração dos polissacarídeos consistiu em duas extrações aquosas a 25°C, que renderam a fração S1; duas extrações a 80°C em tampão fosfato 0,025M, pH 6,5, que renderam a fração S2; e uma terceira extração a quente nas mesmas condições da anterior, de onde se obteve a fração S3. Estes polissacarídeos foram tratados com KCl 2M, rendendo as frações solúveis S1S, S2S e S3S, respectivamente.

No presente trabalho foram realizadas nove extrações a quente nas mesmas condições de Zibetti et al. (2009), porém os nove extratos foram reunidos e tratados com KCl 2M, originando a fração SS. As análises químicas realizadas com SS são comparáveis à média encontrada para as frações correspondentes obtidas por Zibetti et al. (2009).

TABELA 4 - RENDIMENTO E ANÁLISES QUÍMICAS DAS FRAÇÕES SS E SP

Fração	Rendimento <sup>a</sup> (%)	Carboidrato <sup>b</sup> (%)	Sulfato <sup>c</sup> (%)	Proteína <sup>d</sup> (%)	[α] <sub>D</sub> <sup>e</sup> (°)
SP	5,0	13,0	10,4	15,6	-54,5
SS	95,0	52,5	19,1	2,6	-18,5

<sup>a</sup> Rendimento em relação ao peso seco do extrato polissacarídico S utilizado no tratamento com KCl 2M para obter SP e SS; <sup>b, c, d</sup> Determinações de acordo com os métodos de Dubois et al. (1956), Dodgson (1961) e Lowry et al. (1951), respectivamente; <sup>e</sup> Rotação óptica específica, determinada a 20°C em soluções aquosas 0,2% (m/v).

A fração precipitada SP, além de baixo rendimento, apresenta baixa porcentagem de carboidratos totais (13,0%), menor teor de sulfato e um alto teor de proteína (15,6%). A rotação óptica específica de SP é alta e negativa (-54,5°), portanto não condiz com a presença de carragenanas no precipitado. De forma que a fração SP não foi estudada no presente estudo.

A fração SS de maior rendimento apresenta rotação óptica negativa, porém com valor absoluto baixo ( $-18,5^\circ$ ) e teores consideráveis de carboidratos e sulfato (52,5 e 19,1%, respectivamente), além de baixa porcentagem de proteína (2,6%).

A rotação óptica específica mostra um valor intermediário entre agaranas e carragenanas e condizente com a presença de galactanas híbridas, com prevalência de estruturas de agaranas. Estes valores são similares aos encontrados nas frações solúveis em KCl 2M de *C. seminervis* obtidas por Zibetti et al. (2009).

A porcentagem de sulfato encontrada em algas da ordem Halymeniales está na média de 25%, sendo o maior valor encontrado para *Pachymenia carnososa* (32,5%) e o menor para *Grateloupia indica* (17,3%) (CHOPIN et al., 1994).

Frente a alta porcentagem de proteínas (15,6%) encontrada para a fração SP, o teor protéico encontrado para SS (2,6%) comprova a eficácia do tratamento com KCl em relação a purificação do material (Tabela 4).

#### 6.1.4 COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES SS E SP

A composição monossacarídica das frações tratadas com KCl (Tabela 5) mostra que os principais monossacarídeos constituintes são galactose (64,1 e 62,3 mol%) e 3,6-anidrogactose (10,3 e 15,9 mol%). Outros monossacarídeos monometilados (6-O-metilgalactose, 3-O-metil e/ou 4-O-metilgalactose, 2-O-metilgalactose, 2-O-metil-3,6-anidrogactose) e xilose são encontrados em menores porcentagens.

TABELA 5 - COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES TRATADAS COM KCl

Frações	Composição monossacarídica <sup>a</sup> (mol%)							
	Gal <sup>b</sup>	AG	2AG	2Gal	6Gal	3/4Gal	Xil	Glc
SP	64,1	10,3	-	2,9	4,7	-	6,2	11,8
SS	62,3	15,9	1,8	2,1	3,3	3,5	4,9	6,0

<sup>a</sup> Determinada de acordo com Jol et al. (1999); <sup>b</sup> Gal = galactose, AG = 3,6-anidrogactose, 2AG = 2-O-metil-3,6-anidrogactose, 2Gal = 2-O-metilgalactose, 6Gal = 6-O-metilgalactose, 3/4Gal = 3-O-metil e/ou 4-O-metilgalactose, Xil = xilose, Glc = glucose.

A presença de glucose é proveniente da contaminação por glucanas (“amido das florídeas”) (USOV, 1992). A fração solúvel em KCl 2M apresenta menor quantidade de glucose, o que pode indicar co-precipitação deste polissacarídeo de reserva durante o tratamento com KCl.

#### 6.1.5 ESPECTROSCOPIA DE RMN DA FRAÇÃO SS

A fração SS foi submetida a espectroscopia de RMN de  $^{13}\text{C}$ , originando o espectro da Figura 22, que reflete a grande heterogeneidade química desta família de galactanas extraída da alga *C. seminervis*, postos os numerosos sinais e o alargamento de vários deles.

A região anomérica (90 - 110 ppm) mostra os sinais referentes aos C-1 das unidades monossacarídicas. Destaca-se o deslocamento químico em 100,8 ppm, referente ao C-1 de unidades de  $\beta$ -D-galactose 2-sulfatadas (G2S), que se sobrepõe ao sinal de C-1 de  $\alpha$ -L-galactose (L) presente na mesma região. O deslocamento em 96,1 ppm pode ser referente aos C-1 de unidades de  $\alpha$ -D-galactose (D) e/ou de  $\alpha$ -L-3,6-anidrogalactose 2-sulfato (LA2S). Unidades de  $\alpha$ -L-3,6-anidrogalactose (LA) apresentam C-1 na região de 98,3 ppm (MILLER, 2003; FALSHAW et al., 2003; MILLER e BLUNT, 2000).

A presença de sulfato altera a ressonância dos carbonos vizinhos e do substituído. Em galactanas de algas o sinal de C-2 de unidades de  $\beta$ -D-galactose (na região de 70,0 ppm) é deslocado para mais ppm quando sulfatado, pois o carbono substituído fica menos blindado, acabando por ressonar na região de 77 - 78 ppm. Esta alteração é chamada efeito  $\alpha$ , em que a ressonância do carbono substituído é deslocada para mais 6 a 10 ppm. Entretanto os carbonos vizinhos ao C-2 substituído, C-1 e C-3, sofrem o chamado efeito  $\beta$ , que consiste no deslocamento da ressonância para menos 1 a 2 ppm (USOV, 1984). Do modo similar unidades de  $\alpha$ -L-3,6-anidrogalactose não sulfatadas apresentam C-1 em 98,3 ppm, enquanto o C-1 da unidade de  $\alpha$ -L-3,6-anidrogalactose 2 sulfato ressona em 96,1 ppm. O efeito do C-2 sulfatado desloca o sinal do carbono vizinho C-1 de mais ppm (98,3 ppm) para menos (96,1 ppm) (efeito  $\beta$ ).

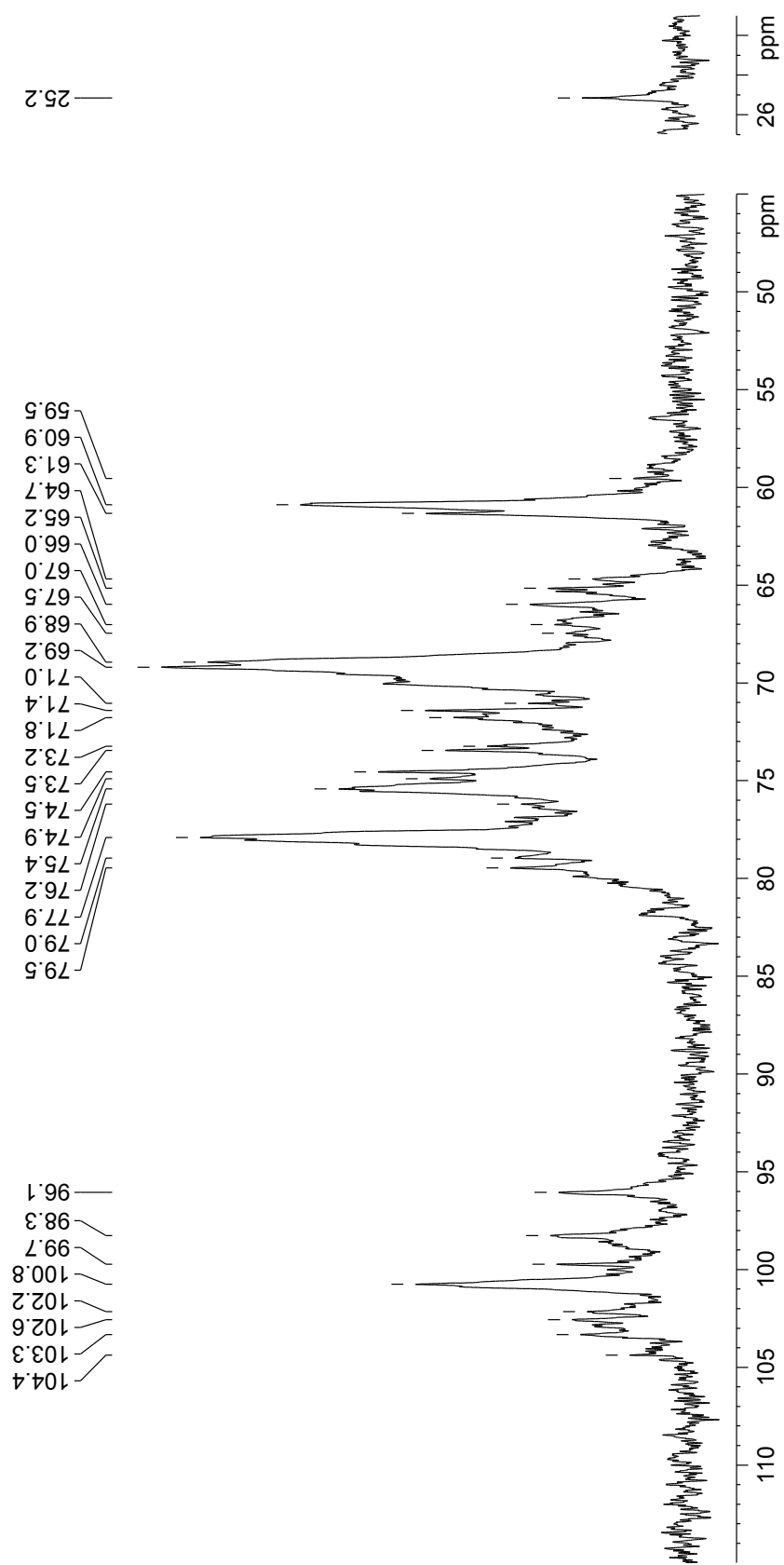


FIGURA 22 - ESPECTRO DE RMN DE  $^{13}\text{C}$  DA FRAÇÃO SS  
Solvente:  $\text{D}_2\text{O}$  ( $70^\circ\text{C}$ ); acetona como padrão interno (30,2 ppm)

O deslocamento químico em 99,7 ppm pode ser atribuído ao C-1 de unidades de  $\alpha$ -D-glucopiranosose (4-O-ligadas), correspondentes ao amido das florídeas (FALSHAW et al., 1998), o que está de acordo com a presença de 6,0 mol% de glucose na composição monossacarídica da fração SS (Tabela 5).

Ainda destaca-se o deslocamento em 25,2 ppm, referente ao carbono metílico de acetal de ácido pirúvico (GAREGG et al., 1979). Unidades de  $\beta$ -galactopiranosose (unidade A) substituídas por acetal de ácido pirúvico nos carbonos 4 e 6 foram encontradas em baixas proporções em outros gêneros da ordem Halymeniales. As espécies *Grateloupia elliptica* e *G. filicina* apresentam 2,92 e 0,18% de piruvato, respectivamente (HIRASE et al., 1967; ZABLACKIS e PEREZ, 1990).

As frações polissacarídicas obtidas de *Cryptonemia crenulata* por Zibetti et al. (2005) mostram porcentagens variáveis de piruvato, sendo que fracionamentos cromatográficos permitem o isolamento de subfrações enriquecidas (4,5%) ou não (0,4%) com piruvato. O mesmo ocorre nas frações polissacarídicas de *C. seminervis*, sendo que esta última possui substituições por acetal de ácido pirúvico a cada 8-12 unidades monoméricas, enquanto em *C. crenulata* estas substituições ocorrem a cada 30-40 unidades. Portanto *C. seminervis* aparentemente é mais rica em unidades piruvatadas (ZIBETTI et al., 2005 e 2009).

## 6.2 HIDRÓLISE REDUTIVA PARCIAL DA FRAÇÃO SS: OBTENÇÃO DA FRAÇÃO DSi

Com a finalidade de obtenção de fragmentos de galactanas com menor massa molar, a fração solúvel SS foi submetida ao processo de hidrólise reductiva parcial em condições mais suaves que as determinadas por Usov e Elashvili (1991) (como descrito no ponto 5.5.3).

O hidrolisado foi co-destilado com água à pressão reduzida para retirada do ácido trifluoracético e depois dialisado contra água destilada em membrana de 6.000 - 8.000 Da para remoção do agente redutor, que permanece na forma de borato e 4-metil-morfolina (4-MM) após a hidrólise.

No decorrer da reação de redução, o complexo entre a 4-MM e o borano é desfeito: o borano é oxidado a borato e a 4-MM permanece nesta forma. A 4-MM é uma amina terciária formada por um anel de seis átomos: quatro carbonos, um

nitrogênio e um oxigênio, possuindo um grupo metil ligado ao nitrogênio do anel (Figura 23). Adicionalmente, a diálise é eficaz em retirar possíveis vestígios do ácido trifluoracético que é capaz de formar o sal trifluoracetato de 4-metil-morfolina com a amina terciária (DUCATTI, 2005).

Este procedimento permitiu a obtenção de uma fração com moléculas maiores que 6.000 Da que ficou retida na membrana de diálise e uma fração oligossacarídica com moléculas menores que 6.000 Da na água de diálise. A fração oligossacarídica denominada DSo (“D” = despolimerizada; “S” = *seminervis*; “o” = *out* = fora da membrana) foi armazenada para estudos futuros, enquanto a análise detalhada da fração denominada DSi (“D” = despolimerizada; “S” = *seminervis*; “i” = *in* = dentro da membrana) é apresentada no presente trabalho (Figura 26).

### 6.2.1 ANÁLISES QUÍMICAS DA FRAÇÃO DSI

As galactanas hidrolisadas obtidas na fração DSI (840 mg, 76,5% de rendimento) apresentam rendimento bem maior que o obtido para CS (15,0%) resultante da despolimerização da fração homogênea S2S-3 (ZIBETTI et al., 2009).

Os trabalhos que utilizaram a hidrólise redutiva parcial nas condições estabelecidas por Usov e Elashvili (1991) obtiveram no máximo 30% de rendimento em oligossacarídeos após purificações por métodos cromatográficos (USOV e ELASHVILI, 1991; GONÇALVES et al., 2002).

No entanto, o alto rendimento de DSI (obtido neste trabalho) frente ao hidrolisado CS (obtido por Zibetti et al., 2009), que possui relativa semelhança quanto ao procedimento de hidrólise e processamento pós-hidrólise, pode estar correlacionado com o limite de exclusão na membrana de diálise utilizada. Para a fração CS foi utilizada uma membrana de 14.000 Da de limite de poro, enquanto a fração DSI foi isolada com uma membrana de 6.000 a 8.000 Da que permite a retenção de moléculas de tamanhos menores.

Além disso, a heterogeneidade do material, ou seja, do *pool* de galactanas hidrolisado no presente trabalho pode ter modificado o rendimento. A fração SS que originou o despolimerizado DSI foi obtida por tratamento com KCl 2M após extração, não sendo submetida ao processo de purificação por cromatografia. De modo diferente, a fração S2S-3 que originou CS, possuía perfil homogêneo por HPSEC-

MALLS, tendo sido obtida após cromatografia de troca aniônica e representou aproximadamente 2% de todos os polissacarídeos extraídos de *C. seminervis*.

As análises químicas referentes a fração DSi são apresentadas juntamente com os dados da fração SS (mostrados anteriormente) que a originou, a fim de facilitar a comparação dos dados.

As dosagens de carboidratos totais (57,9%), sulfato (20,8%) e proteínas totais (2,5%), obtidas para o hidrolisado DSi, não apresentam grandes desvios dos valores encontrados para a fração SS (Tabela 6).

TABELA 6 - RENDIMENTO E ANÁLISES QUÍMICAS DA FRAÇÃO DSi

Fração	Rendimento (%)	Carboidrato <sup>c</sup> (%)	Sulfato <sup>d</sup> (%)	Proteína <sup>e</sup> (%)	$[\alpha]_D^{20}$ <sup>f</sup> (°)
SS	95,0 <sup>a</sup>	52,5	19,1	2,6	- 18,5
DSi	76,5 <sup>b</sup>	57,9	20,8	2,5	- 15,5

<sup>a</sup> Rendimento em relação ao peso seco do extrato polissacarídico S utilizado no tratamento com KCl 2M para obter SS; <sup>b</sup> Rendimento em relação ao peso seco da fração SS utilizada no processo de hidrólise redutiva parcial para obter DSi; <sup>c, d, e</sup> Determinações de acordo com os métodos de Dubois et al. (1956), Dodgson (1961) e Lowry et al. (1951), respectivamente; <sup>f</sup> Rotação óptica específica, determinada a 20°C em soluções aquosas 0,2% (m/v).

A fração DSi conservou a média de sulfatação da fração nativa, comprovando que estes substituintes foram retidos durante a hidrólise redutiva parcial (USOV e ELASHVILI, 1991). No entanto há relatos de perda de grupos sulfato em C-2 das unidades A durante hidrólise redutiva parcial nas condições original (GONÇALVES et al., 2002) e suave (ZIBETTI et al., 2005 e 2009). Sugere-se que a versão suave da HRP também cliva ligações galactosídicas, visto que Zibetti et al. (2009) observaram aumento de unidades B em detrimento de unidades A. Durante a autohidrólise de carragenanas também são observadas hidrólise/decréscimo de unidades A e perda preferencial de grupos sulfato em C-2 das unidades de  $\beta$ -D-galactose (NOSEDA e CERREZO, 1993).

A rotação óptica específica de DSi (-15,5°) não apresenta grande desvio com relação a fração nativa SS (-18,5°) (Tabela 6). A pequena alteração observada pode ser derivada do processo de hidrólise e resultante da modificação estrutural, podendo estar correlacionada com a perda da atividade óptica do C-1 das unidades de 3,6-anidrogactose que sofreram redução.

## 6.2.2 COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DA FRAÇÃO DSI

A composição monossacarídica da fração DSI também apresenta alta porcentagem de galactose e 3,6-anidrogalactose, como a fração polissacarídica de origem SS (Tabela 7).

TABELA 7 - COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DA FRAÇÃO DSI

Frações	Composição monossacarídica <sup>a</sup> (mol%)							
	Gal <sup>b</sup>	AG	2AG	2Gal	6Gal	3/4Gal	Xil	Glc
SS	62,3	15,9	1,8	2,1	3,3	3,5	4,9	6,0
DSi	58,6	16,7	2,1	3,0	3,3	4,4	5,3	6,6

<sup>a</sup> Determinada de acordo com Jol et al. (1999); <sup>b</sup> Gal = galactose, AG = 3,6-anidrogalactose, 2AG = 2-O-metil-3,6-anidrogalactose, 2Gal = 2-O-metilgalactose, 6Gal = 6-O-metilgalactose, 3/4Gal = 3-O-metil e/ou 4-O-metilgalactose, Xil = xilose, Glc = glucose.

Ambas as frações SS e DSI possuem o mesmo perfil de açúcares (Tabela 7), onde se encontram as mesmas unidades monossacarídicas: galactose, 3,6-anidrogalactose, 2-O-metil-3,6-anidrogalactose, 2-O-metilgalactose, 6-O-metilgalactose, 3-O-metil e/ou 4-O-metilgalactose e xilose, além da presença de glucose, proveniente da contaminação por amido das florídeas (USOV, 1992).

É interessante destacar que a fração despolimerizada CC, obtida da galactana C2S-3 de *C. crenulata*, não apresentou xilose na sua composição monossacarídica, enquanto o polissacarídeo original continha 2,7 mol% de xilose (ZIBETTI et al., 2005). Já em *Laurencia nipponica* (USOV e ELASHVILI, 1991) e *C. seminervis* (ZIBETTI et al., 2009) as unidades de xilose foram mantidas após hidrólise reductiva parcial.



### 6.2.3 ESPECTROSCOPIA DE RMN DA FRAÇÃO DSi

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de DSi (Figura 23) é complexo, mostrando um perfil semelhante ao da fração SS. De modo similar à fração SS, também se destacam oito sinais na região anomérica (110 a 90 ppm), correspondentes as díades<sup>4</sup>: G (104,4) → D (96,5); G(P) (102,9) → LA (98,2) e G(P)2S (100,7) → LA (98,2) (FALSHAW et al., 2003; LAHAYE et al., 1989; MILLER e BLUNT, 2000). O sinal em 104,4 ppm também pode ser atribuído ao C-1 das unidades de  $\beta$ -D-xilose ligadas ao C-6 das unidades A.

O espectro de  $^{13}\text{C}$  da fração DSi também apresenta o deslocamento em 99,7 ppm atribuído ao C-1 de unidades de  $\alpha$ -D-glucopiranosose (4-O-ligadas), devido a contaminação por amido das florídeas (FALSHAW et al., 1998).

Destaca-se a intensidade do deslocamento em 175,4 ppm referente ao carbono carboxílico de acetal de ácido pirúvico, além do sinal em 25,2 ppm referente ao carbono metílico deste substituinte (GAREGG et al., 1979). A fração original SS não mostrou sinal acentuado na região de 175-176 ppm.

É importante ressaltar a presença dos sinais referentes às unidades de 3,6-anidrogalaactitol (AGOH) produzidas durante a hidrólise redutiva parcial. O deslocamento químico em 63,2 ppm é atribuído ao C-1 das unidades de AGOH, enquanto os carbonos 2, 3, 4, 5 e 6 são indicados pelos sinais em 71,1; 83,5; 86,3; 75,3 e 73,0 ppm, respectivamente. Sendo o sinal em 86,3 ppm referente ao C-4 da unidade de AGOH ligada a  $\beta$ -D-galactose 2-sulfato (GONÇALVES et al., 2002).

A hidrólise redutiva parcial se processa em presença de muito agente redutor borano 4-metil-morfolina (B 4-MM), de forma que é possível verificar resíduos deste reagente na fração DSi mesmo após diálise, pois a 4-MM é uma amina terciária (carga positiva) capaz de interagir com os grupos sulfato (carga negativa) presentes nas galactanas.

Os sinais afilados (\*) são atribuídos aos carbonos do anel da amina terciária 4-metil-morfolina (4-MM), sendo o sinal em 63,7 ppm referente aos carbonos 2 e 6, enquanto os carbonos 3 e 5 são representados pelo deslocamento em 53,3 ppm. O espectro apresenta ainda o sinal em 43,3 ppm (não mostrado) referente ao carbono metílico ligado ao nitrogênio do anel (GONÇALVES et al., 2002).

---

<sup>4</sup> nomenclatura de Knutsen et al. (1994).

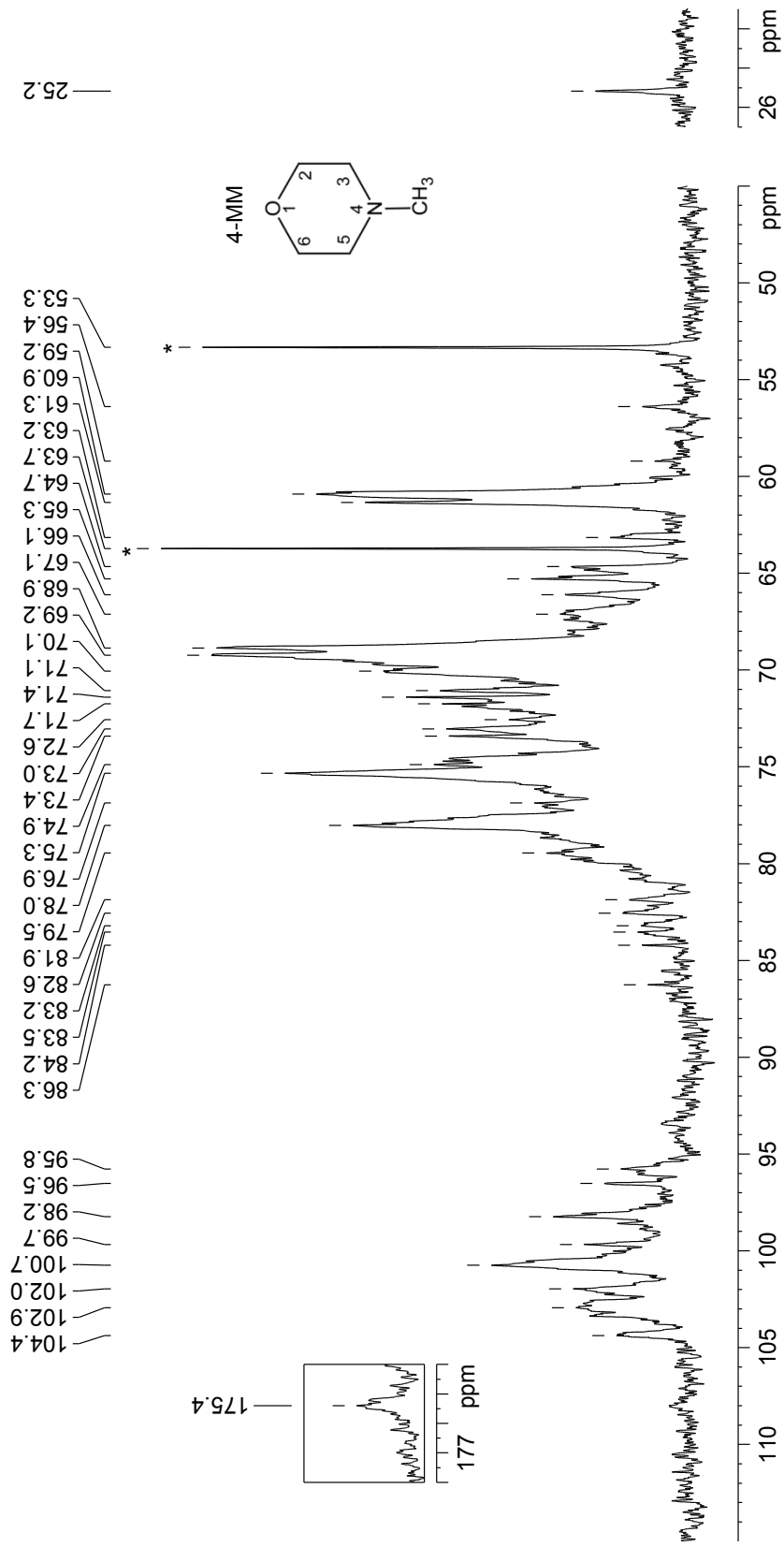


FIGURA 23 - ESPECTRO DE RMN DE <sup>13</sup>C DA FRAÇÃO DSI  
Solvente: D<sub>2</sub>O (70°C); acetona como padrão interno (30,2 ppm)

\* Sinais referentes ao resíduo reacional 4-metil-morfolina (4-MM)

#### 6.2.4 ANÁLISE POR HPSEC-MALLS-IR DA FRAÇÃO DSi

O produto de hidrólise reductiva parcial DSi foi submetido à análise de homogeneidade em cromatografia de exclusão estérica, acoplada a detectores de espalhamento de luz e de índice de refração (HPSEC-MALLS-IR) (Figura 24). O perfil cromatográfico (índice de refração) não simétrico de DSi indica a presença de uma mistura de polímeros com massas moleculares diferentes.

Na análise por HPSEC-MALLS-IR utiliza-se quatro colunas de gel filtração em série com limites de exclusão de  $7 \times 10^6$ ,  $4 \times 10^5$ ,  $8 \times 10^4$  e  $5 \times 10^3$  Da, portanto a família de galactanas despolimerizadas obtidas em DSi possui massa molecular acima de 5.000 Da.

Pode-se observar na Figura 24 que o detector de espalhamento de luz permaneceu instável durante a análise. O processo de hidrólise reductiva parcial conduziu a produção de galactanas de baixa massa molecular de forma que os detectores-multiângulos não foram capazes de detectar tais moléculas. Assim, o resultado obtido pelos detectores de espalhamento de luz não adicionou informações.

Na Figura 25 são apresentados os perfis de eluição das frações SS e DSi. De acordo com o detector de índice de refração, moléculas de menor tamanho estão presentes na fração DSi quando comparada a fração SS, posto que o tempo de retenção para DSi foi maior (~ 55 minutos) do que para SS (45 minutos).

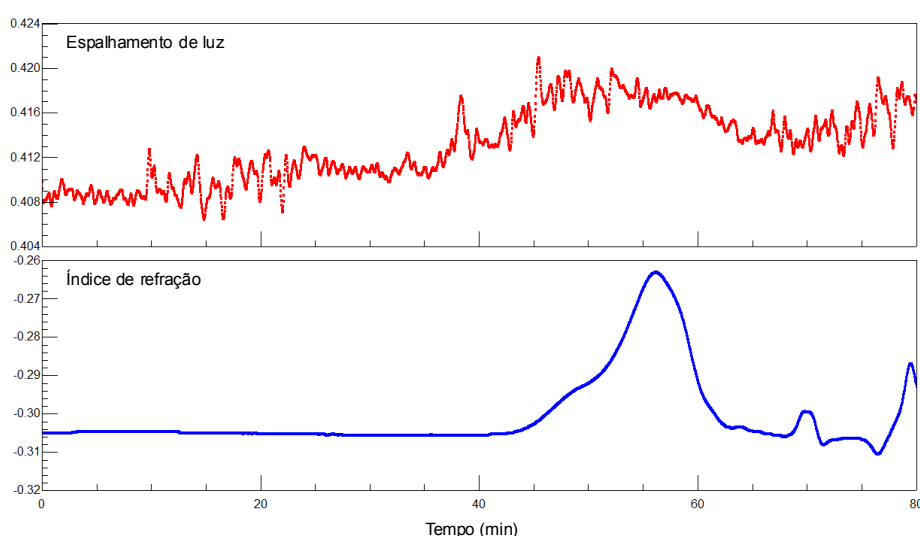


FIGURA 24 - CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO ESTÉRICA (HPSEC-MALLS-IR) DA FRAÇÃO DSi

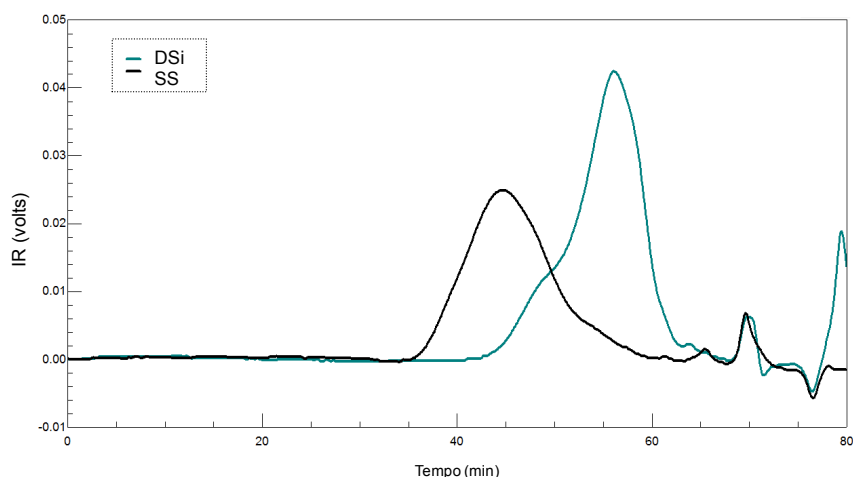


FIGURA 25 - PERFIL DE ELUIÇÃO EM HPSEC COM DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO DAS FRAÇÕES SS E DSi

### 6.3 FRACIONAMENTO DAS GALACTANAS DESPOLIMERIZADAS

A fração heterogênea DSi (789 mg) foi submetida a cromatografia de troca aniônica em DEAE-Sephacel (Cl<sup>-</sup>). A amostra foi eluída com água destilada e soluções de cloreto de sódio em concentrações crescentes, sendo as eluições monitoradas pelo teste do fenol - ácido sulfúrico (DUBOIS et al., 1956) (Figura 26).

As amostras recuperadas da purificação por troca iônica, após evaporação à pressão reduzida e diálise em água destilada foram liofilizadas e nominadas DSi-w, para a fração eluída com água e DSi-1, DSi-2, DSi-3, DSi-4, DSi-5 e DSi-6 para as frações eluídas com soluções de NaCl 0,25; 0,50; 0,75; 1,0; 1,5 e 2,0M, respectivamente (Figura 26).

As frações DSi-1 e DSi-3, eluídas com 0,25 e 0,75M de NaCl, respectivamente, apresentaram perfil homogêneo perante cromatografia de exclusão estérica, acoplada a detectores de espalhamento de luz e de índice de refração (HPSEC-MALLS-IR) (Figuras 29 e 31).

No entanto a fração DSi-2, de maior rendimento (35,0%) eluída em NaCl 0,50M, mostrou um perfil assimétrico (Figura 28) em HPSEC-MALLS-IR, de forma que foi recromatografada nas mesmas condições que DSi, originando as frações DSi-2w, DSi-2a, DSi-2b, DSi-2c, DSi-2d, DSi-2e, DSi-2f, DSi-2g e DSi-2h eluídas com água e soluções de NaCl 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7 e 1,0M, respectivamente (Figura 26). O refractionamento de DSi-2 originou uma fração com perfil homogêneo, eluída com 0,5M de NaCl denominada DSi-2e (24,0% de rendimento) (Figura 37).

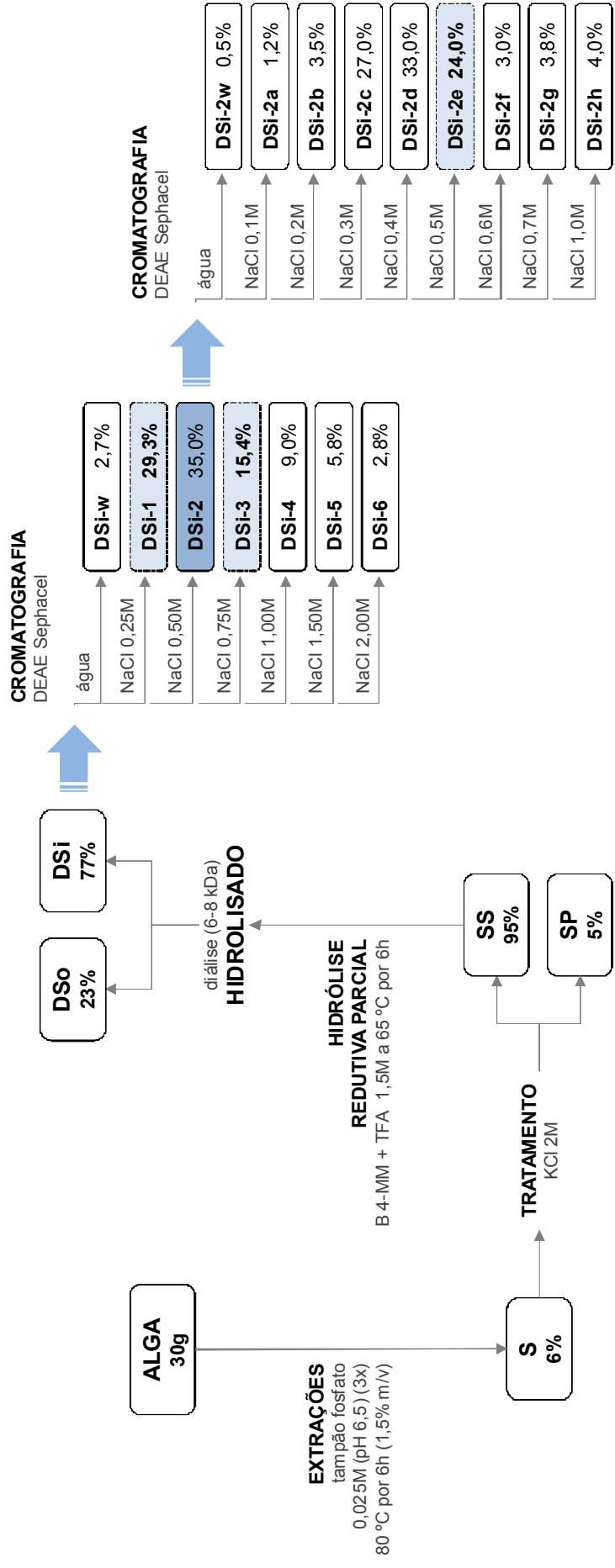


FIGURA 26 - ESQUEMA DE EXTRAÇÃO E FRACIONAMENTO DOS POLISSACARÍDEOS DESPOLIMERIZADOS DE *C. seminervis*. Rendimentos expressos em porcentagem em relação ao peso seco total recuperado em cada etapa

### 6.3.1 ANÁLISE POR HPSEC-MALLS-IR DAS GALACTANAS DESPOLIMERIZADAS

As galactanas DSi-1, DSi-2, DSi-3, DSi-4 e DSi-5 obtidas por cromatografia de troca aniônica em DEAE-Sephacel foram submetidas à análise de homogeneidade em cromatografia de exclusão estérica, acoplada a detectores de espalhamento de luz e de índice de refração (HPSEC-MALLS-IR) (Figuras 27, 28, 29, 30 e 31).

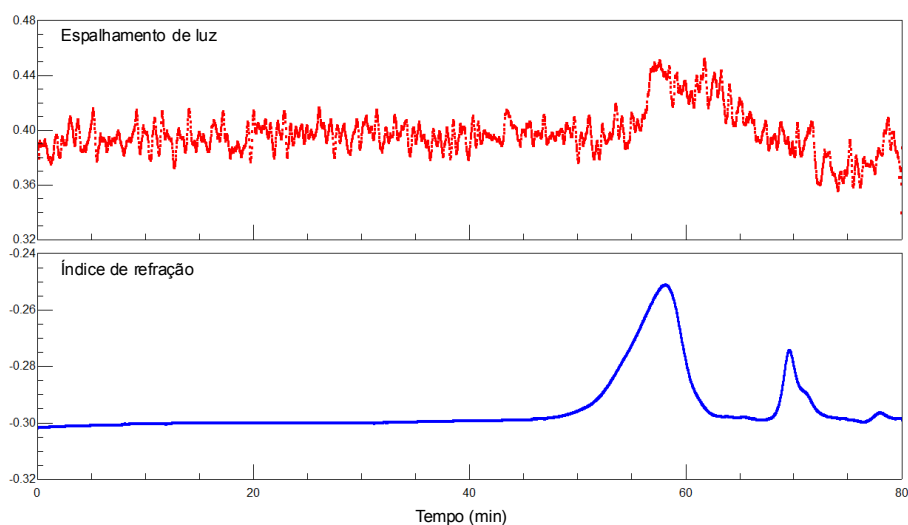


FIGURA 27 - CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO ESTÉRICA (HPSEC-MALLS-IR) DA FRAÇÃO DSi-1

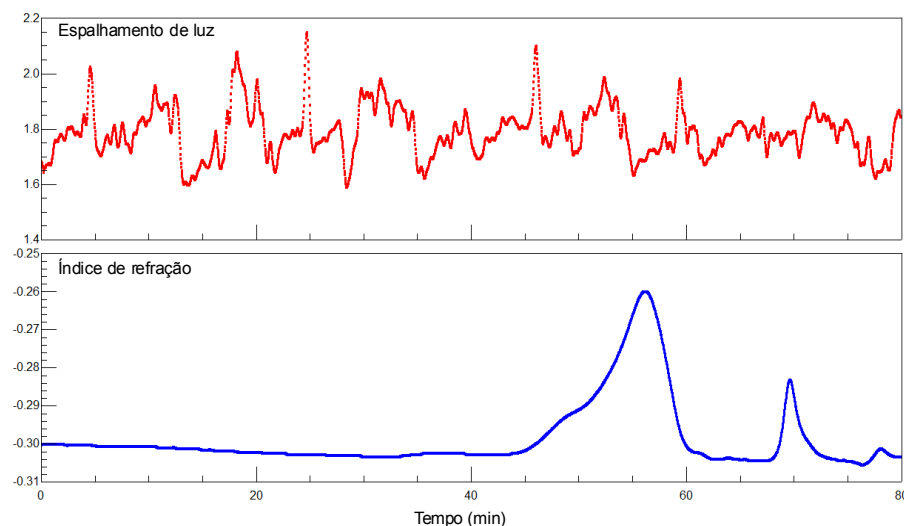


FIGURA 28 - CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO ESTÉRICA (HPSEC-MALLS-IR) DA FRAÇÃO DSi-2

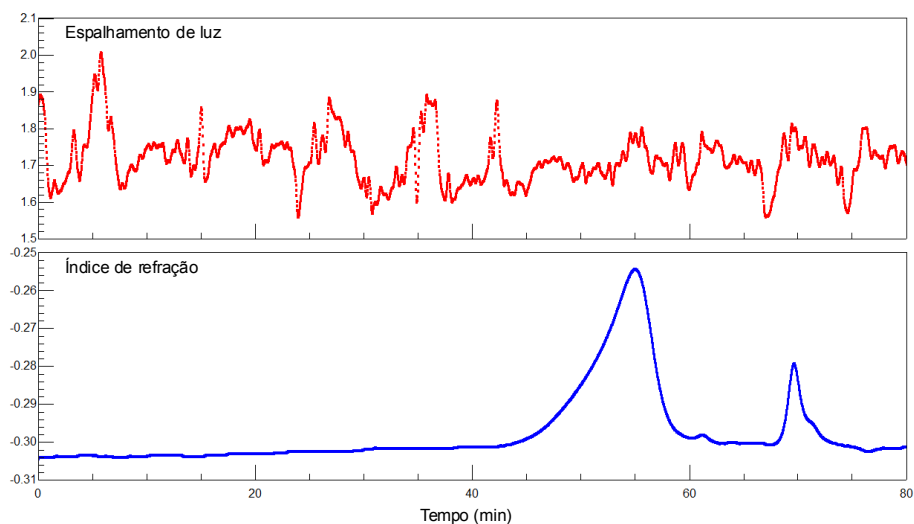


FIGURA 29 - CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO ESTÉRICA (HPSEC-MALLS-IR) DA FRAÇÃO DSi-3

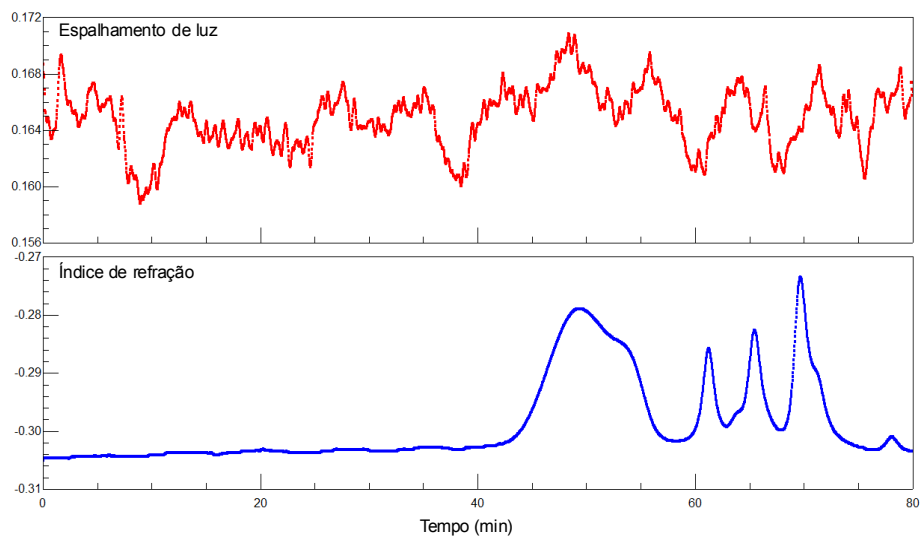


FIGURA 30 - CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO ESTÉRICA (HPSEC-MALLS-IR) DA FRAÇÃO DSi-4

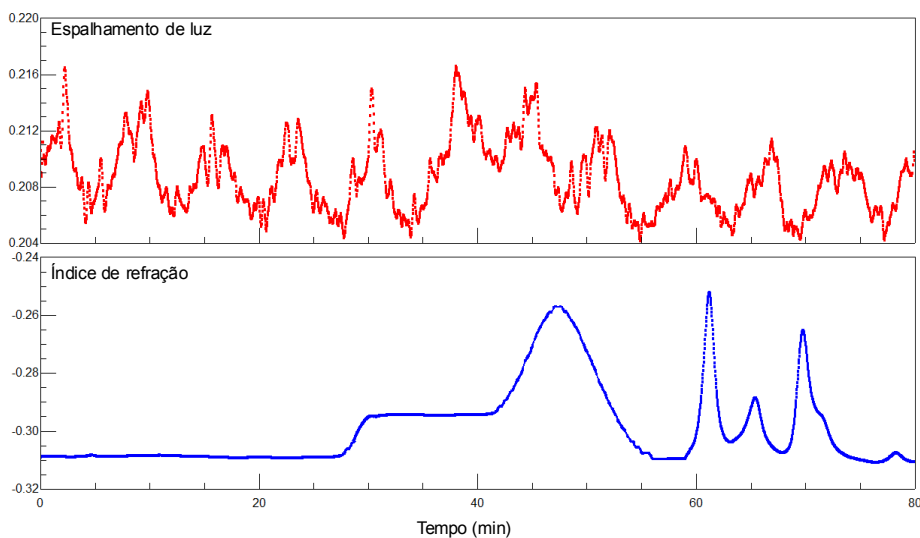


FIGURA 31 - CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO ESTÉRICA (HPSEC-MALLS-IR) DA FRAÇÃO DSi-5

Dentre as frações obtidas do refractionamento da fração DSi-2, apenas as aquelas de maior rendimento, DSi-2c (27,0%), DSi-2d (33,0%) e DSi-2e (24,0%), eluídas com NaCl 0,3; 0,4 e 0,5M, respectivamente, foram submetidas a análise de homogeneidade por HPSEC-MALLS-IR (Figuras 32, 33 e 34).

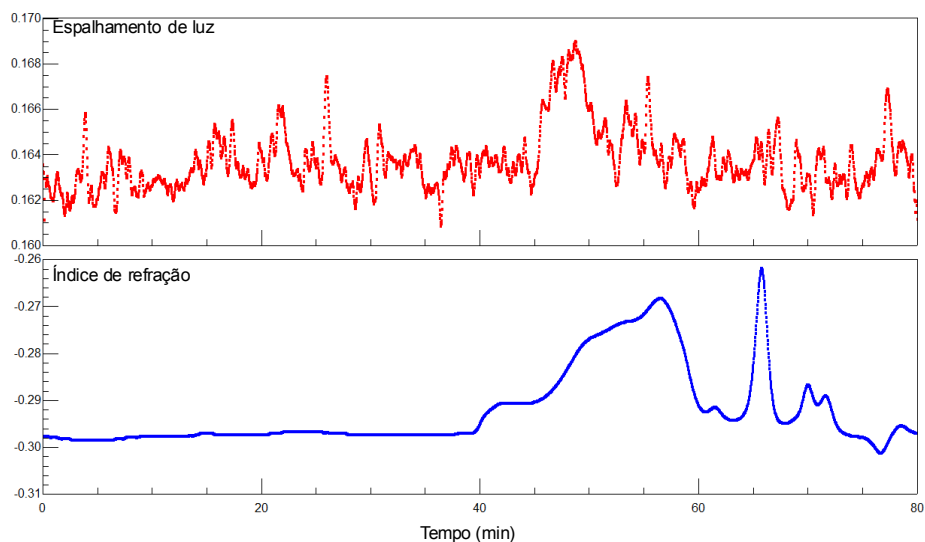


FIGURA 32 - CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO ESTÉRICA (HPSEC-MALLS-IR) DA FRAÇÃO DSi -2c

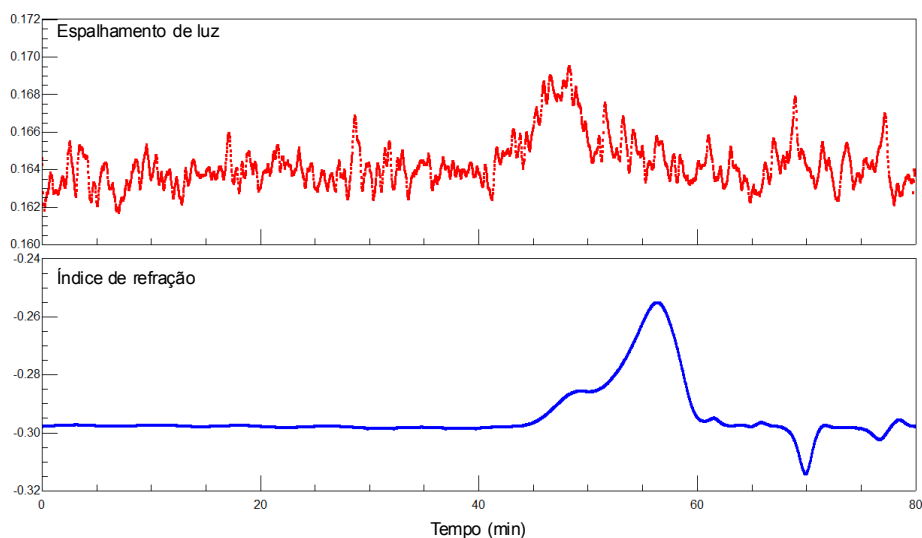


FIGURA 33 - CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO ESTÉRICA (HPSEC-MALLS-IR) DA FRAÇÃO DSi -2d



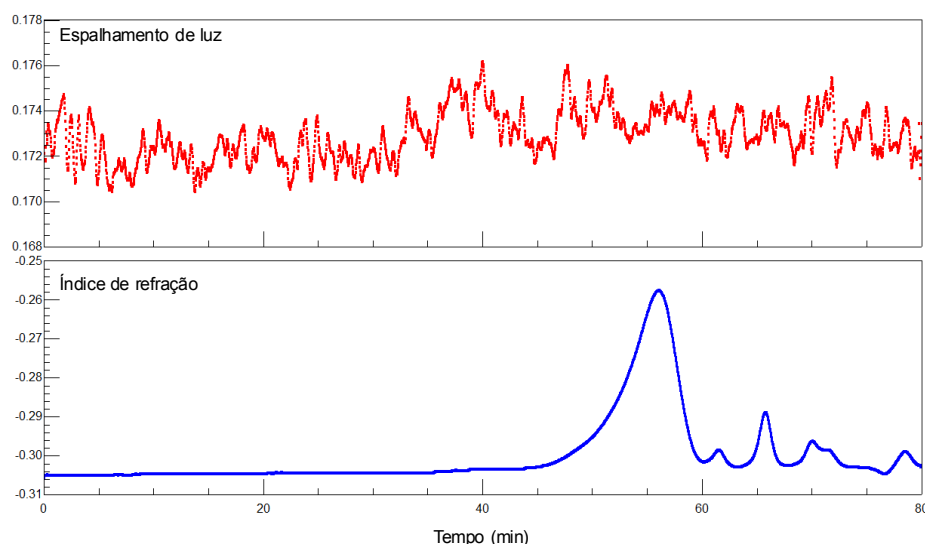


FIGURA 34 - CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO ESTÉRICA (HPSEC-MALLS-IR) DA FRAÇÃO DSi -2e

A massa molecular ponderal média ( $M_w$ ) das frações homogêneas foi determinada baseando-se na taxa de variação do índice de refração com relação à concentração ( $dn/dc$ ), calculada com auxílio do Software ASTRA (Tabela 8).

TABELA 8 - MASSA MOLECULAR PONDERAL MÉDIA ( $M_w$ ) CALCULADA PARA AS FRAÇÕES HOMOGÊNEAS

Fração	$dn/dc$ <sup>a</sup>	$M_w$
DSi-1	0,143	51.600 Da
DSi-2e	0,134	60.110 Da
DSi-3	0,143	63.770 Da

<sup>a</sup> Taxas de variação dos índices de refração com relação à concentração calculadas pelo Software ASTRA.

#### 6.4 ANÁLISE ESTRUTURAL DAS GALACTANAS DESPOLIMERIZADAS

Apesar de apenas três das galactanas despolimerizadas apresentarem perfil homogêneo, a análise conjunta de todas as galactanas despolimerizadas obtidas por cromatografia aniônica permite destacar informações importantes sobre os polissacarídeos produzidos pela alga *Cryptonemia seminervis*.

## 6.4.1 GALACTANAS DESPOLIMERIZADAS: ANÁLISES QUÍMICAS

A cromatografia de troca aniônica em resina DEAE-Sephacel empregada no fracionamento de DSi foi utilizada com o intuito de separar as famílias de galactanas despolimerizadas de acordo com a força iônica que estes polímeros apresentam, característica esta que está correlacionada com a quantidade de grupos carregados negativamente presentes nestas galactanas, como os grupos sulfato.

No entanto a eluição com água promove a eluição de moléculas neutras, de forma que isto pode ser utilizado para realizar a retirada de glucanas provenientes da contaminação por amido das florídeas. Posto que os resultados de RMN de  $^{13}\text{C}$  da fração DSi, mostram o sinal em 99,7 ppm referente ao C-1 de  $\alpha$ -D-glucose.

A fração DSi-w, eluída com água, apresenta baixo rendimento (2,7%) e rotação óptica positiva com alto valor absoluto (+112,5) (Tabela 9). Isto se deve ao alto teor de glucose (amido das florídeas) presente nesta fração. Os dados de composição monossacarídica corroboram com este valor de rotação óptica, posto que a fração DSi-w possui aproximadamente 52 mol% de D-glucose (Tabela 10).

TABELA 9 - RENDIMENTO E ANÁLISES QUÍMICAS DAS GALACTANAS DESPOLIMERIZADAS

Fração	Rendimento <sup>a</sup> (%)	Carboidrato <sup>b</sup> (%)	Sulfato <sup>c</sup> (%)	Proteína <sup>d</sup> (%)	$[\alpha]_D^e$ (°)
DSi-w	2,7	96,7	n.d.	0,7	+ 112,5
DSi-1	29,3	66,3	14,1	3,6	- 34,0
DSi-2	35,0	n.d.	25,1	n.d.	- 44,0
DSi-3	15,4	53,3	29,9	0,9	- 12,0
DSi-4	9,0	38,5	31,7	0,8	+ 25,0
DSi-5	5,8	28,7	38,5	1,2	+ 36,0
DSi-6	2,8	n.d.	n.d.	1,7	- 1,0

n.d. = não determinado; <sup>a</sup> Rendimento em relação ao peso seco da fração DSi utilizada no fracionamento em DEAE-Sephacel para obter as galactanas despolimerizadas; <sup>b, c, d</sup> Determinações de acordo com os métodos de Dubois et al. (1956), Dodgson (1961) e Lowry et al. (1951), respectivamente; <sup>e</sup> Rotação óptica específica, determinada a 20°C em soluções aquosas 0,2% (m/v).

Observando-se os valores de rotação óptica das outras frações obtidas por cromatografia em DEAE-Sephacel, nota-se que as frações eluídas com 0,25; 0,50 e 0,75M de NaCl (DSi-1, DSi-2 e DSi-3) apresentam valores absolutos intermediários e negativos ( $-34,0^\circ$ ;  $-44,0^\circ$  e  $-12,0^\circ$ , respectivamente), o que indica a prevalência de estruturas de agaranas e confirma pouca ou nenhuma contaminação glucose, conforme mostram também os dados da composição monossacarídica (Tabela 10).

No entanto as frações DSi-4 e DSi-5, eluídas com 1,0 e 1,5M de NaCl, apresentam valores de rotação óptica intermediários e positivos ( $+25,0^\circ$  e  $+36,0^\circ$ , respectivamente) o que indica a prevalência de estruturas de carragenanas, visto que o teor de glucose para estas galactanas é baixo (traços, menos que 1 mol%) (Tabela 10).

As frações DSi-1, DSi-2 e DSi-3 onde as estruturas de agaranas são predominantes, segundo os valores de rotação óptica, também apresentam maiores rendimentos quando comparadas às frações DSi-4 e DSi-5 (predominantemente estruturas de carragenanas) (Tabela 9). Isto condiz com a razão molar entre as estruturas de agaranas e carragenanas de aproximadamente 2:1, publicada para as galactanas de *C. seminervis* (ZIBETTI et al., 2009).

Os maiores rendimentos em carboidratos pertencem às frações que possuem menor teor de sulfatação DS-1, DSi-2 e DSi-3, as quais apresentam 14,1; 25,1 e 29,9% de sulfato ( $\text{NaSO}_3$ ) (Tabela 9). De acordo com a cromatografia iônica utilizada, quanto maior a quantidade de grupos sulfato (negativos) maior é a força iônica necessária para desfazer as interações entre a amostra e a resina, de forma que as frações mais sulfatadas são eluídas nas maiores concentrações de NaCl. As frações DSi-4 e DSi-5 possuem os maiores teores de sulfato (31,7 e 38,5%, respectivamente) e as menores porcentagens em carboidratos (38,5 e 28,7%, respectivamente). Apesar do baixo rendimento, as frações DSi-4 e DSi-5 parecem corresponder a estruturas com predomínio de carragenanas altamente sulfatadas.

Todas as frações obtidas por cromatografia em DEAE-Sephacel apresentam baixas porcentagens de proteínas (Tabela 9).

A fração DSi-6, além de seu baixo rendimento, não apresentou ressonância em qualquer região da janela de análise de RMN de  $^{13}\text{C}$  ou detecção por HPSEC-MALLS-IR e portanto não foi estudada.

#### 6.4.2 GALACTANAS DESPOLIMERIZADAS: COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA

Analisando-se a Tabela 10, percebe-se que, exceto a fração DSi-w, eluída com água, todas apresentam galactose como principal monossacarídeo e derivados metilados em menores porcentagens, enquanto que as porcentagens de 3,6-anidrogactose são variáveis.

As frações eluídas com menor força iônica apresentam maiores porcentagens de 3,6-anidrogactose e seu derivado metilado 2-O-metil-3,6-anidrogactose, de forma que as frações com maior grau de sulfatação apresentam menores proporções destes açúcares anidrogactosídicos.

TABELA 10 - COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS GALACTANAS DESPOLIMERIZADAS

Frações	Composição monossacarídica <sup>a</sup> (mol%)							
	Gal <sup>b</sup>	AG	2AG	2Gal	6Gal	3/4Gal	Xil	Glc
DSi-w	20,6	8,3	-	-	9,4	-	9,7	51,9
DSi-1	60,4	15,5	2,1	2,7	3,7	6,0	6,0	3,7
DSi-2	74,2	10,5	1,4	2,4	2,6	4,5	3,5	tr.
DSi-3	85,0	6,7	2,2	1,2	1,5	1,3	1,4	tr.
DSi-4	89,7	5,1	tr.	1,0	1,7	-	1,5	tr.
DSi-5	89,4	2,0	2,6	tr.	1,2	-	2,0	2,2

tr. = traços (menor que 1,0 mol%); <sup>a</sup> Determinada de acordo com Jol et al. (1999); <sup>b</sup> Gal = galactose, AG = 3,6-anidrogactose, 2AG = 2-O-metil-3,6-anidrogactose, 2Gal = 2-O-metilgalactose, 6Gal = 6-O-metilgalactose, 3/4Gal = 3-O-metil e/ou 4-O-metilgalactose, Xil = xilose, Glc = glucose.

A galactana homogênea DSi-1 destaca-se por apresentar as maiores porcentagens em monossacarídeos metilados 2-O-metil, 6-O-metil, 3-O-metil e/ou 4-O-metilgalactose e xilose, sendo a fração mais rica em unidades anidrogactosídicas.

Enquanto a outra galactana homogênea DSi-3, apresenta menores quantidades de xilose e monossacarídeos metilados, além de menos unidades anidrogactosídicas e maior porcentagem de galactose.

As frações DSi-4 e DSi-5 possuem altas porcentagens de galactose, poucos açúcares anidrogactosídicos e baixas porcentagens de xilose e monossacarídeos

metilados de galactose, sendo que unidades de 3-O-metil e/ou 4-O-metilgalactose não foram detectadas (Tabela 10).

Devido ao seu perfil não homogêneo, a fração DSi-2 foi refractionada em cromatografia aniônica, originando as frações dispostas na Tabela 11.

A galactana homogênea DSi-2e (23,7% de sulfato;  $[\alpha]_D -23,5^\circ$ ) possui as mesmas características das composições monossacarídicas das frações do primeiro fracionamento e mostra quantidades intermediárias de sulfato e unidades anidrogalactosídicas com relação às galactanas homogêneas DSi-1 e DSi-3.

TABELA 11 - RENDIMENTO E COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS GALACTANAS DESPOLIMERIZADAS OBTIDAS DO REFRACIONAMENTO DE DSi-2

Frações	Rendimento (%)	Composição monossacarídica <sup>a</sup> (mol%)							
		Gal <sup>b</sup>	AG	2AG	2Gal	6Gal	3/4Gal	Xil	Glc
DSi-2a	1,2	36,0	13,1	-	-	-	-	23,2	27,8
DSi-2b	3,5	58,0	10,3	-	2,3	2,0	5,7	9,0	12,4
DSi-2c	27,0	70,8	12,0	1,5	3,7	1,7	6,4	2,3	1,7
DSi-2d	33,0	71,7	12,8	2,2	3,2	1,3	4,2	4,1	tr.
DSi-2e	24,0	73,9	14,3	1,2	2,5	1,6	3,2	2,6	tr.
DSi-2f	3,0	80,2	5,5	tr.	-	7,6	tr.	2,9	2,9
DSi-2g	3,8	77,9	6,2	-	-	6,6	-	4,2	5,0
DSi-2h	4,0	75,1	7,2	-	tr.	6,9	-	6,1	4,1

tr. = traços (menor que 1,0 mol%); <sup>a</sup> Determinada de acordo com Jol et al. (1999); <sup>b</sup> Gal = galactose, AG = 3,6-anidrogalactose, 2AG = 2-O-metil-3,6-anidrogalactose, 2Gal = 2-O-metilgalactose, 6Gal = 6-O-metilgalactose, 3/4Gal = 3-O-metil e/ou 4-O-metilgalactose, Xil = xilose, Glc = glucose.

Nota-se que no refractionamento de DSi-2 também há diminuição das porcentagens de açúcares anidrogalactosídicos conforme aumenta a força iônica aplicada na cromatografia. Porém as frações de menor rendimento (DSi-2a, DSi-2b, DSi-2f, DSi-2g e DSi-2h) apresentam poucos ou nenhum monossacarídeo metilado, enquanto a fração homogênea DSi-2e e as outras duas frações de maior rendimento (DSi-2c e DSi-2d) apresentam os mesmos derivados apresentados pelas frações do primeiro fracionamento (Tabela 11).

As frações homogêneas DSi-1, DSi-2e e DSi-3, ainda foram submetidas a hidrólise total com ácido fórmico e redução com boroidreto de sódio deuterado (NaBD<sub>4</sub>) a fim de determinar as porcentagens dos monossacarídeos 3-O-metil e 4-O-metilgalactose (Tabela 12).

TABELA 12 - DETERMINAÇÃO DOS MONOSSACARÍDEOS NATURALMENTE METILADOS 3-O-METIL E 4-O-METILGALACTOSE

Monossacarídeos (mol%)	Frações		
	DSi-1	DSi-2e	DSi-3
3-O-metilgalactose	1,0	0,6	0,3
4-O-metilgalactose	5,0	2,6	1,0

Estes açúcares possuem o mesmo tempo de eluição e o mesmo perfil de fragmentação em CLG-EM, pois correspondem a moléculas simétricas (Figura 35) após redução convencional com boroidreto de sódio (NaBH<sub>4</sub>). Por isso, após a hidrólise total, as amostras foram reduzidas com boroidreto de sódio deuterado (NaBD<sub>4</sub>) por 12 horas e depois neutralizadas com ácido acético para retirada do excesso de agente redutor. Posteriormente as amostras foram co-destiladas três vezes com metanol, o que permite a retirada do ácido bórico produzido, na forma de borato de trimetila. Após liofilização, as amostras foram adicionadas de ácido acético anidro e aquecidas por 90 minutos a 120°C.

As amostras na forma de alditol acetato com a ponta redutora adicionada de um deutério foram submetidas a cromatografia líquido-gasosa acoplada a espectrometria de massa (CLG-MS). Desta forma os açúcares 3-O-metil e 4-O-metilgalactose podem ser diferenciados pelos fragmentos *m/z* 130 e 129 (Figura 36), e a quantificação é feita analisando-se as proporções destes fragmentos com relação a área correspondente a estes açúcares no cromatograma.

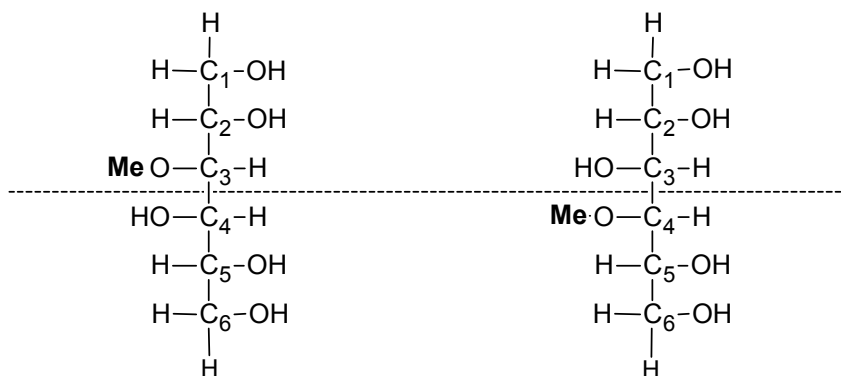


FIGURA 35 - SIMETRIA ENTRE AS MOLÉCULAS DE 3-O-METILGALACTOSE E 4-O-METILGALACTOSE APÓS REDUÇÃO COM  $\text{NaBH}_4$

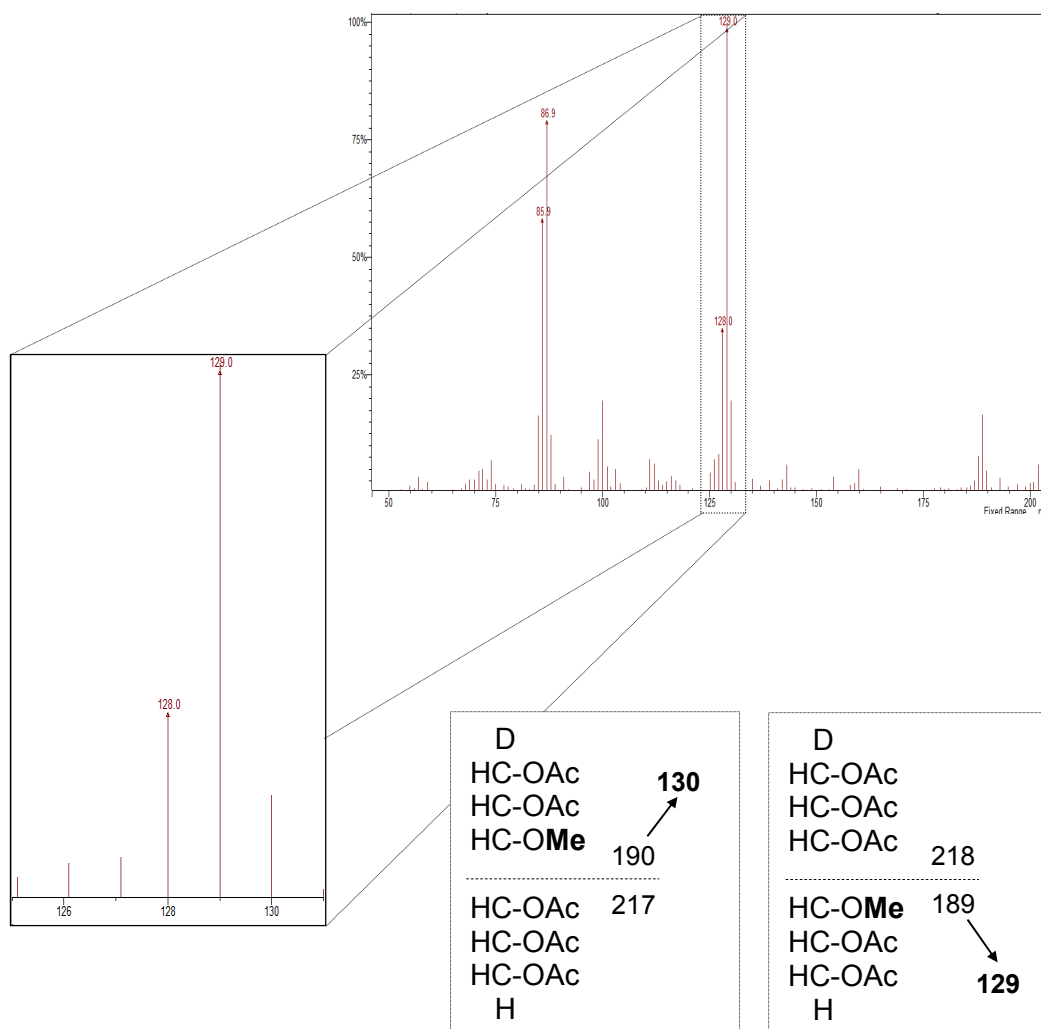


FIGURA 36 - DIFERENCIAÇÃO DOS AÇÚCARES 3-O-METILGALACTOSE E 4-O-METILGALACTOSE ATRAVÉS DOS FRAGMENTOS DE MASSA DOS DERIVADOS OBTIDOS POR HIDRÓLISE, REDUÇÃO COM  $\text{NaBD}_4$ , ACETILAÇÃO E ANÁLISE POR CLG-EM

Pode-se observar (Tabela 12) a predominância do monossacarídeo 4-O-metilgalactose em relação ao 3-O-metilgalactose nas frações homogêneas DSi-1, DSi-2e e DSi-3. Devido ao padrão de ligações glicosídicas apresentado pelas galactanas, as quais são organizadas em cadeias lineares de unidades de  $\beta$ -D-galactopiranosose ligadas através das posições 1 e 3 (unidades A) e unidades de  $\alpha$ -galactopiranosose ligadas através das posições 1 e 4 (unidades B), conclui-se que os monossacarídeos 3-O-metilgalactose representam unidades B, enquanto as unidades de 4-O-metilgalactose devem representar unidades A e/ou terminais não redutores, como unidades simples, ramificando a cadeia polissacarídica.

A presença de unidades de 4-O-metilgalactose na forma de terminais não redutores tem sido observada nas galactanas S2S-3 e S2S-4 de *C. seminervis* obtidas por Zibetti et al. (2009).

#### 6.4.3 GALACTANAS DESPOLIMERIZADAS: ANÁLISE ENANTIOMÉRICA

A determinação da configuração absoluta foi realizada pelo método descrito por Navarro e Stortz (2003). Para verificação da enantiomericidade da galactose e dos monossacarídeos naturalmente metilados 6-O-, 4-O- e 3-O-metilgalactose utilizou-se a amina quirais (S)-1-amino-2-propanol, enquanto que os monossacarídeos 2-O-metilgalactose, 3,6-anidrogactose e 2-O-metil-3,6-anidrogactose foram derivatizados com (S)- $\alpha$ -metilbenzilamina.

As frações SS, DSi, DSi-1, DSi-2c, DSi-2d, DSi-2e, DSi-3, DSi-4 e DSi-5 foram submetidas ao processo de dupla hidrólise-aminação redutiva com as aminas quirais (S)-1-amino-2-propanol e (S)- $\alpha$ -metilbenzilamina na presença de agente redutor cianoborohidreto de sódio. Após acetilação os respectivos derivados alditóis de cada amina 1-deoxi-1-(2'-hidroxipropilamina) e 1-deoxi-1-(1'-feniletilamina) foram analisados por CLG-EM.

A análise dos dados foi realizada com auxílio do Software *MS Data Review* versão 6.9.1, Varian MS Workstation, de forma que a quantificação dos derivados foi realizada após seleção dos íons que os identificam. A proporção de derivados na forma L- ou D- foi relacionada com a quantidade em mol%, de cada monossacarídeo, obtida pela composição monossacarídica.



Os resultados da análise da configuração absoluta estão apresentados na Tabela 13. A análise dos derivados de galactose e 6-metil-galactose não determinados será realizada posteriormente.

TABELA 13 - COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA E ANÁLISE ENANTIOMÉRICA DAS GALACTANAS DE *C. seminervis*

Frações	Composição monossacarídica <sup>a,b</sup> (mol%)												
	Gal <sup>c</sup>		AG		2AG		2Gal		6Gal		3Gal <sup>d</sup>	4Gal	Xil
	D	L	D	L	D	L	D	L	D	L			
SS	nd	nd	2,1	15,8	0,1	1,7	2,1	-	nd	nd	3,5	4,9	
DSi	nd	nd	1,0	15,7	0,3	1,8	3,0	-	nd	nd	0,9	3,5	5,3
DSi-1	nd	nd	1,2	14,3	0,1	2,0	2,7	-	nd	nd	1,0	5,0	6,0
DSi-2c	nd	nd	0,5	11,5	0,2	1,3	3,7	-	nd	nd	6,4	2,3	
DSi-2d	nd	nd	0,5	12,3	0,3	1,9	3,2	-	nd	nd	4,2	4,1	
DSi-2e	nd	nd	1,0	13,3	0,2	1,0	2,5	-	nd	nd	0,6	2,6	2,6
DSi-3	nd	nd	0,8	5,9	0,6	1,6	1,2	-	nd	nd	0,3	1,0	1,4
DSi-4	88,6	1,1	3,1	2,0	0,2 <sup>e</sup>	1,0	-	1,7	-	-	-	1,5	
DSi-5	nd	nd	1,6	0,4	1,0	1,6	0,5 <sup>e</sup>	nd	nd	-	-	2,0	

nd = não determinado; - = não detectado; <sup>a</sup> Composição monossacarídica determinada de acordo com Jol et al. (1999); <sup>b</sup> Análise de enantiomericidade das unidades de galactose, derivados metilados e unidades anidrogalactosídicas foi determinada de acordo com Navarro e Stortz (2003); <sup>c</sup> Gal = galactose, AG = 3,6-anidrogalactose, 2AG = 2-O-metil-3,6-anidrogalactose, 2Gal = 2-O-metilgalactose, 6Gal = 6-O-metilgalactose, 3Gal = 3-O-metilgalactose, 4Gal = 4-O-metilgalactose, Xil = xilose; <sup>d</sup> A quantificação dos derivados 3-O-metil e 4-O-metilgalactose foi realizada com auxílio de redução com NaBD<sub>4</sub>; <sup>e</sup> Quantidade insuficiente para diferenciar entre unidades D- ou L-.

Destaca-se que o monossacarídeo 2-O-metil-3,6-anidrogalactose ocorre principalmente na sua forma L- em todas as frações, enquanto que as unidades de 3,6-anidro- $\alpha$ -D-galactose ocorrem em maior proporção nas frações DSi-4 e DSi-5, o que condiz com a rotação óptica positiva destas (Tabela 9).

A fração DSi-4 apresenta carácter marcante de carragenana, sendo aproximadamente 94% das unidades B pertencentes a série enantiomérica D-.

#### 6.4.4. DESSULFATAÇÃO DAS GALACTANAS DESPOLIMERIZADAS

A dessulfatação solvolítica das galactanas DSi-1, DSi-2e e DSi-3 foi conduzida posto que galactanas dessulfatadas viabilizam a determinação da posição dos grupos sulfato quando acompanhadas por análise de metilação e em geral proporcionam espectros de RMN mais simplificados que auxiliam a análise estrutural destes biopolímeros.

Dentre os produtos da hidrólise redutiva parcial as galactanas despolimerizadas possuem porcentagens variáveis de sulfato, sendo a fração DSi-1 a menos sulfatada com 14,1% de sulfato, contra 23,7 e 29,9% para DSi-2e e DSi-3, respectivamente. Estas frações foram submetidas a dessulfatação solvolítica pelo método de Nagasawa et al. (1979) originando as frações dessulfatadas DSi-1D, DSi-2eD e DSi-3D que mostraram rendimento de 73,0; 54,0 e 67,0%, respectivamente. As frações dessulfatadas DSi-1D, DSi-2eD e DSi-3D apresentam 1,5; 0,1 e 1,8% de sulfato, o que corresponde a 89,6; 99,5 e 93,9% de dessulfatação, respectivamente.

A composição monossacarídica das frações dessulfatadas foi realizada para atestar se o processo de dessulfatação solvolítica não causou degradação na estrutura das galactanas.

TABELA 14 - COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS GALACTANAS DESPOLIMERIZADAS HOMOGÊNEAS NATIVAS E DESSULFATADAS

Frações	Composição monossacarídica <sup>a</sup> (mol%)							
	Gal <sup>b</sup>	AG	2AG	2Gal	6Gal	3/4Gal	Xil	Glc
DSi-1	60,4	15,5	2,1	2,7	3,7	6,0	6,0	3,7
DSi-1D	60,7	14,5	2,2	3,4	4,2	6,7	5,5	2,9
DSi-2e	73,9	14,3	1,2	2,5	1,6	3,2	2,6	tr.
DSi-2eD	70,5	14,5	1,1	3,8	1,7	4,9	3,3	tr.
DSi-3	85,0	6,7	2,2	1,2	1,5	1,3	1,4	tr.
DSi-3D	85,7	6,9	1,2	1,5	1,2	1,2	1,6	tr.

tr. = traços (menor que 1,0 mol%); <sup>a</sup> Determinada de acordo com Jol et al. (1999); <sup>b</sup> Gal = galactose, AG = 3,6-anidrogactose, 2AG = 2-O-metil-3,6-anidrogactose, 2Gal = 2-O-metilgalactose, 6Gal = 6-O-metilgalactose, 3/4Gal = 3-O-metil e/ou 4-O-metilgalactose, Xil = xilose, Glc = glucose.

Nota-se que a composição monossacarídica das frações dessulfatadas é bastante semelhante a das frações nativas (Tabela 14), portanto não houve perda significativa de monossacarídeos, principalmente de unidades de 3,6-anidrogactose que são caracteristicamente mais lábeis.

O método de dessulfatação por solvólise em meio contendo dimetilsulfóxido, metanol e piridina permite promover a dessulfatação sem a perda de unidades anidrogactosídicas ou despolimerização das moléculas devido a quebra das ligações glicosídicas, como ocorre em métodos que se utilizam de catálise ácida (TAKANO, 2002).

Ainda é possível afirmar que os substituintes 4,6-O-(1'-carboxietilideno) que compõem as unidades piruvatadas também são substancialmente mantidos após a dessulfatação, pois, como será destacado adiante, os espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  das frações dessulfatadas DSi-1D, DSi-2eD e DSi-3D apresentam sinais nas regiões de 25,0 e 175 ppm, as quais se referem, respectivamente, aos carbonos metílico e carboxílico das unidades monossacarídicas substituídas por ácido pirúvico.

## 6.5 ESPECTROSCOPIA DE RMN DAS GALACTANAS DESPOLIMERIZADAS: ASPECTOS GERAIS

Os deslocamentos químicos dos carbonos anoméricos das unidades de galactose nas galactanas não depende apenas do tipo de ligação com a unidade vizinha [ $\alpha(1\rightarrow3)$  ou  $\beta(1\rightarrow4)$ ] e dos efeitos secundários causados pelos substituintes, depende também da configuração absoluta destes resíduos, além das condições determinadas pelo ambiente químico da vizinhança (USOV et al., 1980).

Em geral, as unidades A ( $\beta$ -D-galactose ligada a  $\alpha$ -L-galactose) de agaranas originam um sinal de C-1 em 103,7 ppm enquanto a mesma unidade de  $\beta$ -D-galactose nas carragenanas ligadas a  $\alpha$ -D-galactose apresenta o sinal em 104,8 ppm. Nestes casos as unidades de  $\alpha$ -L-galactose aparecem no intervalo de 100,9-101,1 ppm, enquanto  $\alpha$ -D-galactose em 96,1 ppm, 3,6-anidro- $\alpha$ -L-galactose em 98,0-98,5 ppm e 3,6-anidro- $\alpha$ -D-galactose em 95,1-95,7 ppm. No entanto devido a complexidade dos polissacarídeos e as altas massas moleculares, as galactanas sulfatadas originam espectros que apresentam regiões anoméricas complexas com sinais alargados, de maneira que deslocamentos menos intensos podem não ser

visualizados. Assim baixas porcentagens de enantiômeros podem não ser detectadas por RMN de  $^{13}\text{C}$  (STORTZ e CERZO, 2000).

A intensidade do sinal de um carbono em RMN de  $^{13}\text{C}$  depende do seu tempo de relaxação e da contribuição do efeito nuclear Overhauser<sup>5</sup> (efeito NOE), o qual intensifica os sinais e diminui o tempo de aquisição dos espectros desacoplados. Portanto, a princípio, experimentos de RMN de  $^{13}\text{C}$  não permitem correlação entre a intensidade de deslocamentos químicos com a quantidade de monossacarídeos correspondentes. No entanto nas condições de aquisição dos espectros de polissacarídeos todos os átomos de carbono estão totalmente relaxados e a amplificação das diferentes ressonâncias pelo efeito NOE mantêm-se no mesmo nível e próximo ao valor máximo, de maneira que a razão entre as intensidades dos diferentes sinais são relacionados, de forma semi-quantitativa, com a proporção das diferentes unidades de açúcar nos polissacarídeos (USOV, 1984).

Os espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  das frações despolimerizadas DSi-1, DSi-2e, DSi-3, DSi-4 e DSi-5 são apresentados nas Figuras 37 e 38, sendo que a última destaca as regiões anoméricas. Ressalta-se que estas frações não apresentam os deslocamentos referentes a 4-metil-morfolina residual proveniente do agente redutor utilizado na despolimerização. Isto indica que as galactanas estão livres deste resíduo reacional, de forma que a amina terciária 4-MM provavelmente foi trocada pelo íon sódio durante o fracionamento na cromatografia de troca aniônica em DEAE-Sephacel, desfazendo-se a interação entre a 4-metil-morfolina e os grupos sulfato destas galactanas.

Estas cinco frações são piruvatadas posto que seus espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  apresentam o deslocamento químico na região de 25 ppm (Figura 37), referente ao carbono metílico do acetal de ácido pirúvico substituinte nos carbonos 4 e 6 das unidades A em configuração R (GAREGG et al., 1979).

Como discutido anteriormente, de acordo com a análise da composição monossacarídica, a quantidade de unidades anidrogactosídicas foi sendo reduzida conforme as frações foram eluídas com maior força iônica durante a cromatografia de troca aniônica (sentido DSi-1 → DSi-5).

---

<sup>5</sup> O efeito NOE consiste na aplicação de energia aos hidrogênios durante o relaxamento e ao término do pulso de energia estes hidrogênios transferem a energia recebida para os carbonos vizinhos.

A comparação dos espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  das frações despolimerizadas DSi-1, DSi-2e, DSi-3, DSi-4 e DSi-5 mostra a redução na quantidade de unidades de 3,6-anidrogactitol, que pode ser identificada pela intensidade dos sinais referentes aos C-1 (63,2 ppm), C-2 (71,1 ppm), C-3 (83,5 ppm), C-4 (86,3 ppm), C-5 (75,3 ppm) e C-6 (73,0 ppm). O sinal de C-4 corresponde a unidades de 3,6-anidrogactitol ligadas a  $\beta$ -D-galactose 2-sulfato (Figura 37) (GONÇALVES et al., 2002).

Desta forma pode-se concluir que a hidrólise reductiva parcial foi capaz de ocasionar maior número de clivagens em regiões mais ricas em unidades anidrogactosídicas produzindo fragmentos de menor massa molecular ricos nestas unidades (DSi-1, DSi-2e e DSi-3) e fragmentos de maior massa molecular, altamente sulfatados (Tabela 9) e pobres em 3,6-anidrogactose e seu derivado metilado 2-O-metil-3,6-anidrogactose (DSi-4 e DSi-5).

Os espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  das galactanas obtidas por hidrólise reductiva parcial apresentam regiões anoméricas bastante complexas, com numerosos deslocamentos e alargamento dos sinais. Isto é devido a variedade de açúcares constituintes destas moléculas, bem como a heterogeneidade de substituições por grupos sulfato e de díades ao longo do polímero que causam variações nos deslocamentos e consequente sobreposição e alargamento dos sinais (Figura 38).

A análise dos perfis de RMN de  $^{13}\text{C}$  das regiões anoméricas das frações (Figura 38), demonstra que as galactanas homogêneas DSi-1, DSi-2e e DSi-3 são enriquecidas por unidades pertencentes a série enantiomérica L-, enquanto as galactanas presentes nas frações DSi-4 e DSi-5 são compostas principalmente por unidades da série D-, como discutido a seguir.

O caráter predominantemente de carragenanas para as últimas galactanas foi comprovado com a análise da configuração absoluta (Tabela 13) e com os valores positivos de rotação óptica (Tabela 9). De modo diferente, as rotações ópticas negativas observadas para DSi-1, DSi-2e e DSi-3 indicam a prevalência de unidades com caráter de agarana.

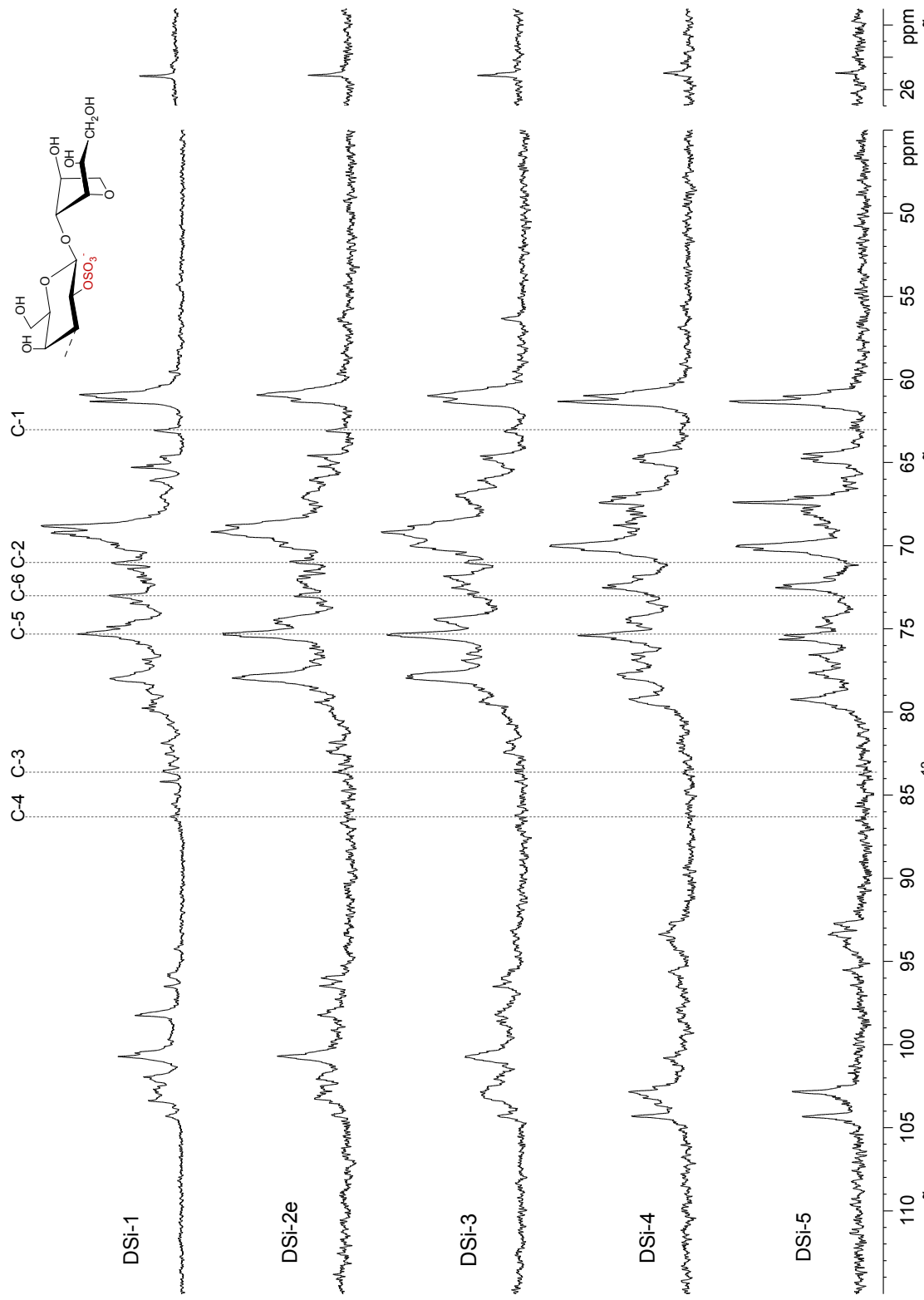


FIGURA 37 - COMPARAÇÃO DOS ESPECTROS DE RMN DE  $^{13}\text{C}$  DAS PRINCIPAIS FRAÇÕES DESPOLIMERIZADAS: LOCALIZAÇÃO DOS CARBONOS DAS UNIDADES DE 3,6-ANIDROGALACTITOL C-1 (63,2 ppm), C-2 (71,1 ppm), C-3 (83,5 ppm), C-4 (86,3 ppm), C-5 (75,3 ppm) E C-6 (73,0 ppm)

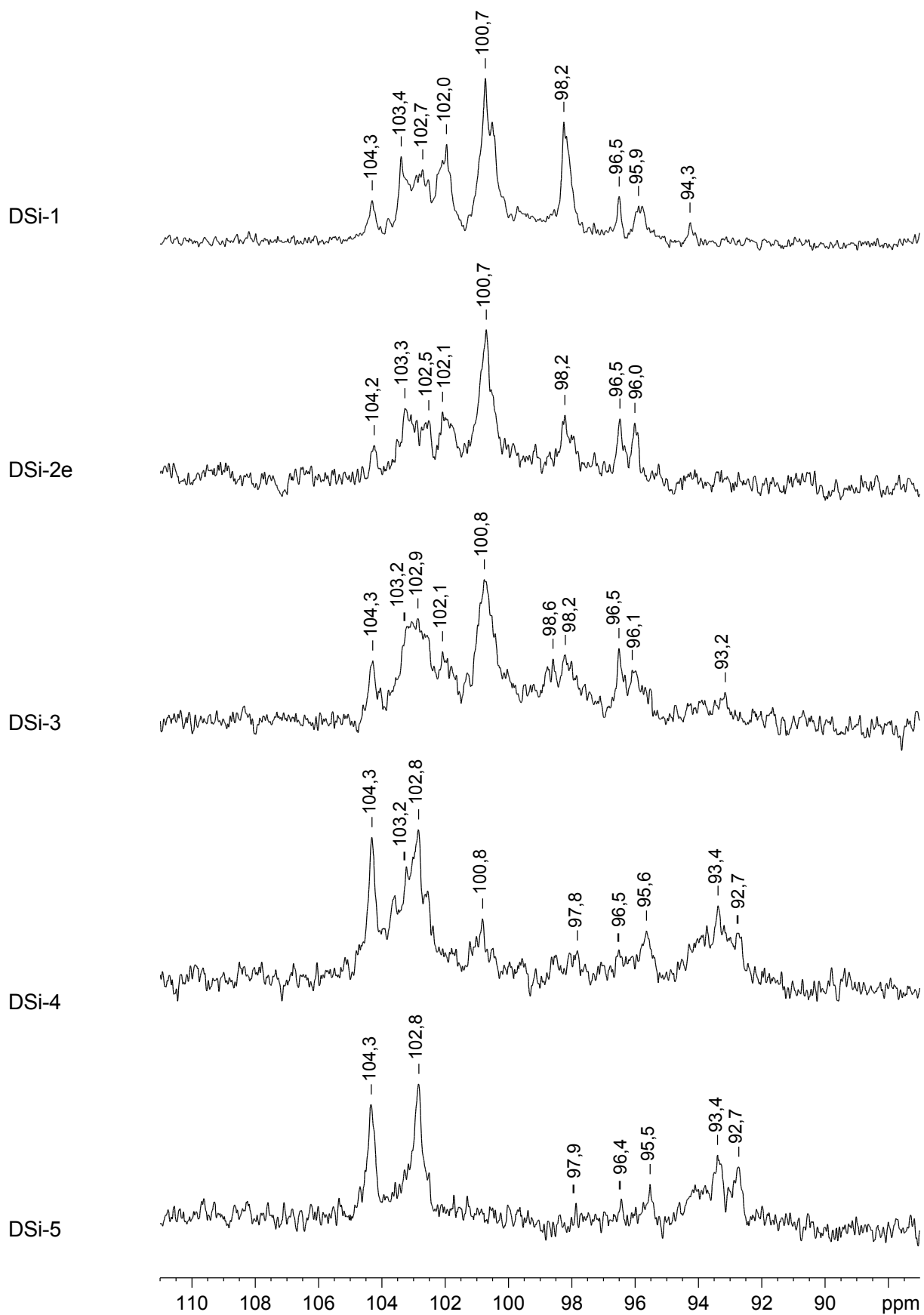


FIGURA 38 - COMPARAÇÃO DOS ESPECTROS DE RMN DE  $^{13}\text{C}$  DAS PRINCIPAIS FRAÇÕES DESPOLIMERIZADAS: REGIÃO ANOMÉRICA

## 6.6 ESPECTROSCOPIA DE RMN DAS GALACTANAS DESPOLIMERIZADAS: ANÁLISES MONO E BIDIMENSIONAIS

As galactanas despolimerizadas foram avaliadas por RMN de  $^{13}\text{C}$ ,  $^1\text{H}$ , HSQC, DEPT135 e COSY nas suas formas nativas (DSi-1, DSi-2e, DSi-3, DSi-4, DSi-5) e dessulfatadas (DSi-1D, DSi-2eD, DSi-3D).

### 6.6.1 ANÁLISES ESPECTROSCÓPICAS DE DSi-1 E DSi-1D

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da galactana despolimerizada DSi-1 apresenta na região anomérica pelo menos dez sinais (Figura 39). Dentre estes o sinal mais intenso em 100,7 ppm foi atribuído a unidades de  $\beta$ -D-galactose 2-sulfato e/ou  $\alpha$ -L-galactose. Após dessulfatação o significativo decréscimo deste sinal com o concomitante aumento do sinal de C-2 livre em 69,8 ppm (Figura 40) confirma que a galactana DSi-1 é sulfatada em C-2 nas unidades A. Considerando a alta porcentagem de dessulfatação de DSi-1 (89,6%) o sinal em 100,7 ppm no espectro de DSi-1D foi atribuído ao C-1 de unidades de  $\alpha$ -L-galactose, o qual está sobreposto no espectro de DSi-1 ao de  $\beta$ -D-galactose 2-sulfatada (MILLER e BLUNT, 2000; ZIBETTI et al., 2005 e 2009).

Na região anomérica do espectro de DSi-1 outro sinal de alta intensidade em 98,2 ppm também corresponde a unidades enantioméricas da série L- (3,6-anidro- $\alpha$ -L-galactose). Estas unidades podem estar não substituídas em C-2 e substituídas neste carbono por grupos O-metil e O-glicosil (MILLER e BLUNT, 2000). A glicosilação em C-2 de unidades de 3,6-anidro- $\alpha$ -L-galactose tem indicação pelos resultados de metilação (item 6.7).

Após dessulfatação o espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da fração DSi-1D apresenta um sinal fino em 97,9 ppm correspondente ao C-1 de unidades de 3,6-anidro- $\alpha$ -L-galactose e em 98,4 ppm correspondente a estas unidades substituídas em C-2 por grupos O-metil e/ou O-glicosil (ZIBETTI et al., 2005).

Sinais anoméricos em 96,5 e 95,9 ppm no espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de DSi-1 foram atribuídos a unidades de  $\alpha$ -D-galactose sulfatadas circundadas por diferentes ambientes químicos. O sinal em 95,9 ppm também pode corresponder a unidades de 3,6-anidro- $\alpha$ -D-galactose assim como o sinal em 94,3 ppm. O desaparecimento destes sinais no espectro de DSi-1D indica sulfatação destas unidades e/ou



influência de unidades vizinhas sulfatadas (unidades B) (USOV et al., 1980; FALSHAW et al., 2003).

Adicionalmente o sinal em 95,9 ppm pode ser em parte atribuído a unidades de 3,6-anidro- $\alpha$ -L-galactose 2-sulfato. Ressalta-se que o prévio assinalamento do C-1 deste anidro açúcar sulfatado (em 96,1 - 96,2 ppm) nas galactanas nativas homogêneas de *Cryptonemia crenulata* e *C. seminervis* foi corroborado pelo seu desaparecimento nos correspondentes espectros das galactanas dessulfatadas e pelos resultados de metilação (presença de 3,6-anidrogalactose entre os produtos de metilação do polímero nativo e incremento correspondente do derivado 3,6-anidro-2-O-metilgalactose entre os produtos de metilação do polímero dessulfatado) (ZIBETTI et al., 2005 e 2009). No presente trabalho os resultados de metilação indicam que as unidades de 3,6-anidrogalactose não são sulfatadas em C-2.

Experimentos homonucleares de correlação  $^1\text{H}/^1\text{H}$  (COSY) e heteronucleares de  $^1\text{H}/^{13}\text{C}$  (HSQC) das frações DSi-1 e DSi-1D confirmam os assinalamentos dos C-2 não substituídos e sulfatados em 69,8 e 77,9 ppm, respectivamente.

No espectro de HSQC da fração DSi-1 a correlação do C-1 das unidades de 3,6-anidro- $\alpha$ -L-galactose 2-sulfato (C-1 em 95,9 ppm) com o H-1 é representado pelo sinal em 5,39 ppm, o qual correlaciona com o H-2 de sinal 4,68 ppm no experimento de COSY. O experimento de HSQC da fração DSi-1 indica a correlação 4,68/77,9 entre o H-2 e o C-2 das unidades de 3,6-anidro- $\alpha$ -L-galactose 2-sulfato, confirmando o caráter sulfatado do carbono representado pelo sinal em 77,9 ppm.

O espectro de HSQC da fração DSi-1D apresenta a correlação 104,8/4,65 referente a unidades de  $\beta$ -D-galactose. No espectro de COSY da fração dessulfatada o sinal de H-1 em 4,65 ppm acopla com o H-2 em 3,75 ppm e este acopla com o C-2 em 69,8 ppm no espectro de HSQC de DSi-1D, o que caracteriza o C-2 não substituído desta fração.

A comparação dos espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  das frações DSi-1 e DSi-1D, na região do anel, permite perceber a diminuição do sinal em 77,9 ppm na fração dessulfatada como concomitante aumento do sinal em 69,8 ppm.

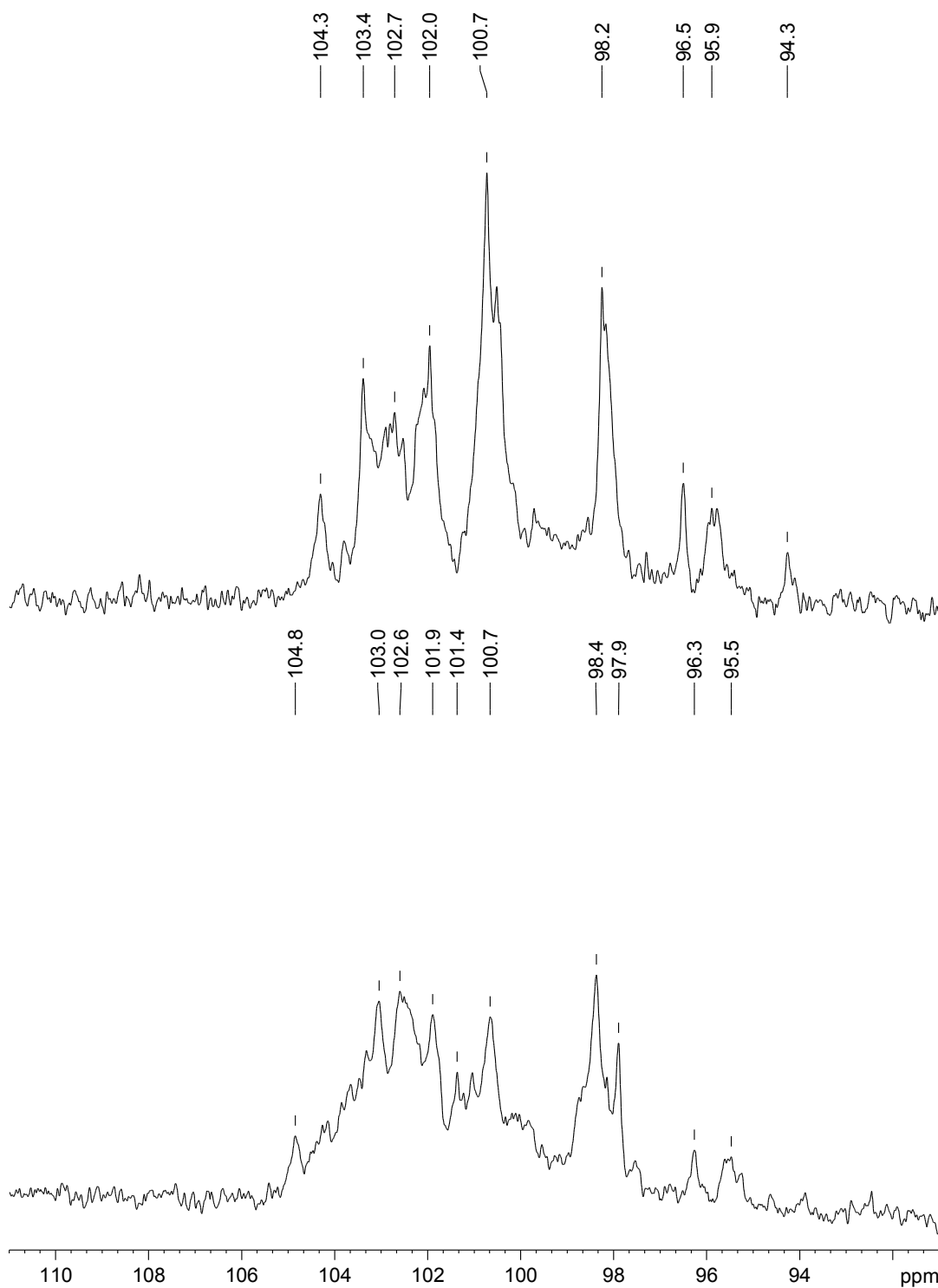


FIGURA 39 - ESPECTROS DE RMN DE  $^{13}\text{C}$  DAS FRAÇÕES NATIVA DSI-1 (ACIMA) E DESSULFATADA DSI-1D (ABAIXO): REGIÃO ANOMÉRICA  
Solvente:  $\text{D}_2\text{O}$  (70°C); acetona como padrão interno (30,2 ppm)

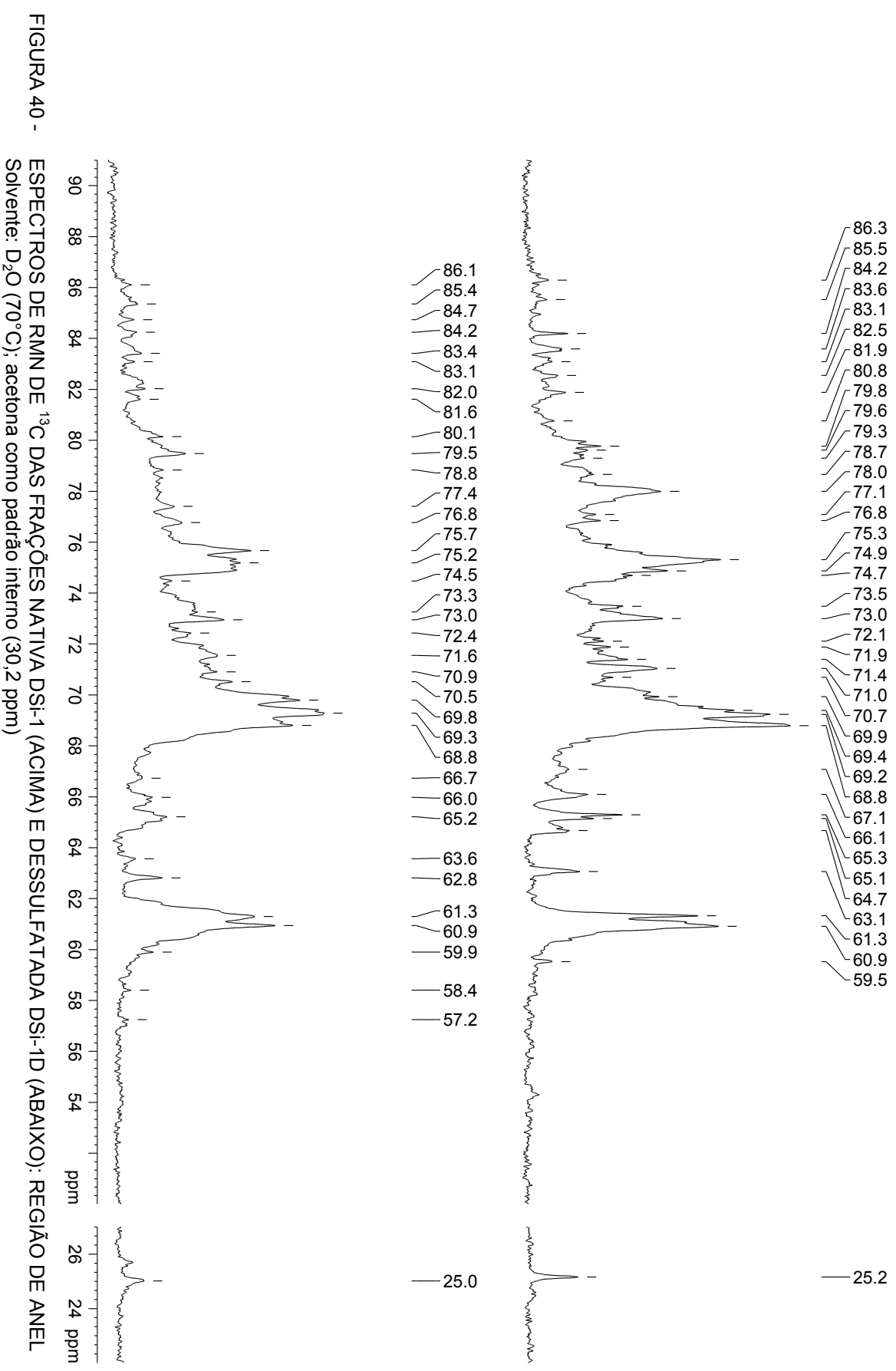


FIGURA 40 -

Pelo menos quatro sinais anoméricos correspondentes a unidades de  $\beta$ -D-galactose estão presentes nos espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  da galactana despolimerizada DSi-1 (104,3; 103,4; 102,7 e 102,0 ppm) e dessulfatada DSi-1D (104,8; 103,0; 102,6 e 101,9 ppm) (Tabela 16).

Adicionalmente o espectro destas galactanas apresentam sinais em 25,2 e 175,8 ppm correspondentes ao grupo metil e carboxil de acetal de ácido pirúvico (GAREGG et al., 1979).

Ressalta-se que na região do anel alguns sinais se apresentaram invertidos em RMN de  $^{13}\text{C}$ -DEPT135, experimento em que os sinais de  $\text{CH}_2$  aparecem em fase negativa com relação a linha de base. Os sinais DEPT invertidos em 68,9; 64,7; 60,9; 61,3 e 65,3/65,1 ppm são correspondentes aos C-6 de 3,6-anidrogalactose,  $\beta$ -D-galactose piruvatada (C-5 em 66,1 ppm),  $\beta$ -D-galactose,  $\alpha$ -D-galactose e C-5 de xilose, respectivamente. A presença de unidades precursoras de 3,6-anidrogalactose e/ou  $\beta$ -D-galactose 6-sulfato é confirmada pelo sinal, de baixa intensidade em 67,1 ppm (DEPT invertido).

O desaparecimento do deslocamento em 67,1 ppm após dessulfatação indica que o mesmo está relacionado com grupos sulfato.

O processo de hidrólise redutiva parcial promove a clivagem das ligações anidrogalactosídicas originando unidades de 3,6-anidrogalactitol como extremidade redutora (USOV e ELASHVILI, 1991). Estas unidades puderam ser identificadas nos experimentos de RMN de  $^{13}\text{C}$ , de forma que os C-1 de 3,6-anidro- $\alpha$ -L-galactitol (LAGOH) são assinalados pelos sinais em 63,1 e 62,9 ppm nas frações nativa DSi-1 e dessulfatada DSi-1D, respectivamente, os quais se mostram invertidos nos experimentos de RMN de  $^{13}\text{C}$ -DEPT135. Neste experimento também se observa a inversão dos sinais em 73,0 ppm em ambas as frações, evidenciando a presença dos C-6 das unidades de 3,6-anidrogalactitol (GONÇALVES et al., 2002).

As unidades de 3,6-anidrogalactitol podem estar ligadas a diferentes tipos de unidades A como  $\beta$ -D-galactose, 4,6-O-(1'-carboxietilideno)- $\beta$ -D-galactose,  $\beta$ -D-galactose 2-sulfato e 4,6-O-(1'-carboxietilideno)- $\beta$ -D-galactose 2-sulfato (Figura 41).

A comparação dos dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  obtidos para as frações DSi-1 e DSi-1D permite apontar a diminuição na intensidade dos sinais em 75,2 e 70,9 ppm na fração dessulfatada, correspondentes ao C-5 e C-2 das unidades de anidrogalactitol ligadas a 4,6-O-(1'-carboxietilideno)- $\beta$ -D-galactose 2-sulfato (GONÇALVES et al., 2002).

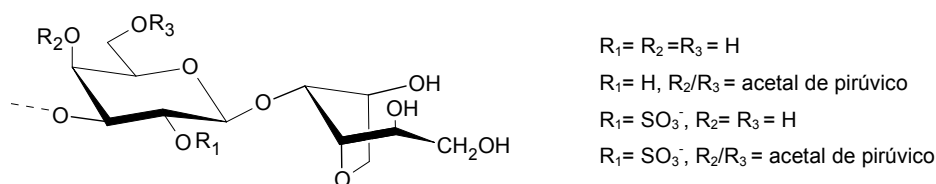


FIGURA 41 - REPRESENTAÇÃO DAS POSSÍVEIS UNIDADES A LIGADAS ÀS EXTREMIDADES DE 3,6-ANIDRO- $\alpha$ -L-GALACTITOL NA GALACTANA DESPOLIMERIZADA DSI-1

Os espectros de HSQC das frações nativa e dessulfatada permitem o assinalamento dos carbonos e hidrogênios correspondentes às unidades de 3,6-anidro- $\alpha$ -L-galactitol (Tabela 15) ligadas a diferentes unidades A (Figura 41) presentes na galactana despolimerizada DSI-1.

TABELA 15 - CORRELAÇÕES PRESENTES NOS ESPECTROS DE HSQC DAS FRAÇÕES NATIVA DSI-1 E DESSULFATADA DSI-1D ATRIBUÍDAS ÀS UNIDADES DE 3,6-ANIDRO- $\alpha$ -L-GALACTITOL (LAGOH) LIGADAS A DIFERENTES UNIDADES A

	DSi-1			DSi-1D		
	C	H	Unidade A $\rightarrow$ LAGOH	C	H	Unidade A $\rightarrow$ LAGOH
1	63,1 <sup>a</sup>	3,67	G2S	62,8	3,66	G
		3,73	GP e GP2S		3,70	GP
2	71,0	3,96	GP	70,9	3,96	GP
		4,26	GP2S		-	
3	83,6	3,96	GP e GP2S	83,4	3,91	G
					3,95	GP
4	85,5	4,34	G	85,4	4,33	G
		86,3	G2S		-	
5	75,3	4,42	GP2S	75,2	4,40	GP
6a	73,0 <sup>b</sup>	4,01	G2S	73,0	3,98	G
6b		3,86			3,86	

<sup>a</sup> Os hidrogênios 3,67 e 3,73 que correlacionam com o carbono 63,1 correspondem a H-1 de diferentes unidades de LAGOH; <sup>b</sup> Os hidrogênios 4,01 e 3,86 que correlacionam com o carbono 73,0 correspondem aos H-6a e H-6b da metila de um só tipo de unidades LAGOH, as ligadas a G2S.

As correlações esquematizadas da Tabela 15 são indicadas pelos espectros de HSQC na região de anel das frações DSi-1 e DSi-1D (Figuras 42 e 43), sendo que as correlações marcadas com apóstrofe (') representam a diferença de deslocamentos de acordo com o tipo de unidade A que se liga a unidade de 3,6-anidrogactitol.

É interessante ressaltar que o carbono em 86,1 ppm da fração dessulfatada DSi-1D não apresenta correlação no espectro de HSQC, o que indica a dessulfatação das unidades de  $\beta$ -D-galactose 2-sulfato, que quando ligadas a 3,6-anidrogactitol originam a correlação 86,3/4,31 observada na fração nativa (insertos das Figuras 42 e 43).

Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  das galactanas despolimerizadas DSi-1 e DSi-1D estão representados nas Figuras 44 e 45.

O espectro de DSi-1 apresenta na região  $\alpha$ -anomérica (Figura 44) sinais principais em 5,15; 5,31 e 5,39 ppm além de outros sinais de menor intensidade (5,00; 5,08; 5,48; 5,55 e 5,74 ppm). No espectro de DSi-1D esta região é modificada pela diminuição da intensidade dos sinais em 5,30 e 5,39 ppm e aparecimento do sinal em 5,24 ppm.

Para ambas as galactanas a substituição por acetal de ácido pirúvico é comprovada pelos sinais em 1,47 e 1,49 ppm, correspondentes aos hidrogênios do grupo metil deste substituinte (CHIOVITTI et al., 1997).

Adicionalmente os sinais em 3,41 e 3,53 ppm podem ser atribuídos aos hidrogênios dos substituintes O-metil em unidades de 6-O-metil- $\beta$ -D-galactose e 2-O-metil-3,6-anidro- $\alpha$ -L-galactose (MURANO et al., 1992).

Experimentos de HSQC com as frações DSi-1 e DSi-1D permitiram assinalar vários hidrogênios presentes nos respectivos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  bem como confirmar a presença das díades esquematizadas na Tabela 16.

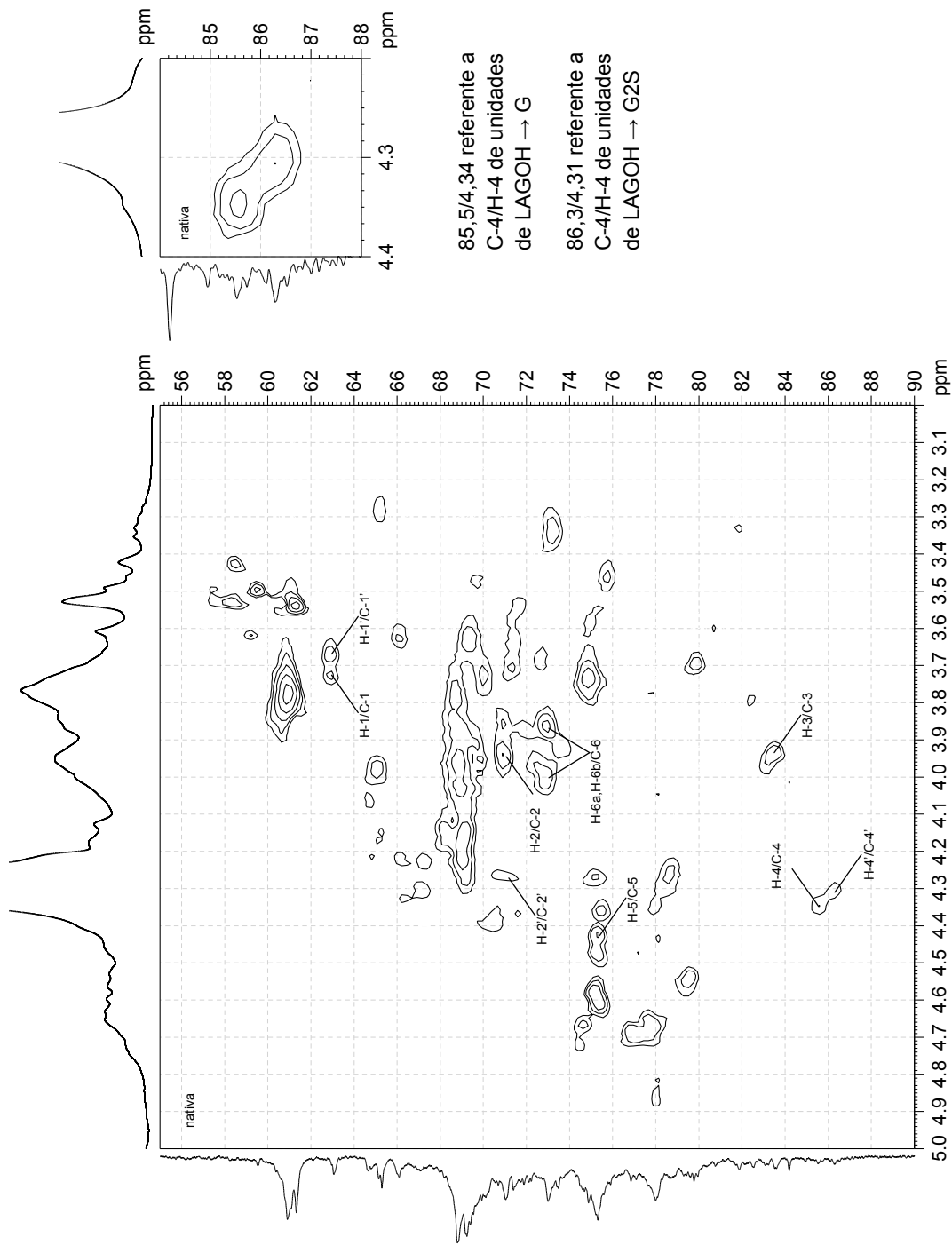


FIGURA 42 - ESPECTRO DE HSQC DA GALACTANA NATIVA DSI-1 Solvente: D<sub>2</sub>O (70°C); calibração por metil de acetal de ácido pirúvico (25,0/1,49 ppm)

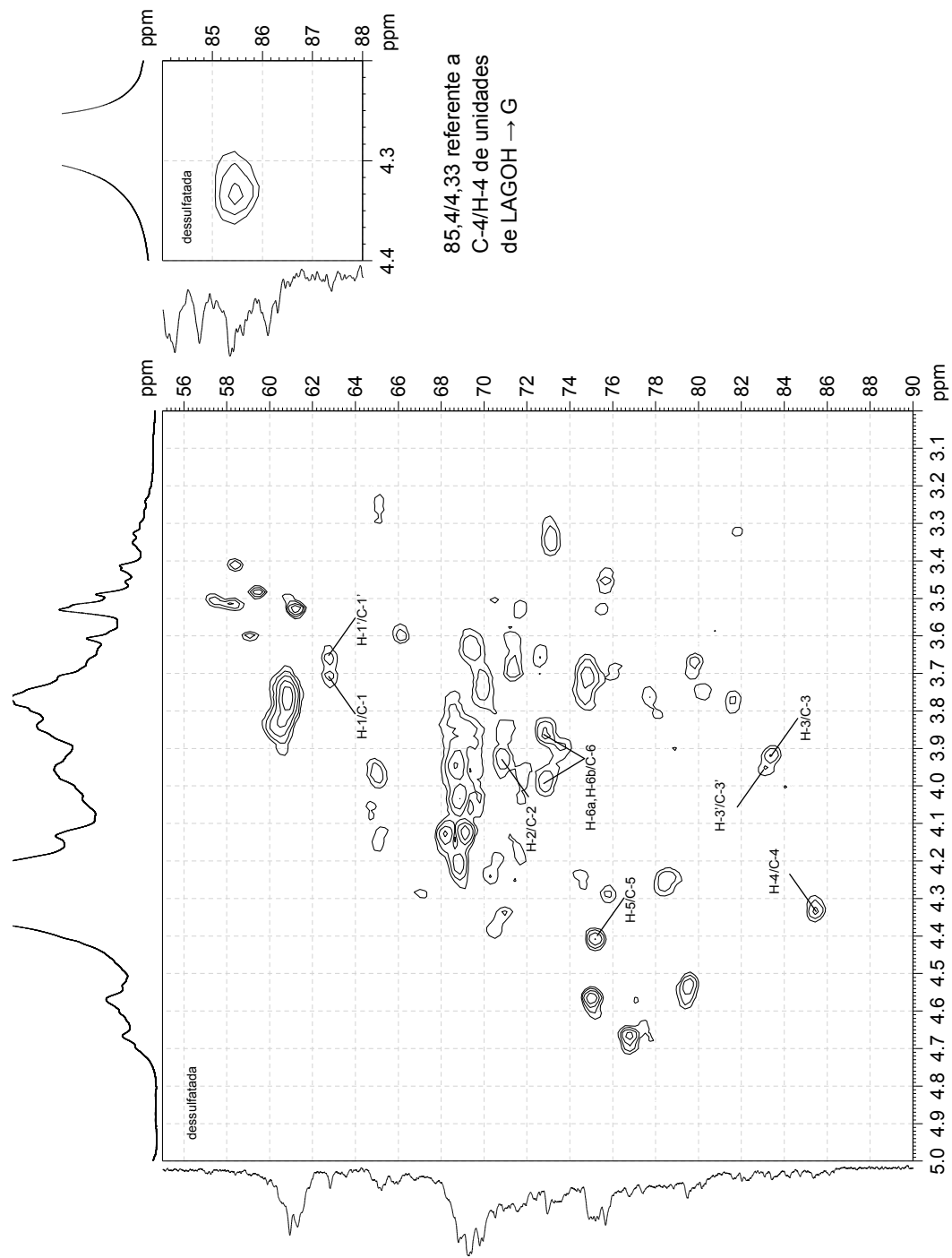


FIGURA 43 - ESPECTRO DE HSQC DA GALACTANA DESSULFATADA DSI-1D Solvente: D<sub>2</sub>O (70°C); calibração por metil de acetal de ácido pirúvico (25,0/1,49 ppm)



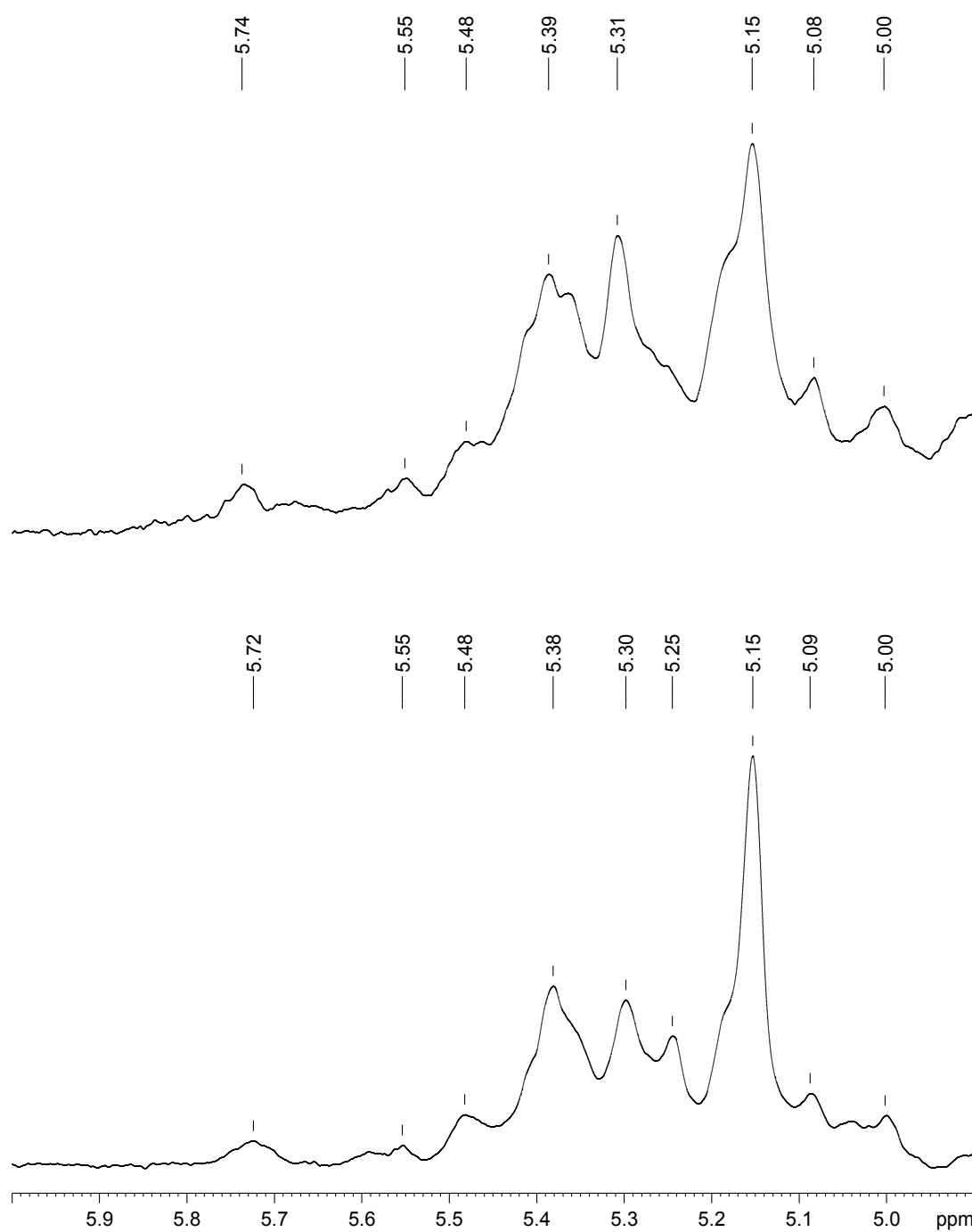


FIGURA 44 - ESPECTROS DE RMN de <sup>1</sup>H DAS FRAÇÕES NATIVA DSi-1 (ACIMA) E DESSULFATADA DSi-1D (ABAIXO): REGIÃO α-ANOMÉRICA  
Solvente: D<sub>2</sub>O (70°C); acetona como padrão interno (2,224 ppm)

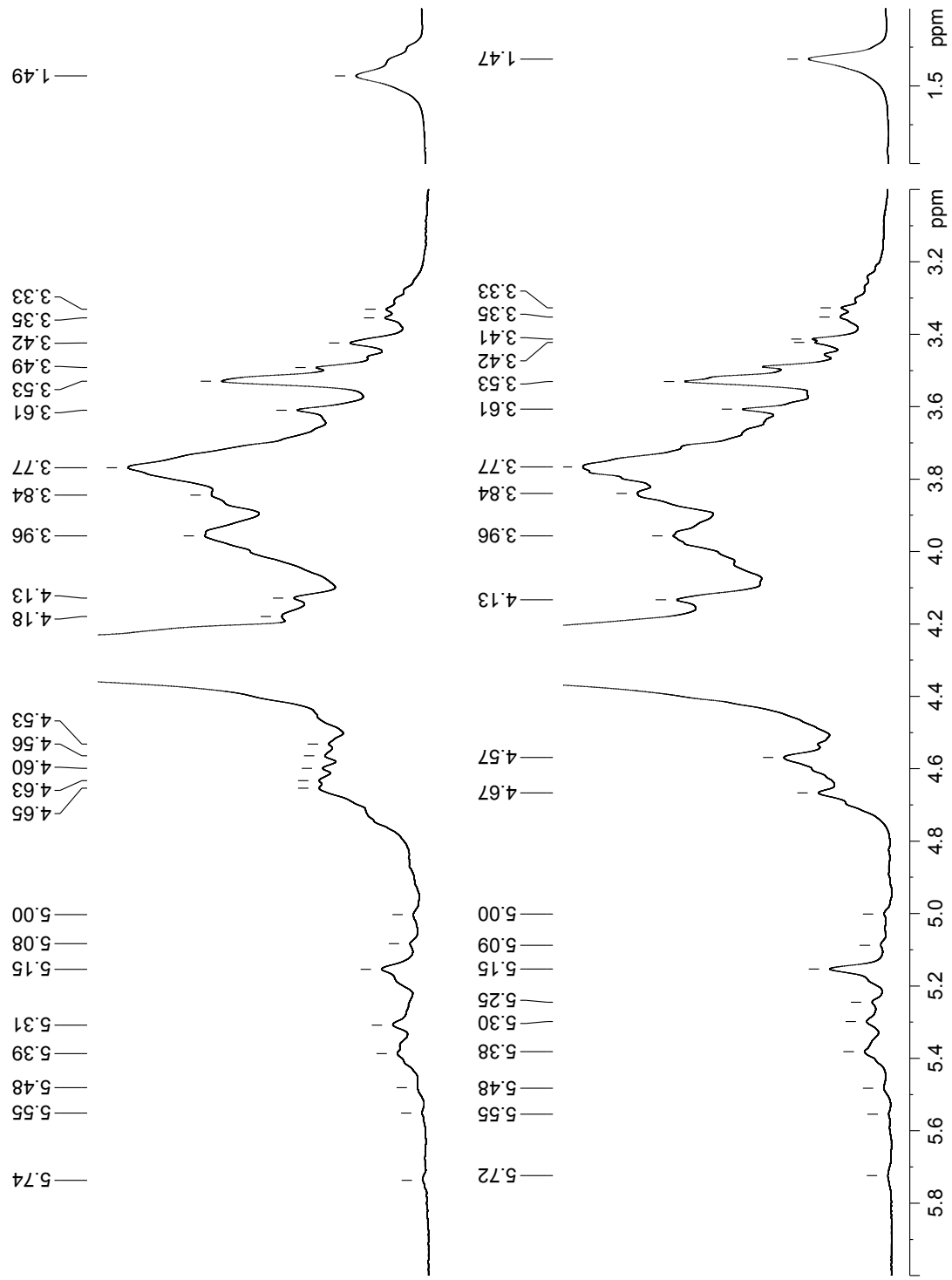


FIGURA 45 - ESPECTROS DE RMN DE <sup>1</sup>H DAS FRAÇÕES NATIVA DSI-1 (ACIMA) E DESSULFATADA DSI-1D (ABAIXO)  
 Solvente: D<sub>2</sub>O (70°C); acetona como padrão interno (2,224 ppm)

TABELA 16 - PRINCIPAIS ASSINALAMENTOS DE DÍADES PRESENTES NAS GALACTANAS NATIVA DSI-1 E DESSULFATADA DSI-1D

	DSi-1				DSi-1D						
	Díades <sup>a</sup>	C-1	H-1	H-1	C-1	H-1	H-1	H-1			
GP2S <sup>b</sup>	→ DA	100,7	4,75	→ 94,3	5,15	GP	→ DA	101,9	4,57	→ 95,5	5,15
GP	→ DA	102,0	4,60	→ 95,9	5,15						
			4,63								
G(P)	→ DS	104,3	4,65	→ 95,9	5,39	GP	→ D	104,8	4,65	→ 95,5	5,15
G(P)	→ DS	104,3	4,65	→ 96,5	5,31	G	→ D	104,8	4,65	→ 96,3	5,15
G(P)	→ LA	102,0	4,60	→ 98,2	5,15	G	→ LA	101,9	4,57	→ 98,4	5,15
			4,63								
G2S(P)	→ LA2R	100,7	4,75	→ 98,2	5,39	GP	→ LA	101,9	4,57	→ 98,4	5,25
	LA2R			98,2	5,50	G(P)	→ LA2R	101,9	4,57	→ 98,4	5,38
GP	→ L	103,4	4,65	→ 100,7	5,31	GP	→ L	103,0	4,67	→ 100,7	5,30
			4,47								
GP	→ L6S	103,4	4,65	→ 100,5	5,39						
			4,47								
G	→ LA2M	102,7	4,53	→ 98,2	5,15	G	→ LA2M	102,6	4,57	→ 98,4	5,15
	LA2S			95,9	5,39						

<sup>a</sup> Nomenclatura de Knutsen et al., 1994; <sup>b</sup> P = substituinte acetal de ácido pirúvico em C-4 e C-6; S = sulfato substituinte na posição indicada; R = cadeia lateral simples de galactose ou xilose na posição indicada; M = O-metil substituinte na posição indicada.

### 6.6.2 ANÁLISES ESPECTROSCÓPICAS DE DSi-2e E DSi-2eD

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da galactana despolimerizada DSi-2e apresenta na região anomérica pelo menos oito sinais (Figura 46). Dentre estes o sinal de maior intensidade em 100,7 ppm foi atribuído a unidades de  $\beta$ -D-galactose 2-sulfato. O desaparecimento deste sinal após dessulfatação e o concomitante aumento do sinal de C-2 livre em 69,4 ppm (Figura 47) confirma que a galactana DSi-2e é sulfatada em C-2 nas unidades A. Considerando a alta porcentagem de dessulfatação de DSi-2e (99,5%) o sinal em 100,5 ppm no espectro de DSi-2eD foi atribuído ao C-1 de unidades de  $\alpha$ -L-galactose, o qual está sobreposto no espectro de DSi-2e ao de  $\beta$ -D-galactose 2-sulfatada (MILLER e BLUNT, 2000; ZIBETTI et al., 2005 e 2009). Enquanto que o sinal em 100,8 ppm foi atribuído ao carbono acetálico das unidades substituídas por acetal de ácido pirúvico (carbonos metílico e carboxílico em 25,2 e 175,5 ppm, respectivamente) (GAREGG et al., 1979).

Segundo Gorin et al. (1982), o tempo de relaxamento ( $T_1$ ) do carbono acetálico pode impedir sua detecção por espectroscopia de RMN de  $^{13}\text{C}$ , mesmo quando unidades substituídas por acetal de ácido pirúvico estão presentes em quantidades significativas. Portanto a ressonância do carbono acetálico comumente não é observada no espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de galactanas de algas vermelhas. No entanto o fato do sinal em 100,8 ppm não apresentar qualquer correlação no espectro de HSQC da fração DSi-2eD pode indicar a presença deste tipo de carbono acetálico, o qual está ligado a um grupo metil, um grupo carboxílico e a dois oxigênios, de forma que não apresenta acoplamentos com quaisquer hidrogênios.

Na região anomérica do espectro de DSi-2e outro sinal, em 98,2 ppm, corresponde a unidades enantioméricas da série L- (3,6-anidro- $\alpha$ -L-galactose), as quais podem estar não substituídas em C-2 ou substituídas neste carbono por grupos O-metil e/ou O-glicosil. A presença dos sinais em 82,4 e 81,9 ppm, que correspondem ao C-3 de  $\beta$ -D-galactose ligada a unidades de 2-O-metil-3,6-anidro- $\alpha$ -L-galactose e 3,6-anidro- $\alpha$ -L-galactose, respectivamente, comprovam a presença das díades G  $\rightarrow$  LA2M e G  $\rightarrow$  LA (MILLER e BLUNT, 2000).

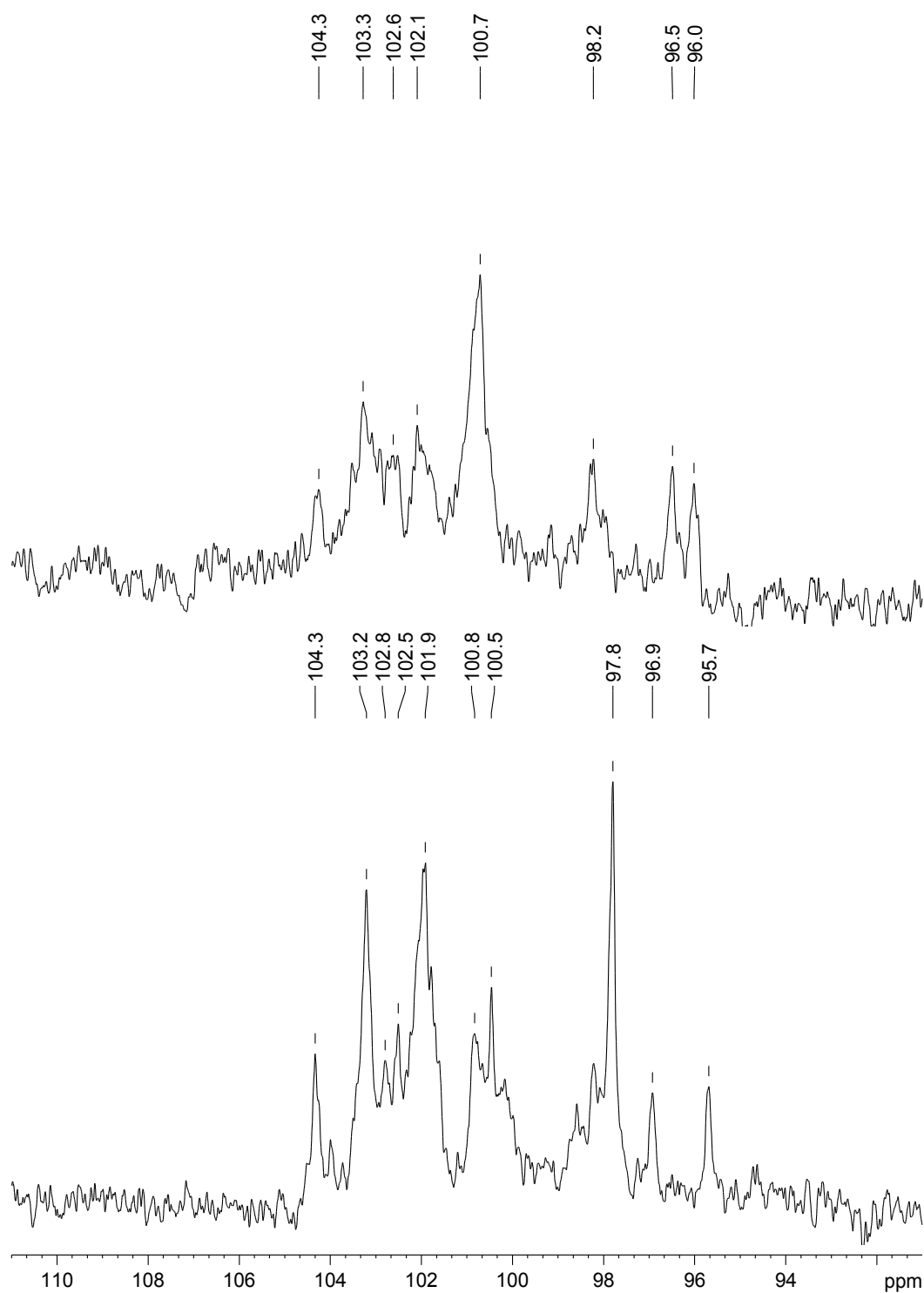


FIGURA 46 - ESPECTROS DE RMN DE  $^{13}\text{C}$  DAS FRAÇÕES NATIVA DSi-2e (ACIMA) E DESSULFATADA DSi-2eD (ABAIXO): REGIÃO ANOMÉRICA  
Solvente:  $\text{D}_2\text{O}$  (70°C); acetona como padrão interno (30,2 ppm)

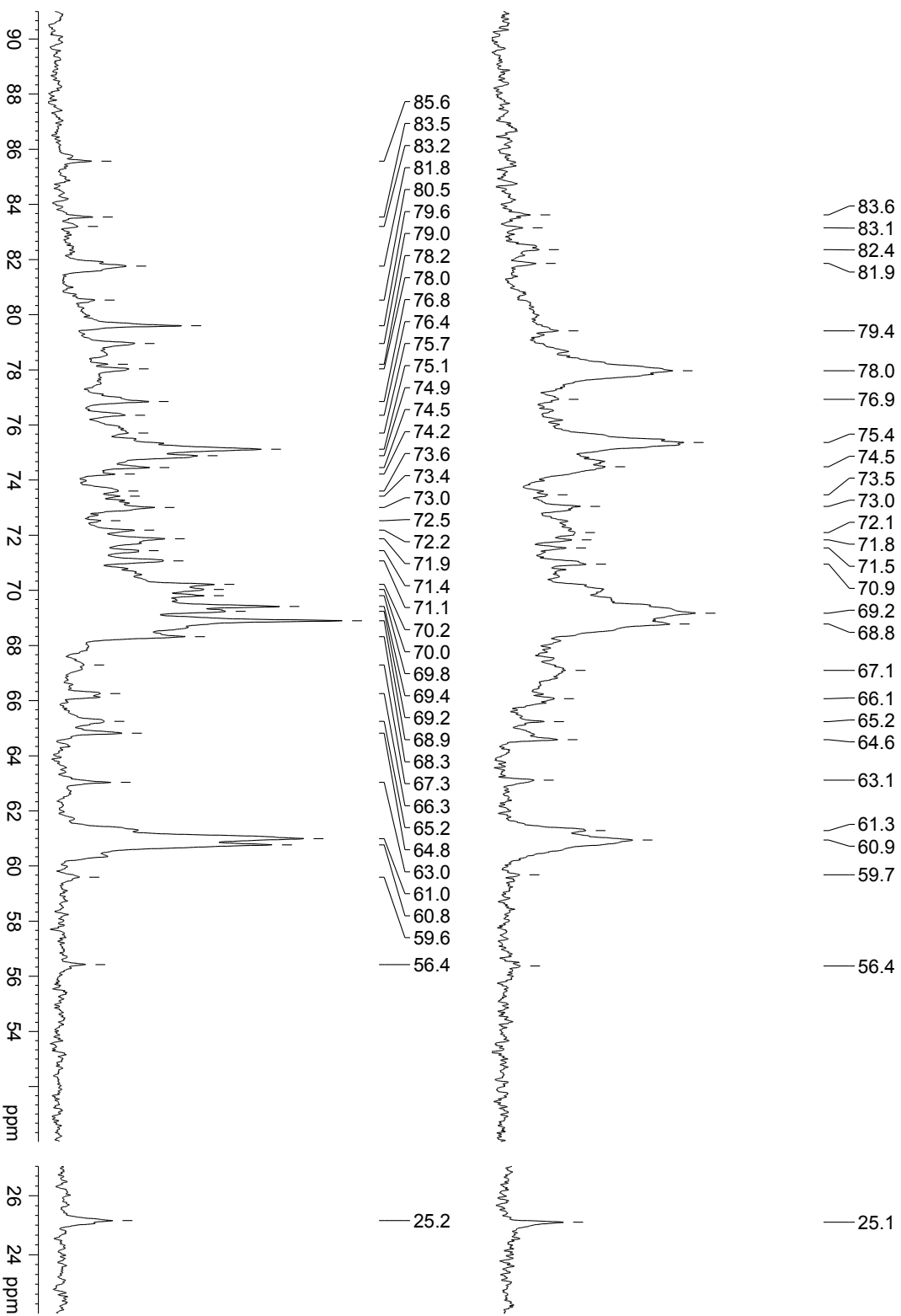


FIGURA 47 - ESPECTROS DE RMN DE <sup>13</sup>C DAS FRAÇÕES NATIVA DSI-2e (ACIMA) E DESSULFATADA DSI-2eD (ABAIXO): REGIÃO DE ANEL Solvente: D<sub>2</sub>O (70°C); acetona como padrão interno (30,2 ppm)

Os sinais anoméricos em 96,0 e 96,5 ppm no espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de DSi-2e foram atribuídos a unidades de 3,6-anidro- $\alpha$ -L-galactose 2-sulfato, sendo que unidades de  $\alpha$ -D-galactose sulfatadas também podem estar representadas pelo sinal em 96,0 ppm. Na fração dessulfatada DSi-2eD o sinal em 95,7 foi atribuído ao C-1 das unidades de  $\alpha$ -D-galactose não substituída (USOV et al., 1980; FALSHAW et al., 2003; ZIBETTI et al., 2005).

O desaparecimento dos sinais em 96,0 e 96,5 ppm no espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  na fração dessulfatada DSi-2eD e o aumento da intensidade do sinal em 97,8 ppm permite concluir que este é referente ao C-1 das unidades de 3,6-anidro- $\alpha$ -L-galactose não substituídas em C-2 (ZIBETTI et al., 2005). O sinal em 96,9 ppm no espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de DSi-2eD foi atribuído, em parte, ao C-1 de unidades de 2-O-metilgalactose, posta a correlação de 96,9 ppm com hidrogênios em 5,39 ppm.

Experimentos homonucleares de correlação  $^1\text{H}/^1\text{H}$  (COSY) e heteronucleares de  $^1\text{H}/^{13}\text{C}$  (HSQC) das frações DSi-2e e DSi-2eD confirmam os assinalamentos dos C-2 não substituídos e sulfatados em 69,4 e 78,0 ppm, respectivamente.

No espectro de HSQC da fração DSi-2e a correlação do C-1 das unidades de  $\beta$ -D-galactose 2-sulfato (C-1 em 100,7 ppm) com o H-1 é representado pelo sinal em 4,75 ppm, o qual correlaciona com o H-2 de sinal 4,66 ppm no experimento de COSY. No experimento de HSQC da fração nativa o sinal em 4,66 ppm correlaciona com o C-2 em 78,0 ppm, o que confirma o caráter sulfatado do carbono.

O espectro de HSQC da fração DSi-2eD apresenta a correlação 102,8/4,47 referente a unidades de  $\beta$ -D-galactose. No espectro de COSY desta fração dessulfatada o sinal de H-1 em 4,47 ppm acopla com o H-2 em 3,67 ppm, que por sua vez acopla com o C-2 em 69,4 ppm no espectro de HSQC de DSi-2eD, o que caracteriza o C-2 não substituído desta fração. Estes experimentos permitem caracterizar o efeito  $\alpha$  sofrido pelo C-2 das unidades de  $\beta$ -D-galactose quando sulfatadas neste carbono.

Há diferentes sinais anoméricos correspondentes a unidades de  $\beta$ -D-galactose presentes nos espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  da galactana despolimerizada DSi-2e (104,3; 103,3; 102,6 e 102,1 ppm) e dessulfatada DSi-2eD (104,3; 103,2; 102,8; 102,5 e 101,9 ppm) (Tabela 18).

A região do anel dos espectros de DSi-2e e DSi-2eD apresentou alguns sinais invertidos em RMN de  $^{13}\text{C}$ -DEPT135. Os sinais DEPT invertidos em 64,6/64,8; 60,9/60,8; 61,3/61,0 e 65,2 ppm são correspondentes aos C-6 de  $\beta$ -D-galactose piruvatada (C-5 em 66,1/66,3 ppm),  $\beta$ -D-galactose,  $\alpha$ -D-galactose e C-5 de xilose, respectivamente. A presença de unidades precursoras de 3,6-anidrogactose e/ou  $\beta$ -D-galactose 6-sulfato é confirmada pelo sinal alargado centrado em 67,1 ppm, o qual é intensamente diminuído na fração dessulfatada (67,3 ppm) (DEPT invertidos).

As galactanas DSi-2e e DSi-2eD apresentam, assim como em DSi-1 e DSi-1D, unidades de 3,6-anidrogactitol, as quais puderam ser identificadas nos experimentos de HSQC. A Tabela 17 mostra os assinalamentos dos carbonos e hidrogênios correspondentes as unidades de 3,6-anidro- $\alpha$ -L-galactitol ligadas a diferentes unidades A. No entanto percebe-se que as frações DSi-2e e DSi-2eD mostram intensidades diminuídas dos sinais de 3,6-anidro- $\alpha$ -L-galactitol quando comparadas com as frações DSi-1 e DSi-1D. Por isso, algumas correlações não são claras e não puderam ser assinaladas.

TABELA 17 - CORRELAÇÕES PRESENTES NOS ESPECTROS DE HSQC DAS FRAÇÕES NATIVA DSi-2e E DESSULFATADA DSi-2eD ATRIBUÍDAS ÀS UNIDADES DE 3,6-ANIDRO- $\alpha$ -L-GALACTITOL (LAGOH) LIGADAS A DIFERENTES UNIDADES A

	DSi-2e			DSi-2eD		
	C	H	Unidade A → LAGOH	C	H	Unidade A → LAGOH
1	63,0	3,66	G2S	63,0	3,65	G
		3,72	GP e GP2S		3,71	GP
2	70,9	4,25	GP2S	71,2	3,94	GP
		3,93	G2S			
3	83,6	3,93	G2S	83,5	3,91	G
					3,96	GP
4	-			85,6	4,31	GP
					4,34	G
5	75,4	4,40	G e GP	75,1	4,41	G e GP
		4,44	G2S e GP2S			
6a	73,0	4,00	G2S	73,0	4,00	GP
6b		3,84			3,87	



Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  das galactanas despolimerizadas DSi-2e e DSi-2eD estão representados nas Figuras 48 e 49.

O espectro de DSi-2e apresenta na região  $\alpha$ -anomérica (Figura 48) sinais principais em 5,39 e 5,31 ppm além de outros sinais de menor intensidade (5,18 e 5,16 ppm). No espectro de DSi-2eD esta região é modificada pela diminuição da intensidade dos sinais em 5,39 e 5,31 ppm e aumento da intensidade dos sinais em 5,24 e 5,15 ppm.

O aumento considerável do sinal em 5,15 ppm está correlacionado com a dessulfatação das unidades de 3,6-anidro- $\alpha$ -L-galactose 2-sulfato (C-1 em 96,0 e 96,5 ppm; H-1 em 5,31 e 5,39 ppm). Com a retirada do substituinte em C-2 as unidades de 3,6-anidro- $\alpha$ -L-galactose apresentam C-1 em 97,8 ppm e H-1 em 5,15 ppm (ZIBETTI et al., 2009).

As substituições por acetal de ácido pirúvico presentes nas galactanas DSi-2e e DSi-2eD são comprovadas pelos sinais em 1,46 e 1,49 ppm, correspondentes aos hidrogênios do grupo metil deste substituinte, os quais acoplam com os carbonos em 25,2 e 25,1 ppm (CHIOVITTI et al., 1997).

Adicionalmente o sinal em 3,52 ppm pode ser atribuído aos hidrogênios dos substituintes O-metil em unidades de 2-O-metil-3,6-anidro- $\alpha$ -L-galactose, enquanto o sinal em 3,47 ppm, que acopla com 56,4 ppm pode ser referente a unidades 3-O-metil substituídas (MURANO et al., 1992; NAVARRO e STORTZ, 2008).

Experimentos de HSQC com as frações DSi-2e e DSi-2eD permitiram assinalar diversos hidrogênios presentes nos respectivos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  bem como confirmar a presença das díades esquematizadas na Tabela 18.

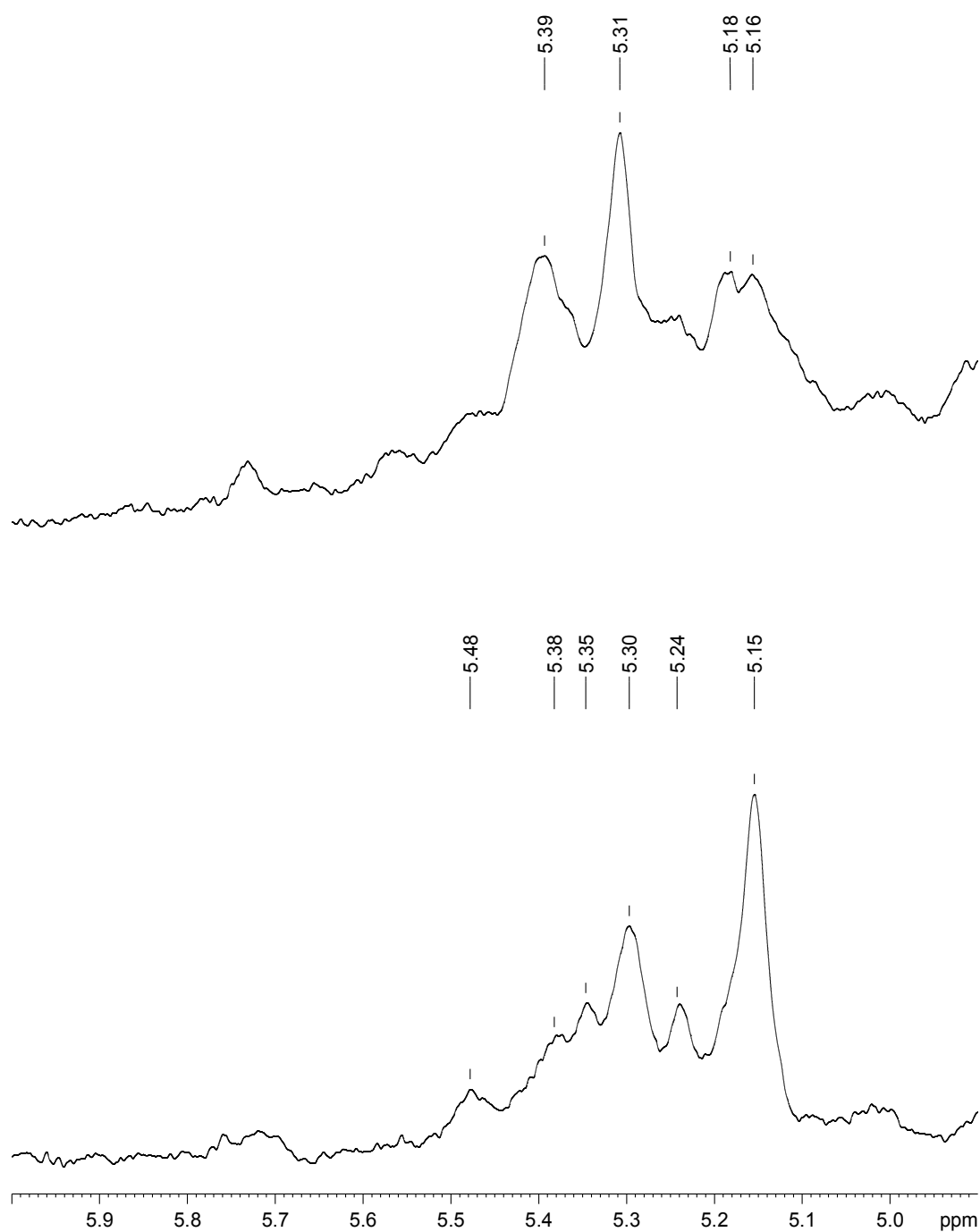


FIGURA 48 - ESPECTROS DE RMN DE  $^1\text{H}$  DAS FRAÇÕES NATIVA DSi-2e (ACIMA) E DESSULFATADA DSi-2eD (ABAIXO): REGIÃO  $\alpha$ -ANOMÉRICA  
Solvente:  $\text{D}_2\text{O}$  ( $70^\circ\text{C}$ ); acetona como padrão interno (2,224 ppm)

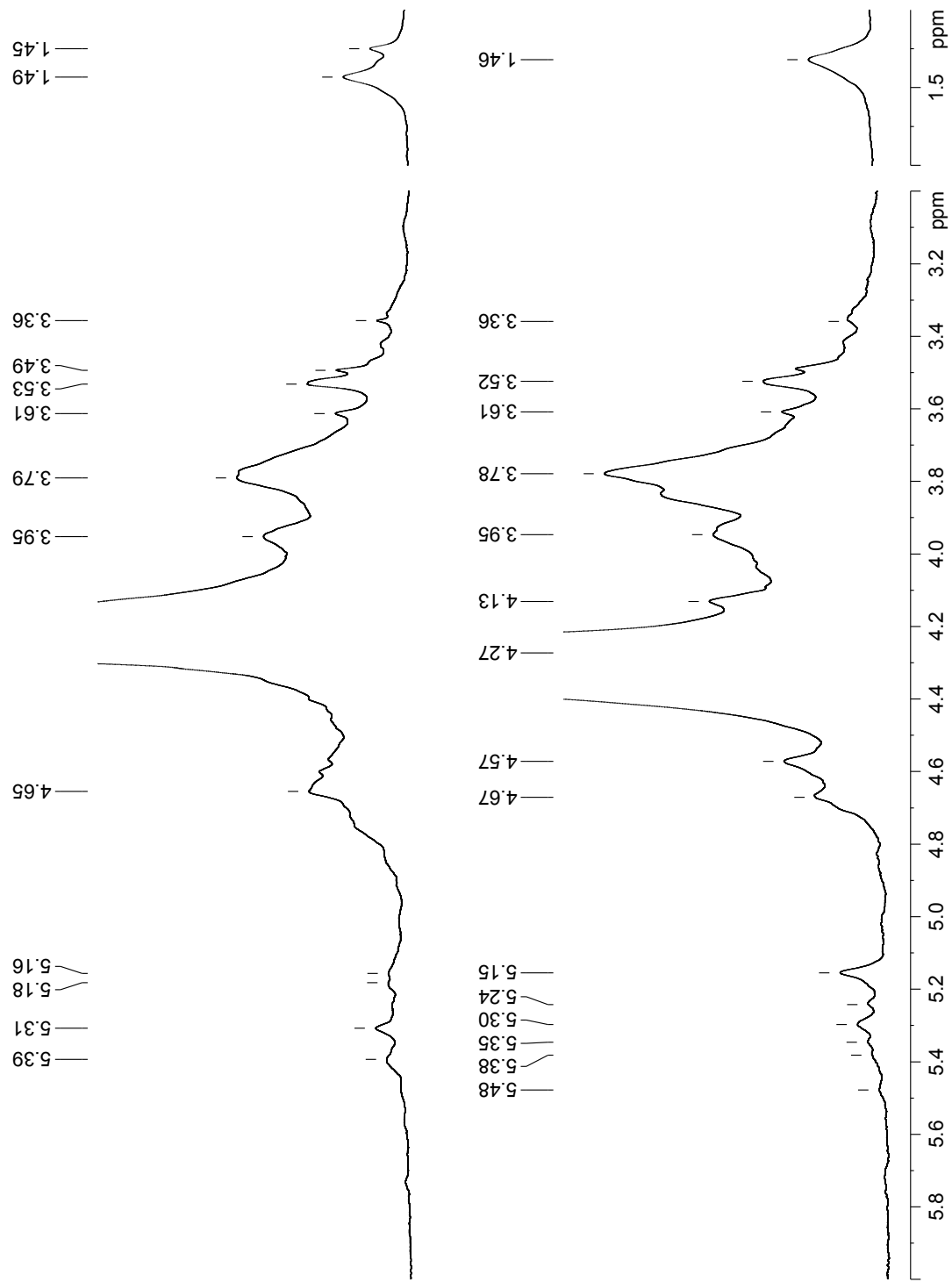


FIGURA 49 - ESPECTROS DE RMN DE <sup>1</sup>H DAS FRAÇÕES NATIVA DSI-2e (ACIMA) E DESSULFATADA DSI-2eD (ABAIXO)  
 Solvente: D<sub>2</sub>O (70°C); acetona como padrão interno (2,224 ppm)

TABELA 18 - PRINCIPAIS ASSINALAMENTOS DE DÍADES PRESENTES NAS GALACTANAS NATIVA DSI-2e E DESSULFATADA DSI-2eD

Díades <sup>a</sup>	DSi-2e				DSi-2eD									
	C-1	H-1	C-1	H-1	Díades	C-1	H-1	C-1	H-1					
G(P)(6R) <sup>b</sup>	DS	104,2	4,65	→	96,0	5,39	G(P)(6R)	→	D	104,3	4,67	→	95,7	5,17
G(P)	L(6S)	103,3	4,65	→	100,7	5,31	G(P)	→	L	103,2	4,47	→	100,5	5,30
G	LA2M	102,5	4,52	→	98,2	5,15								
G2S(P)	LA	102,1	4,61	→	98,2	5,18	GP	→	LA	101,9	4,57	→	97,8	5,24
G2S	LA2S	100,7	4,75	→	96,5	5,31	G	→	LA	102,8	4,47	→	97,8	5,15
					96,0	5,39				101,9				

<sup>a</sup> Nomenclatura de Knutsen et al., 1994; <sup>b</sup> P = substituinte acetal de ácido pirúvico em C-4 e C-6; S = sulfato substituinte na posição indicada; R = cadeia lateral simples de galactose ou xilose na posição indicada; M = O-metil substituinte na posição indicada.

### 6.6.3 ANÁLISES ESPECTROSCÓPICAS DE DSI-3 E DSI-3D

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da galactana despolimerizada DSI-3 (Figura 50) apresenta na região anomérica pelo menos nove sinais bastante alargados, o que condiz com o alto teor de sulfato (29,9%) para esta fração. Dentre estes os sinais de maior intensidade em 100,8 e 102,9 ppm foram atribuídos a unidades de  $\beta$ -D-galactose 2-sulfato e  $\beta$ -D-galactose, respectivamente. O desaparecimento do sinal em 100,8 ppm após dessulfatação e o concomitante aumento do sinal de C-2 livre em 69,4 ppm (Figura 51) confirma que a galactana DSI-3 é sulfatada em C-2 nas unidades A. Considerando a alta porcentagem de dessulfatação de DSI-3 (93,9%) o sinal em 100,4 ppm no espectro de DSI-3D foi atribuído ao C-1 de unidades de  $\alpha$ -L-galactose, o qual está sobreposto no espectro de DSI-3 ao de  $\beta$ -D-galactose 2-sulfatada (MILLER e BLUNT, 2000; ZIBETTI et al., 2005 e 2009).

Na região anomérica do espectro de DSI-3 outros sinais também correspondem a unidades enantioméricas da série L-. O sinal em 96,5 ppm corresponde a unidades de 3,6-anidro- $\alpha$ -L-galactose 2-sulfato, enquanto o sinal em 98,2 ppm refere-se a unidades de 3,6-anidro- $\alpha$ -L-galactose, as quais podem estar não substituídas em C-2 e substituídas neste carbono por grupos O-metil. A presença dos sinais em 82,4 e 81,9 ppm, que correspondem ao C-3 de  $\beta$ -D-galactose ligada a unidades de 2-O-metil-3,6-anidro- $\alpha$ -L-galactose e 3,6-anidro- $\alpha$ -L-galactose, respectivamente, comprovam as díades  $G \rightarrow \text{LA2M}$  e  $G \rightarrow \text{LA}$  (MILLER e BLUNT, 2000).

O sinal anomérico em 93,2 ppm no espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de DSI-3 foi atribuído a unidades de 3,6-anidro- $\alpha$ -D-galactose 2-sulfato e/ou  $\alpha$ -D-galactose 2,6-disulfato (CIANCIA et al., 1993).

Após dessulfatação o espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da fração DSI-3D mostra sinais mais definidos e intensos. O sinal intenso em 97,8 ppm refere-se ao C-1 de unidades de 3,6-anidro- $\alpha$ -L-galactose, enquanto os sinais em 95,7 e 94,7 ppm foram atribuídos a unidades de  $\alpha$ -D-galactose e 3,6-anidro- $\alpha$ -D-galactose, respectivamente (USOV et al., 1980; ZIBETTI et al., 2005).

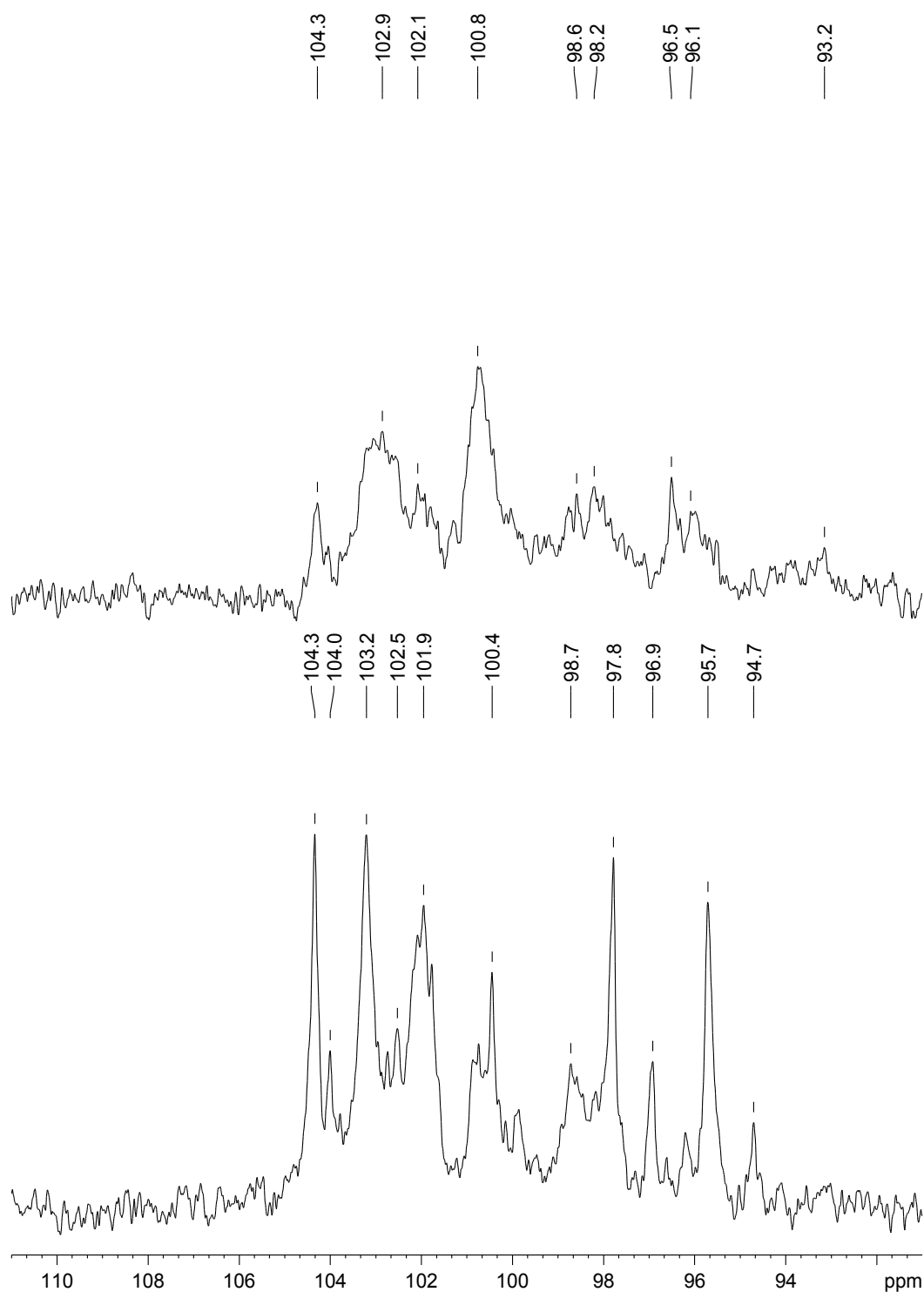


FIGURA 50 - ESPECTROS DE RMN DE  $^{13}\text{C}$  DAS FRAÇÕES NATIVA DSi-3 (ACIMA) E DESSULFATADA DSi-3D (ABAIXO): REGIÃO ANOMÉRICA  
Solvente:  $\text{D}_2\text{O}$  ( $70^\circ\text{C}$ ); acetona como padrão interno (30,2 ppm)

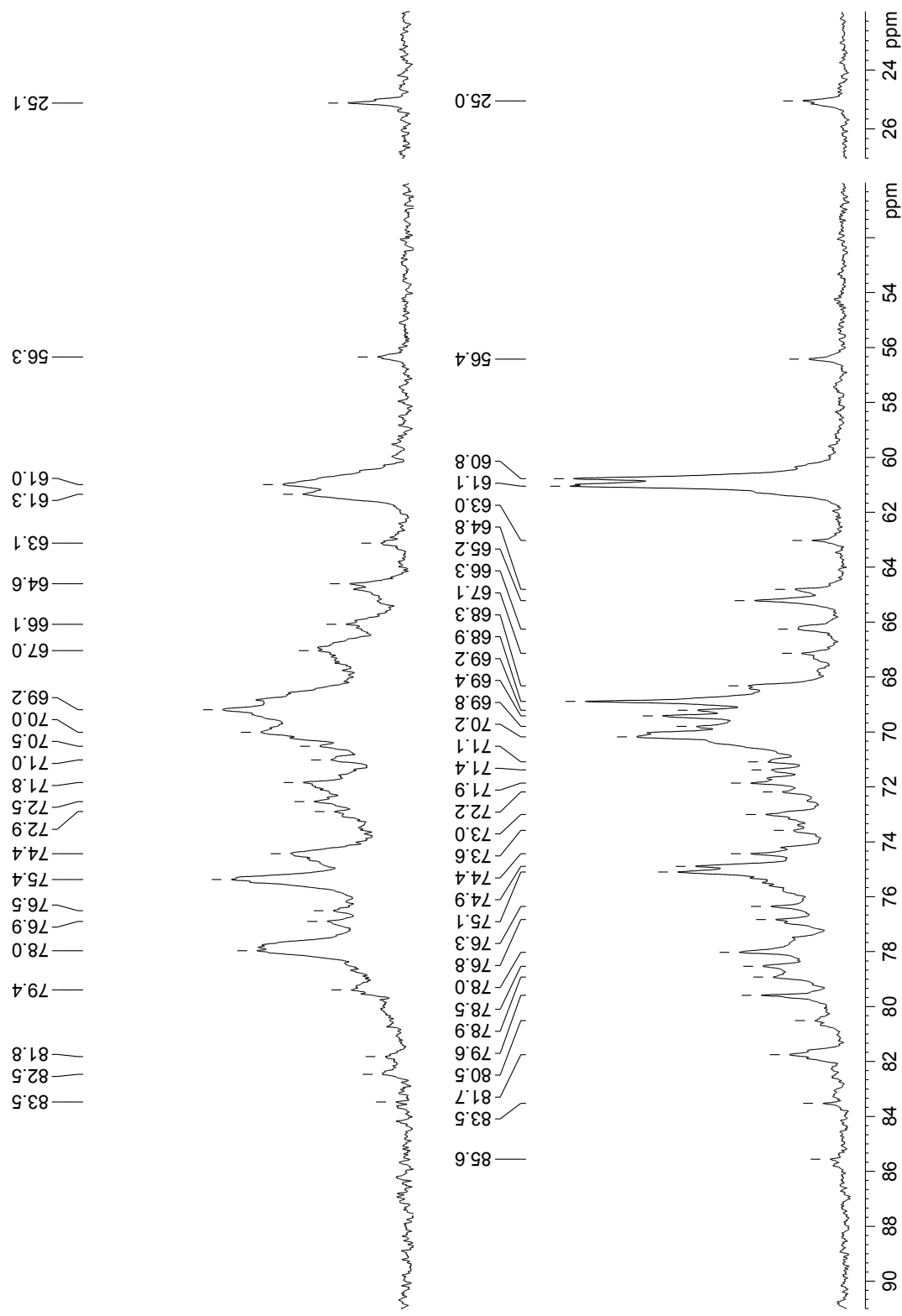


FIGURA 51 - ESPECTROS DE RMN DE  $^{13}\text{C}$  DAS FRAÇÕES NATIVA DSI-3 (ACIMA) E DESSULFATADA DSI-3D (ABAIXO): REGIÃO DE ANEL Solvente:  $\text{D}_2\text{O}$  ( $70^\circ\text{C}$ ); acetona como padrão interno (30,2 ppm)

Os experimentos homonuclear de correlação  $^1\text{H}/^1\text{H}$  (COSY) e heteronuclear de  $^1\text{H}/^{13}\text{C}$  (HSQC) da fração DSi-3D confirmam o assinalamento dos C-2 não substituídos em 69,4 ppm. O hidrogênio H-1 em 4,57 ppm das unidades 3,6-anidro- $\alpha$ -L-galactose indicam no experimento de COSY o H-2 em 3,66 ppm, este por sua vez correlaciona com o C-2 em 69,4 ppm (HSQC). Não foi possível a confirmação dos C-2 sulfatados na fração nativa DSi-3 por experimentos bidimensionais, mas sugere-se a presença destes pelo sinal intenso e alargado em 78,0 ppm, o qual é significativamente diminuído na fração dessulfatada DSi-3D.

Há diferentes sinais anoméricos correspondentes a unidades de  $\beta$ -D-galactose presentes nos espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  da galactana despolimerizada DSi-3 (104,3; 102,9; 102,1 e 100,8 ppm) e dessulfatada DSi-3D (104,3; 104,0; 103,2; 102,5; 101,9 e 100,4 ppm) (Tabela 20).

Os espectros destas galactanas ainda apresentam sinais em 25,1 e 175,3 ppm correspondentes ao grupo metil e carboxil de acetal de ácido pirúvico substituintes nos carbonos C-4 e C-6 (GAREGG et al., 1979).

A região do anel dos espectros de DSi-3 e DSi-3D também apresenta sinais invertidos em RMN de  $^{13}\text{C}$ -DEPT135. Os sinais DEPT invertidos em 64,6/64,8; 61,0/60,8 e 61,3/61,0 são correspondentes aos C-6 de  $\beta$ -D-galactose piruvatada (C-5 em 66,1/66,3 ppm),  $\beta$ -D-galactose e  $\alpha$ -D-galactose, respectivamente. A presença de unidades precursoras de 3,6-anidrogalactose e/ou  $\beta$ -D-galactose 6-sulfato é confirmada pelo sinal largo de alta intensidade em 67,0 ppm, o qual é fortemente diminuído na fração dessulfatada DSi-3 (67,1 ppm) (DEPT invertidos).

As galactanas DSi-3 e DSi-3D também apresentam unidades de 3,6-anidrogalactitol, que puderam ser assinaladas com auxílio de experimentos de HSQC (Tabela 19). O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da fração nativa DSi-3 (Figura 51) não indica o sinal em 86,6 ppm, no entanto o experimento de HSQC mostra a correlação 86,6/4,30 referente ao C-4 de unidades de 3,6-anidrogalactitol ligadas a  $\beta$ -D-galactose 2-sulfato.



TABELA 19 - CORRELAÇÕES PRESENTES NOS ESPECTROS DE HSQC DAS FRAÇÕES NATIVA DSI-3 E DESSULFATADA DSI-3D ATRIBUÍDAS ÀS UNIDADES DE 3,6-ANIDRO- $\alpha$ -L-GALACTITOL (LAGOH) LIGADAS A DIFERENTES UNIDADES A

	DSi-3			DSi-3D		
	C	H	Unidade A $\rightarrow$ LAGOH	C	H	Unidade A $\rightarrow$ LAGOH
1	63,1	3,67	G2S	63,0	3,66	G
		3,72	GP e GP2S		3,71	GP
2	71,0	3,95	GP	71,1	3,93	GP
3	83,5	3,93	G2S	83,5	3,92	G
4	86,6	4,30	G2S	85,6	4,34	G
5	75,4	4,44	G2S e GP2S	75,1	4,41	G e GP
6a	72,9	4,00	G2S	73,0	4,00	GP
6b		3,86			3,87	

Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  das galactanas despolimerizadas DSI-3 e DSI-3D estão representados nas Figuras 52 e 53.

O espectro de DSI-3 apresenta na região  $\alpha$ -anomérica (Figura 52) sinais principais em 5,40, 5,31 e 5,18 ppm além de outros sinais de menor intensidade (5,49, 5,25 e 5,03 ppm). No espectro de DSI-3D esta região é modificada pelo aumento da intensidade dos sinais em 5,30 e 5,16 ppm.

Substituições por acetal de ácido pirúvico presentes nas galactanas DSI-3 e DSI-3D são comprovadas pelos sinais em 1,49 e 1,47 ppm, correspondentes aos hidrogênios do grupo metil deste substituinte, os quais acoplam com os carbonos em 25,1 e 25,0 ppm (CHIOVITTI et al., 1997).

Experimentos de HSQC com as frações nativa DSI-3 e dessulfatada DSI-3D permitiram assinalar diversos hidrogênios presentes nos respectivos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  bem como confirmar a presença das díades esquematizadas na Tabela 20.

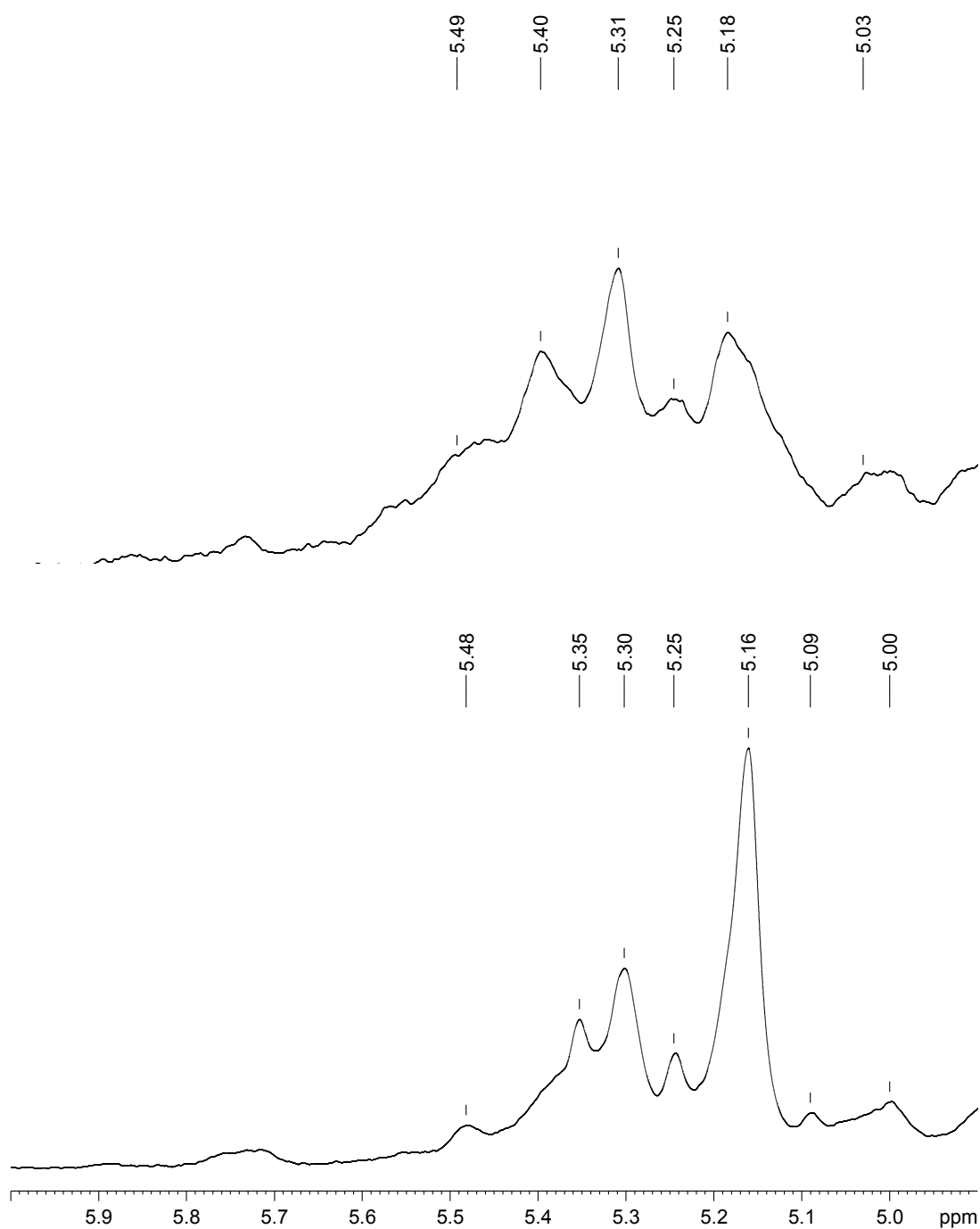


FIGURA 52 - ESPECTROS DE RMN DE  $^1\text{H}$  DAS FRAÇÕES NATIVA DSi-3 (ACIMA) E DESSULFATADA DSi-3D (ABAIXO): REGIÃO  $\alpha$ -ANOMÉRICA  
Solvente:  $\text{D}_2\text{O}$  ( $70^\circ\text{C}$ ); acetona como padrão interno (2,224 ppm)

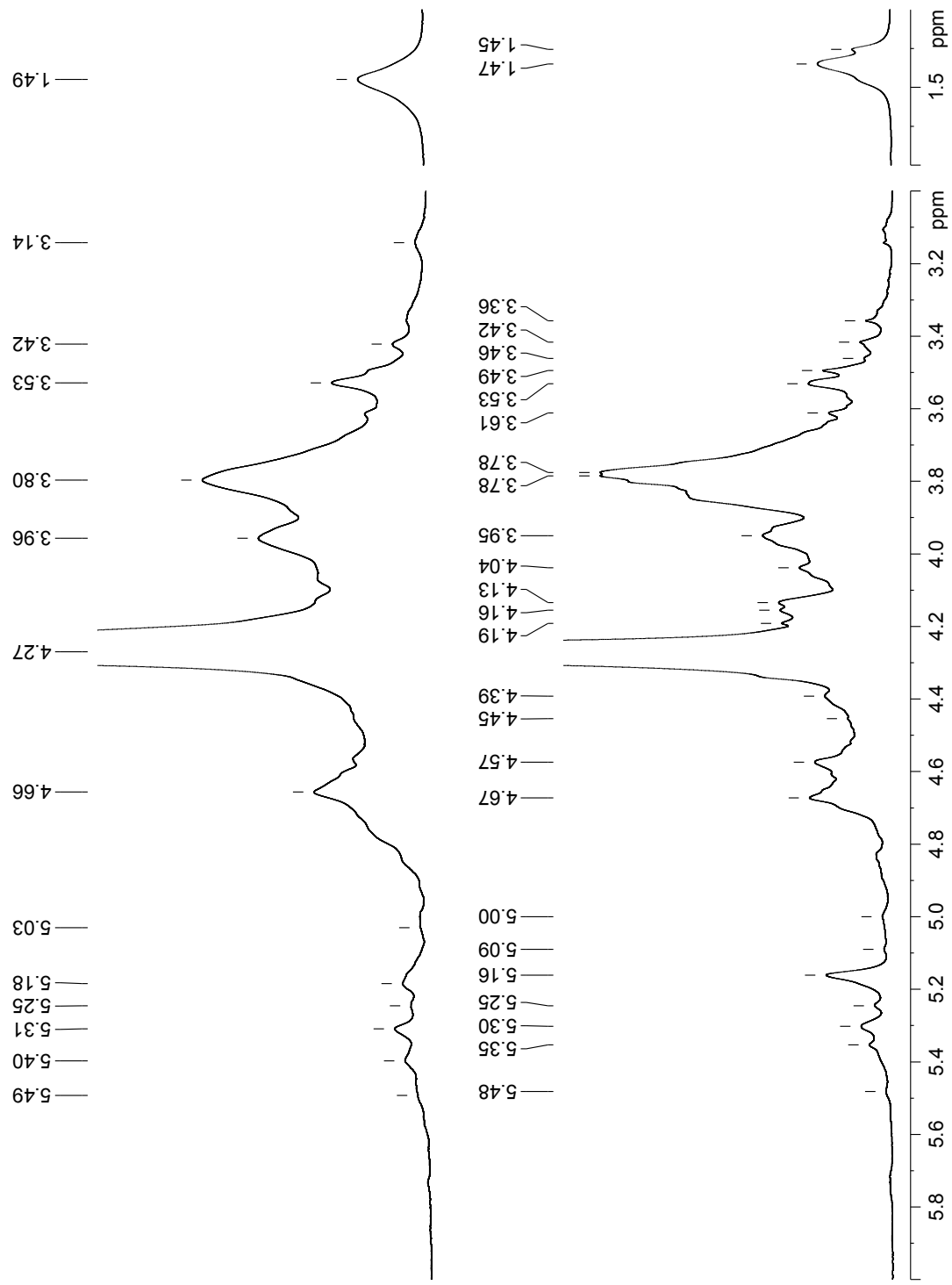


FIGURA 53 - ESPECTROS DE RMN DE <sup>1</sup>H DAS FRAÇÕES NATIVA DSI-3 (ACIMA) E DESSULFATADA DSI-3D (ABAIXO)  
Solvente: D<sub>2</sub>O (70°C); acetona como padrão interno (2,224 ppm)

TABELA 20 - PRINCIPAIS ASSINALAMENTOS DE DÍADES PRESENTES NAS GALACTANAS NATIVA DSI-3 E DESSULFATADA DSI-3D

Díades <sup>a</sup>	DSi-3				DSi-3D								
	C-1	H-1	C-1	H-1	Díades	C-1	H-1	C-1	H-1				
G(P) <sup>b</sup>	104,3	4,66	→	96,1	5,40	G(P)	→	D	104,3	4,67	→	95,7	5,16
									104,0				
G	104,3	4,66	→	96,5	5,31								
G2S(P)	102,1	4,66	→	98,2	5,18								
G2S(P)	100,8	4,76	→	98,2	5,18	GP	→	LA	101,9	4,57	→	97,8	5,25
G2S	100,8	4,76	→	96,5	5,31	G	→	LA	101,9	4,57	→	97,8	5,16
G	102,9	4,66	→	100,8	5,31	G	→	L	103,2	4,45	→	100,4	5,30
DA2S				93,2	5,49	G	→	DA	102,5	4,51	→	94,7	5,30
D2,6S													

<sup>a</sup> Nomenclatura de Knutsen et al., 1994; <sup>b</sup> P = substituinte acetal de ácido pirúvico em C-4 e C-6; S = sulfato substituinte na posição indicada; M = O-metil substituinte na posição indicada.

#### 6.6.4 ANÁLISES ESPECTROSCÓPICAS DE DSI-4

No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da fração DSI-4 (Figura 54) destaca-se na região anomérica o sinal em 104,3 ppm atribuído ao C-1 das unidades de  $\beta$ -D-galactose (substituídas em C-4 e/ou C-6, por grupos sulfato ou acetal de ácido pirúvico) ligadas a  $\alpha$ -D-galactose, as quais podem estar sulfatadas em C-6 (95,6 ppm) e/ou disulfatadas em C-2 e C-6 (93,4 ppm). Os sinais em 102,8 e 102,5 ppm correspondem a unidades de  $\beta$ -D-galactose galactose (substituídas em C-4 e/ou C-6, por grupos sulfato ou acetal de ácido pirúvico) ligadas a unidades de 3,6-anidro- $\alpha$ -D-galactose (95,6 ppm) ou 3,6-anidro- $\alpha$ -D-galactose 2-sulfato (93,4 ppm) (FALSHAW e FURNEAUX, 1995; FALSHAW et al., 2005; USOV et al., 1980).

Deslocamentos químicos na região de 93,0 ppm não são comuns na literatura. De acordo com Chopin et al. (1994) e Van de Velde et al. (2004), deslocamentos químicos em 93,4 e 93,7 ppm podem ser atribuídos a unidades de  $\alpha$ -D-galactose sulfatadas. No presente trabalho, a atribuição do sinal centrado em 93,4 ppm a unidades de  $\alpha$ -D-galactose e/ou 3,6-anidro- $\alpha$ -D-galactose sulfatadas foi corroborada pelos experimentos bidimensionais de HSQC, como discutido adiante.

O sinal em 25,0 ppm confirma a presença de unidades A piruvatadas por ser atribuído ao carbono metílico em posição equatorial de unidades de  $\beta$ -D-galactose 4,6-O-(1'-carboxietilideno) substituídas ou não em C-2 (GAREGG et al., 1979).

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da fração DSI-4 ainda apresenta um sinal em 100,8 ppm de baixa intensidade, referente pelo menos em parte a unidades da série L-. Portanto é possível a presença da díade G(P) (103,2 ppm)  $\rightarrow$  L(6S) (100,8 ppm) em menor quantidade, de acordo com os dados de enantiomericidade (Tabela 13) (LAHAYE et al., 1985). Ainda é possível apontar a presença da díade G2S (100,8 ppm)  $\rightarrow$  DA2S (95,6 ppm), posta a presença de C-2 sulfatado evidenciada pelo sinal alargado em 77,7 ppm (FALSHAW e FURNEAUX, 1994).

Na região do anel do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de DSI-4 alguns sinais se apresentaram invertidos em RMN de  $^{13}\text{C}$ -DEPT135 como 61,0 e 61,3 ppm que correspondem ao C-6 livre das unidades de  $\beta$ -galactose e  $\alpha$ -galactose, respectivamente (USOV e SHASHKOV, 1985; CHIOVITTI et al., 1997). Os deslocamentos em 67,1 e 67,4 ppm podem ser atribuídos a C-6 sulfatados e em 64,5 ppm ao C-6 de unidades de  $\beta$ -D-galactose substituídas por acetal de ácido pirúvico (TAKANO et al., 1995).

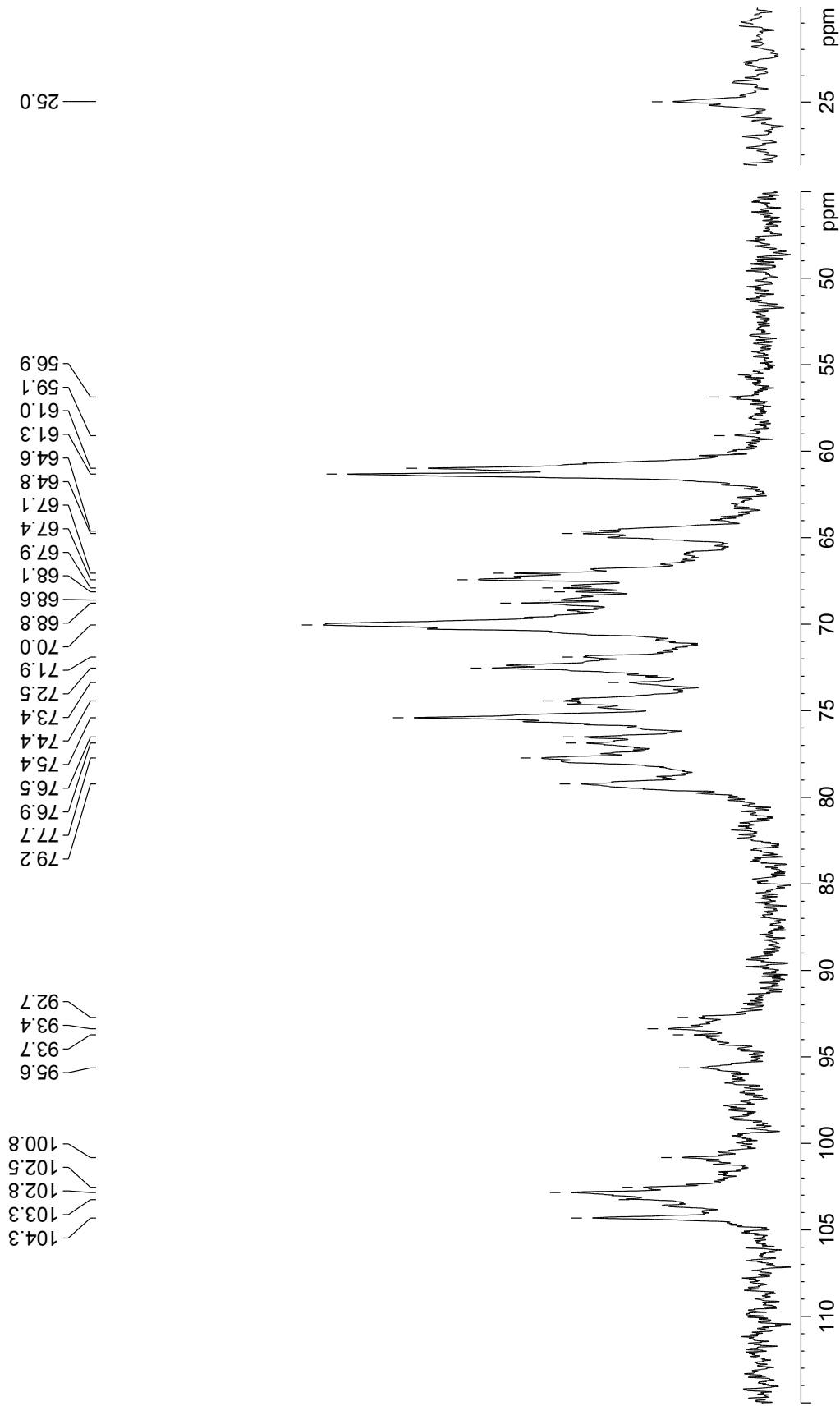


FIGURA 54 - ESPECTRO DE RMN DE <sup>13</sup>C DA FRAÇÃO DSi-4  
 Solvente: D<sub>2</sub>O (70°C); acetona como padrão interno (30,2 ppm)

É importante ressaltar a intensidade dos sinais em 67,1 e 67,4 ppm e 77,7 ppm, referentes a C-6 e C-2 sulfatados, respectivamente, de forma que o alto teor de sulfato desta fração (31,7%) pode ser derivado, pelo menos em parte, destas substituições. Também se pode atribuir o sinal de 72,5 ppm ao C-4 de unidades de  $\beta$ -D-galactose 4-sulfato (CÁCERES et al., 2000; TAKANO et al., 1995).

Na região  $\alpha$ -anomérica do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 55) de DSI-4 destacam-se os sinais em 5,50; 5,46; 5,31 e 5,18 ppm, sendo que os dois primeiros, mais intensos, referem-se a hidrogênios menos blindados, que estão presentes em ambientes químicos possivelmente sulfatados.

O experimento de correlação heteronuclear  $^{13}\text{C}/^1\text{H}$  (HSQC) mostra a correlação 93,4/5,50 (Figura 56). Segundo Ciancia et al. (1993) o hidrogênio anomérico de unidades de  $\alpha$ -D-galactose 2,6-disulfato aparecem em 5,50 ppm, assim o sinal em 93,4 ppm foi atribuído a esta unidade disulfatada.

Outra correlação em 93,7/5,46 ppm permite atribuir o sinal em 93,7 ppm a unidades de 3,6-anidro- $\alpha$ -D-galactose 2-sulfato, posto que o sinal em 92,7 ppm que também correlaciona com 5,46 ppm é referente a unidades de 3,6-anidro- $\alpha$ -D-galactose 2-sulfato, as quais podem estar ligadas a  $\beta$ -D-galactose 4-sulfato (USOV e SHASHKOV, 1985).

A correlação 95,6/5,18 ppm permite atribuir o sinal em 5,18 ppm a H-1 de unidades de  $\alpha$ -D-galactose e 3,6-anidro- $\alpha$ -D-galactose, a qual pode estar ligada a  $\beta$ -D-galactose 4-sulfato (C-1 em 102,5 ppm) ou ainda, segundo Falshaw et al. (2003), a  $\beta$ -D-galactose-4,6-O-(1'-carboxietilideno).

O sinal em 5,31 pode ser referente aos H-1 de unidades de  $\alpha$ -D-galactose 6-sulfato (C-1 em 95,6 ppm) ou ainda a de unidades de 3,6-anidro- $\alpha$ -D-galactose 2-sulfato (C-1 em 95,6 ppm) ligadas a  $\beta$ -D-galactose-4,6-O-(1'-carboxietilideno) 2-sulfato (C-1 em 100,8 ppm), enquanto o sinal em 5,18 ppm é atribuído a unidades de  $\alpha$ -D-galactose e 3,6-anidro- $\alpha$ -D-galactose (C-1 em 95,6 ppm) (CIANCIA et al., 1993; ZIBETTI et al., 2009).

Na região  $\beta$ -anomérica o sinal em 4,66 ppm é referente ao H-1 de unidades de  $\beta$ -D-galactose, as quais compõem a díade G (104,3 ppm)  $\rightarrow$  D (95,6 ppm), enquanto o sinal em 4,57 ppm indica hidrogênios de unidades de  $\beta$ -D-galactose (C-1 em 102,5 ppm) ligadas a unidades de  $\alpha$ -D-3,6-anidrogalactose (C-1 em 96,5 ppm) (ZIBETTI et al., 2009).

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  destaca o sinal centrado em 3,79 ppm que pode ser atribuído aos H-6 não substituídos de  $\beta$ -D-galactose (KOLENDER e MATULEWICZ, 2004). Já o sinal em 3,41 ppm alargado e de baixa intensidade pode ser atribuído, pelo menos em parte, aos hidrogênios de grupos metil substituintes em C-6 de unidades de galactose, posto que o teor de 6-O-metilgalactose nesta fração é baixo (1,7 mol%) (NELSON et al, 1994; GROS et al., 1971).

É possível assinalar também o sinal em 1,49 ppm referente aos hidrogênios do grupo metil de acetal de ácido pirúvico. O sinal em 1,45 ppm não foi assinalado (CHIOVITTI et al., 1997; ZIBETTI et al., 2009).

Os H-1 pertencentes às unidades de  $\beta$ -D-galactose, piruvatadas ou não, são indicados pelo sinal em 4,66 ppm, posta a correlação 104,3/4,66 ppm (FALSHAW e FURNEAUX, 1995; FALSHAW et al., 2005; USOV et al., 1980; ZIBETTI et al., 2009).

Ainda no espectro de HSQC de DSi-4 (inserto da Figura 56) pode-se destacar a correlação 61,0/3,79 ppm referente aos C-6 livres de unidades de  $\beta$ -D-galactose (KOLENDER e MATULEWICZ, 2004). Enquanto a correlação 67,4/4,24 também confirma a presença de unidades de  $\beta$ -D-galactose 6-sulfato (USOV e ELASHVILI, 1997; TAKANO et al., 1995).



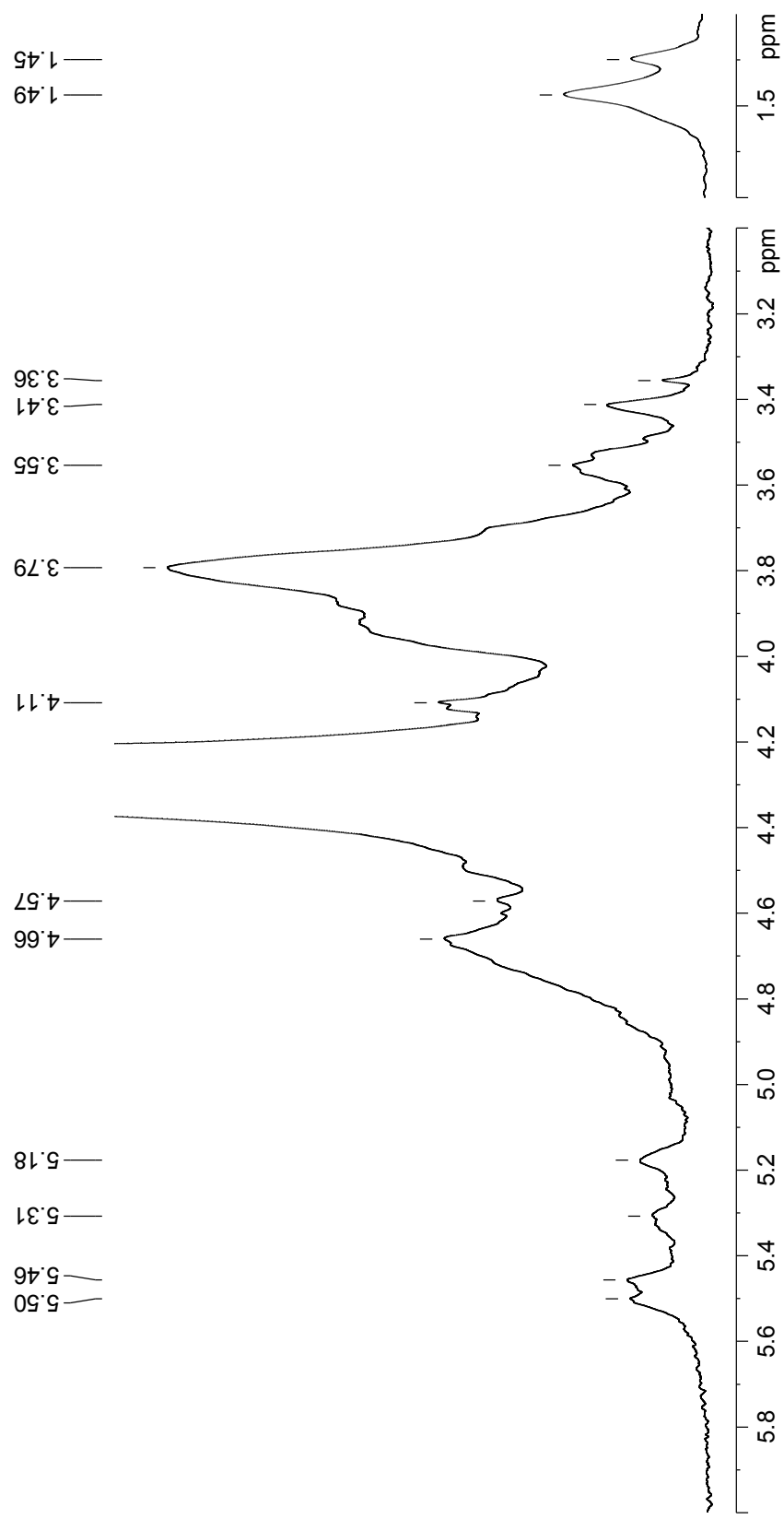


FIGURA 55 - ESPECTRO DE RMN DE  $^1\text{H}$  DA FRAÇÃO DSI-4  
Solvente:  $\text{D}_2\text{O}$  ( $70^\circ\text{C}$ ); acetona como padrão interno (2,224 ppm)

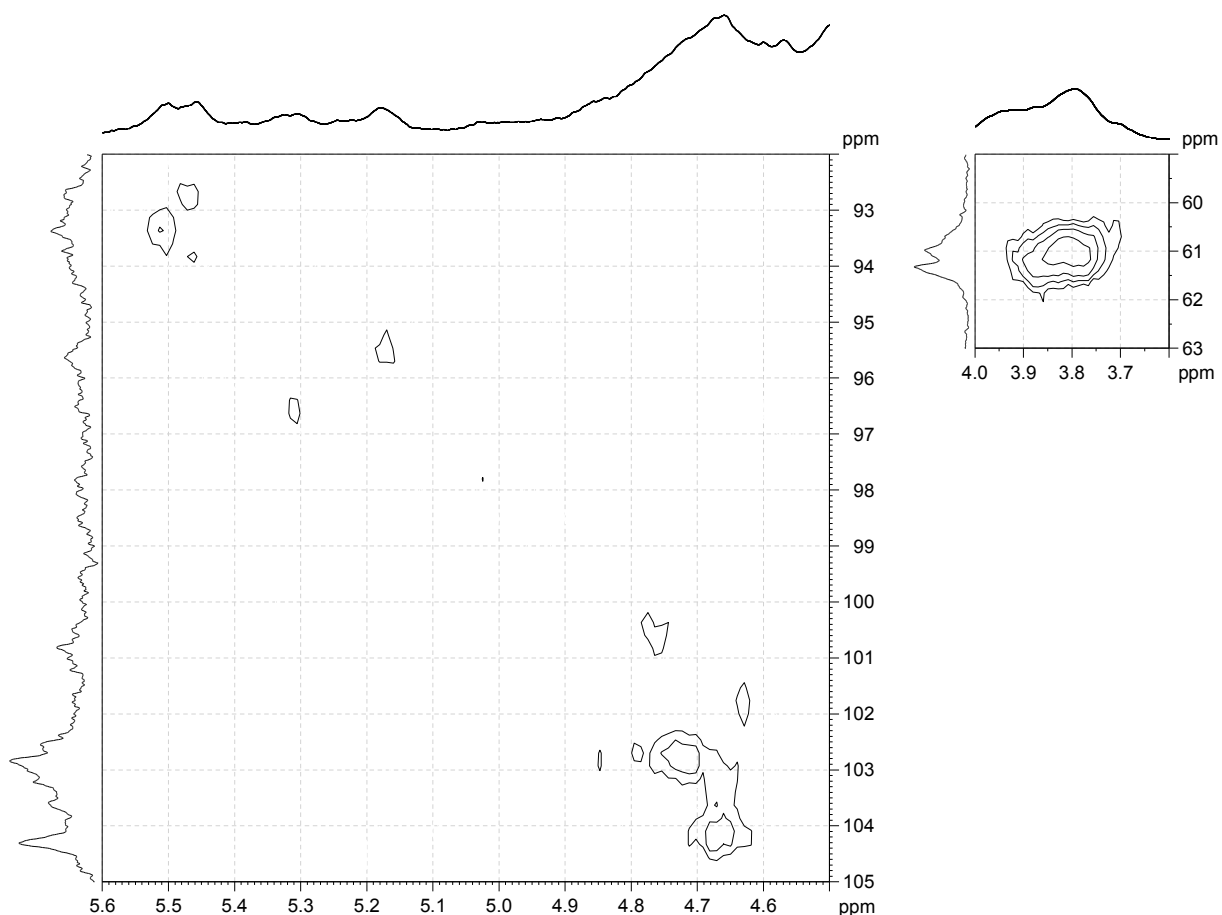


FIGURA 56 - ESPECTRO DE HSQC DA REGIÃO ANOMÉRICA DA FRAÇÃO DSi-4  
 Solvente:  $\text{D}_2\text{O}$  ( $70^\circ\text{C}$ ); calibração por metil de acetal de ácido pirúvico (25,0/1,49 ppm)  
 Inseto: correlação 61,0/3,79 referente aos C-6 livres de unidades de  $\beta$ -D-galactose

#### 6.6.5 ANÁLISES ESPECTROSCÓPICAS DE DSi-5

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da fração DSi-5 (Figura 56) destaca os sinais em 104,3 e 102,8 ppm que podem ser atribuídos ao C-1 das unidades de  $\beta$ -D-galactose, (substituídas em C-4 e/ou C-6, por grupos sulfato ou acetal de ácido pirúvico) (FALSHAW et al., 2003; CIANCIA et al., 1993; USOV e SHASHKOV, 1985).

Ressalta-se que o espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da fração DSi-5 mostra-se com os sinais 104,3 e 102,8 mais definidos quando comparado ao da fração DSi-4, o que indica um espectro menos complexo com relação às outras galactanas despolimerizadas. No entanto o grupo de sinais centrado em 93,4 ppm mostra picos alargados e variados, os quais são atribuídos a unidades de  $\alpha$ -D-galactose e/ou 3,6-

anidro- $\alpha$ -D-galactose sulfatadas (FALSHAW et al., 1996; LIAO et al., 1993; USOV e SHASHKOV, 1985; CIANCIA et al., 1993; CÁCERES et al., 2000).

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da fração DSi-5 não apresenta sinal 100,8 ppm, que seria correspondente a  $\beta$ -D-galactose 2-sulfato e/ou  $\alpha$ -L-galactose. A presença de acetal de ácido pirúvico é indicado pelo sinal em 25,0 ppm referente ao carbono metílico deste substituinte (GAREGG et al., 1979).

Na região do anel alguns sinais são invertidos em RMN de  $^{13}\text{C}$ -DEPT135. Os sinais invertidos em 61,0 e 61,3 ppm correspondem ao C-6 livre das unidades de  $\beta$ - e  $\alpha$ -galactose, respectivamente (CHIOVITTI et al., 1997). É possível atribuir a C-6 sulfatados os sinais em 67,0 e 67,4 ppm, enquanto o C-6 de unidades piruvatadas pode ser indicado pelo sinal em 64,5 ppm. No entanto este sinal em 64,5 ppm também corresponde a outros tipos de carbono, posto que sua inversão não foi total.

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da fração DSi-5 também apresenta deslocamentos químicos na região de 93,0 ppm. Sendo que o espectro de HSQC de DSi-5 (Figura 59) mostra a correlação 93,4/5,51 ppm assim como em DSi-4, o que indica unidades de  $\alpha$ -D-galactose 2,6-disulfato (CIANCIA et al., 1993).

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da fração DSi-5 (Figura 58) apresenta três sinais  $\alpha$ -anoméricos em 5,51; 5,47 e 5,18 ppm que, com auxílio do experimento de HSQC (Figura 59), podem ser atribuídos aos H-1 de unidades de  $\alpha$ -D-galactose 2,6-disulfato, 3,6-anidro- $\alpha$ -D-galactose 2-sulfato e as unidades de 3,6-anidro- $\alpha$ -D-galactose ou  $\alpha$ -D-galactose (CIANCIA et al., 1993; USOV e SHASHKOV, 1985; FALSHAW et al., 2003; KNUTSEN et al., 2001).

No entanto ressalta-se que a correlação 95,5/5,18 indicativa de H-1 de unidades 3,6-anidro- $\alpha$ -D-galactose e/ou  $\alpha$ -D-galactose é muito próxima do ruído, posta a menor quantidade da amostra DSi-5 utilizada no experimento de HSQC, devido ao pequeno rendimento desta fração em relação aos outros despolimerizados obtidos após cromatografia em DEAE-Sephacel.

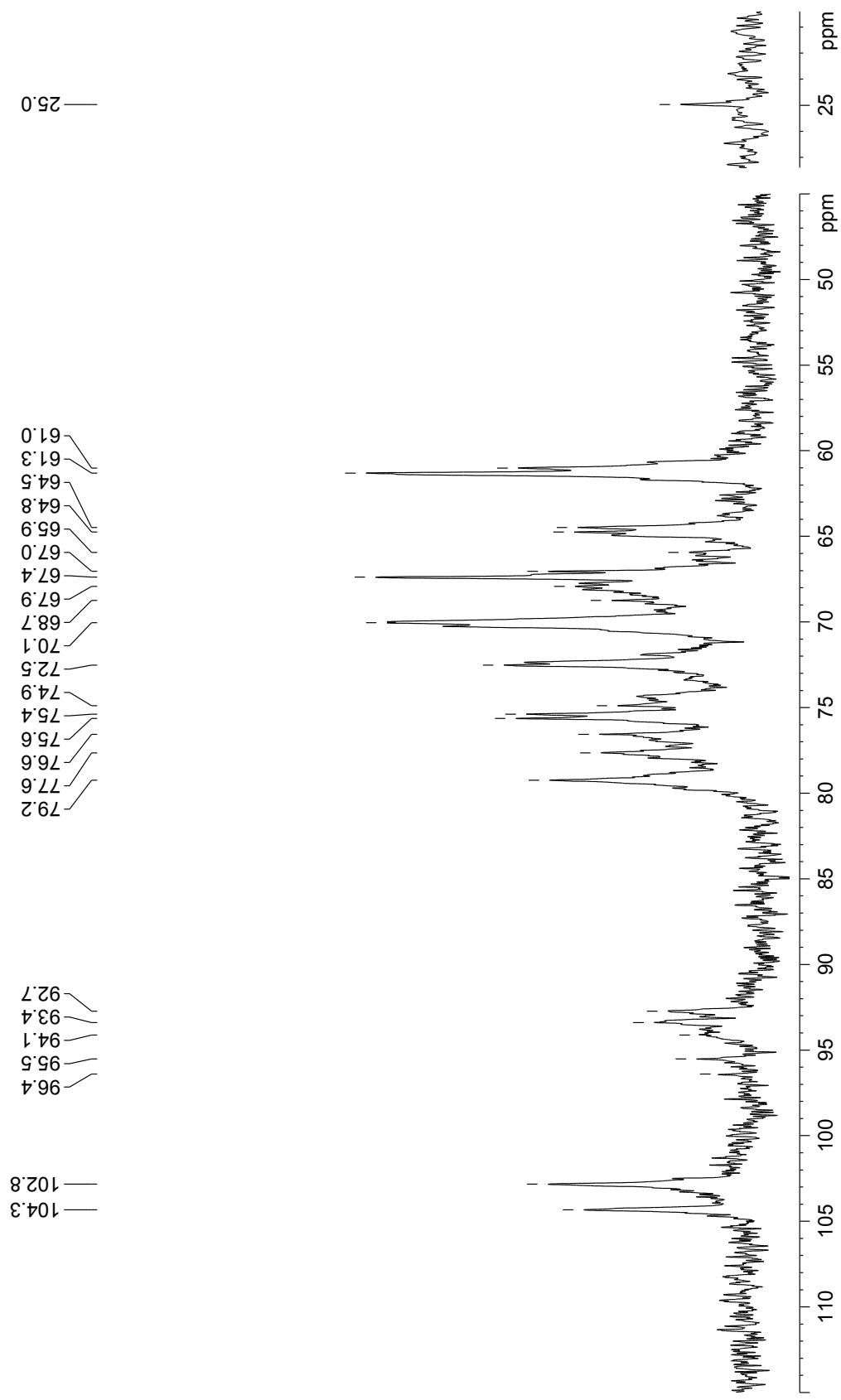


FIGURA 57 - ESPECTRO DE RMN DE  $^{13}\text{C}$  DA FRAÇÃO DSI-5  
Solvente:  $\text{D}_2\text{O}$  ( $70^\circ\text{C}$ ); acetona como padrão interno (30,2 ppm)

No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de DSi-5, além do sinal em 1,49 ppm, referente a unidades piruvatadas, destacam-se ainda o sinal em 3,80 que pode ser atribuído aos H-6 não substituídos de  $\beta$ -D-galactose e o sinal de baixa intensidade em 3,42 ppm é atribuído, em parte, aos hidrogênios de grupos metil substituintes em C-6 de unidades de  $\beta$ -D-galactose, posto que a porcentagem de 6-O-metilgalactose é baixa (1,2%) (CHIOVITTI et al., 1997; KOLENDER e MATULEWICZ, 2004; NELSON et al., 1994; GROS et al., 1971).

Do experimento de HSQC de DSi-5 pode-se ainda mencionar as correlações 102,8/4,70 que poderia ser referente a unidades de  $\beta$ -D-galactose 4-sulfato e em 104,3/4,66 e em 104,3/4,62 atribuídas a unidades de  $\beta$ -D-galactose, piruvatadas ou não, ligadas a unidades de  $\alpha$ -D-galactose (KNUTSEN e GRASDALEN, 1992; FALSHAW et al., 2003; CHIOVITTI et al., 1997).

O espectro de HSQC de DSi-5 (inserto da Figura 59) destaca a correlação 61,3/3,80 referente aos C-6 livres de unidades de  $\alpha$ -D-galactose (KOLENDER e MATULEWICZ, 2004). As unidades de  $\beta$ -D-galactose 6-sulfato são indicadas pela correlação 102,8/4,70 e confirmadas pela correlação 67,4/4,24, que corresponde aos C-6 sulfatados destas unidades (USOV e ELASHVILI, 1997; TAKANO et al., 1995).

Os dados de RMN mono- e bidimensional permitem sugerir a presença de algumas díades na fração DSi-5 como:

G (104,3/4,66 ppm)  $\rightarrow$  D (96,4 ppm);

GP (104,3/4,62 ppm)  $\rightarrow$  D (95,5/5,18 ppm);

G(6S)(4S) (102,8/4,70 ppm)  $\rightarrow$  DA (95,5/5,18 ppm);

G(6S)(4S) (102,8/4,70 ppm)  $\rightarrow$  D2S (94,1/5,47 ppm);

G(6S) (102,8/4,70 ppm)  $\rightarrow$  D2,6S (92,7/5,47 ppm) e

G(4S) (102,8/4,70 ppm)  $\rightarrow$  DA2S (93,4/5,51 ppm) (FALSHAW et al., 2003; CIANCIA et al., 1993; USOV e SHASHKOV, 1985; FALSHAW et al., 1996; LIAO et al., 1993; CÁCERES et al., 2000).

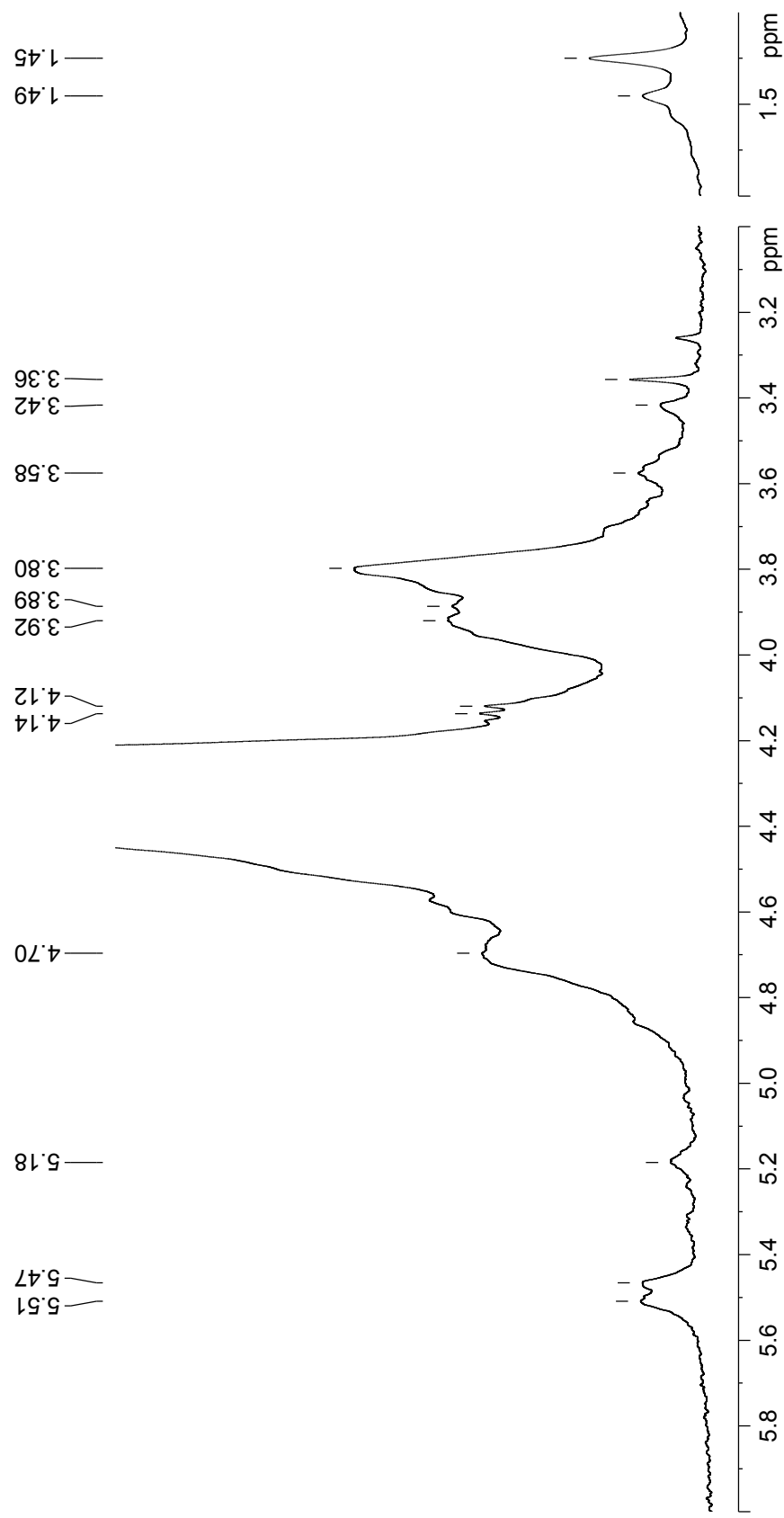


FIGURA 58 - ESPECTRO DE RMN DE  $^1\text{H}$  DA FRAÇÃO DSI-5  
Solvente:  $\text{D}_2\text{O}$  ( $70^\circ\text{C}$ ); acetona como padrão interno (2,224 ppm)

As considerações estruturais obtidas com os experimentos de RMN das frações DSi-4 e DSi-5 em conjunto com as análises de enantiomeridade deixam clara a característica predominante de carragenanas presente nestes produtos de hidrólise redutiva parcial das galactanas sulfatadas extraídas da alga *C. seminervis*.

O baixo rendimento destas em relação as galactanas despolimerizadas DSi-1 DSi-2e e DSi-3 esta de acordo com os dados estruturais obtidos para as galactanas já estudados onde predomina o caráter de agarana (ZIBETTI et al., 2009).

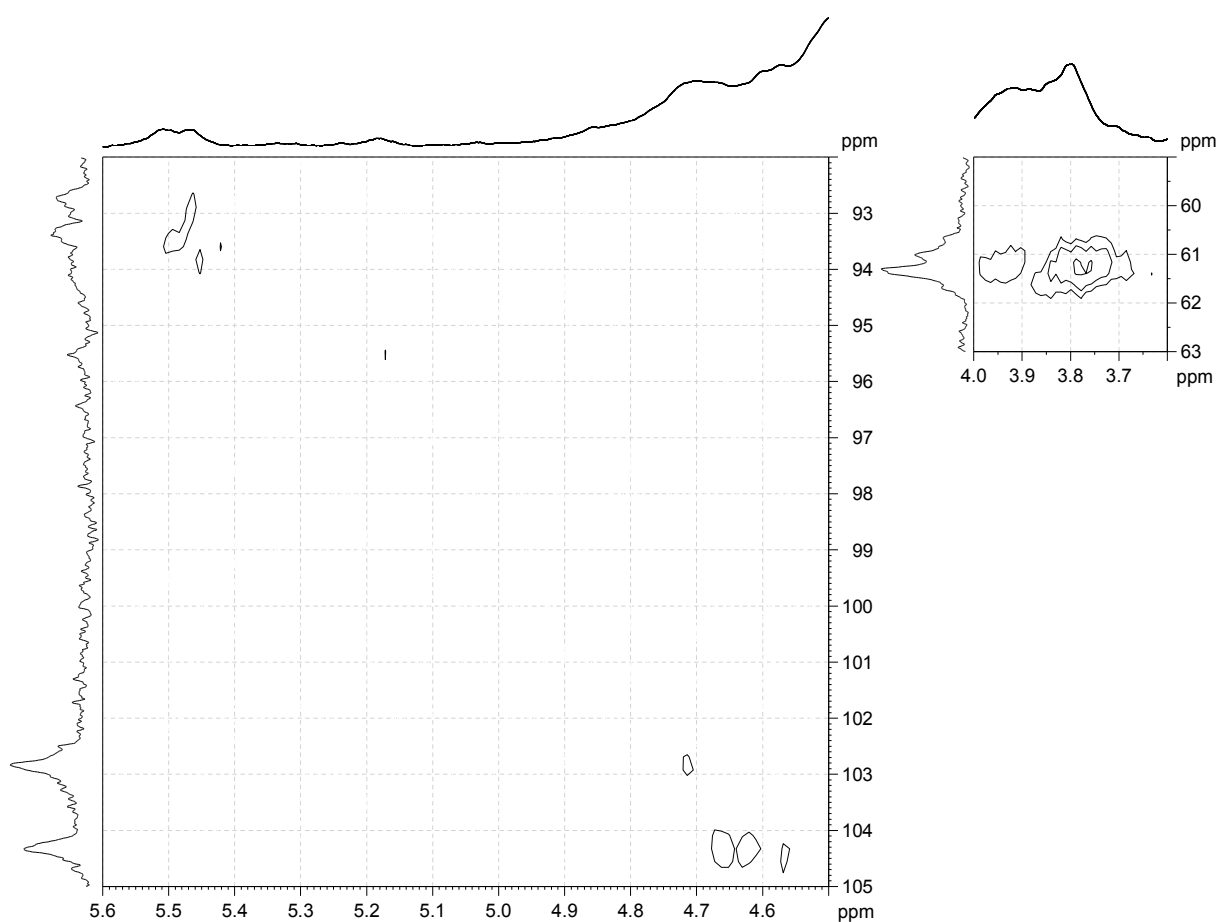


FIGURA 59 - ESPECTRO DE HSQC DA REGIÃO ANOMÉRICA DA FRAÇÃO DSi-5  
Solvente: D<sub>2</sub>O (70°C); calibração por metil de acetal de ácido pirúvico (25,0/1,49 ppm)  
Inserto: correlação 61,3/3,80 referente aos C-6 livres de unidades de  $\alpha$ -D-galactose

## 6.7 ANÁLISE DE METILAÇÃO DAS GALACTANAS DESPOLIMERIZADAS NATIVAS DSI-1 E DSI-2e E DESSULFATADAS DSI-1D E DSI-2eD

As análises de metilação das frações homogêneas nativas DSI-1 e DSI-2e e dessulfatadas DSI-1D e DSI-2eD foram conduzidas através do método de Ciucanu e Kerek (1984) usando  $\text{ICH}_3$ , após tratamento prévio das galactanas em solução de trietilamina (1 g%) (STEVENSON e FURNEAUX, 1991). As galactanas na forma de sal de trietilamônio, portanto solúveis no meio reacional (DMSO), foram submetidas a três etapas de metilação. Os derivados foram hidrolisados (JOL et al., 1999) e analisados na forma de acetatos de alditóis parcialmente metilados por cromatografia líquido-gasosa acoplada a espectrometria de massa (GLC-EM) em coluna de sílica fundida DB225.

O derivado metilado 4,6- $\text{Me}_2$ -galactose co-elui com 3,6-anidrogactose na coluna DB225, portanto a proporção destas unidades foi feita com auxílio dos dados de composição monossacarídica. Durante o processo de metilação as unidades de 3,6-anidrogactose não substituídas em C-2 são metiladas nesta posição produzindo o derivado 2-O-metil-3,6-anidrogactose (2-AG, Tabela 21), portanto o teor de 3,6-anidrogactose naturalmente metilada presente na composição monossacarídica deve ser descontado do total do derivado 2-O-metil-3,6-anidrogactose presente entre os produtos de metilação. A utilização do agente metilante  $\text{ICD}_3$  permitiria marcar as unidades naturalmente metiladas. Os resultados da análise de metilação dos derivados parcialmente metilados obtidos das frações nativas e dessulfatadas são dispostos na Tabela 21.

A análise da metilação de DSI-1 apresenta como principais derivados os correspondentes às unidades A ( $\beta$ -D-galactopiranosose 4-ligada), 2,4,6- $\text{Me}_3$ -galactose e 4,6- $\text{Me}_2$ -galactose (14,0 e 12,0 mol%, respectivamente). Estes são atribuídos a unidades A não sulfatadas e sulfatadas em C-2, respectivamente. A presença de  $\beta$ -D-galactose 2-sulfato está de acordo com as análises de RMN de  $^{13}\text{C}$  (sinais em 100,7 e 77,9 ppm relativos ao C-1 e C-2 de unidades de  $\beta$ -D-galactose 2-sulfato). A presença dos derivados galactose e 2-Me-galactose foi atribuída as unidades A substituídas por acetal de ácido pirúvico, sulfatadas ou não em C-2, respectivamente.



TABELA 21 - ANÁLISE DE METILAÇÃO DAS GALACTANAS DESPOLIMERIZADAS DSI-1, DSI-1D, DSI-2e E DSI-2eD

Derivado <sup>a</sup>	Unidade correspondente	DSi-1	DSi-1D	DSi-2e	DSi-2eD
<i>Unidades 3-ligadas</i>					
2,4,6-Gal	Gal 3-ligada	14,0	24,0	10,5	31,3
2,4-Gal	Gal 6-substituída	5,0	4,0	7,5	3,1
4,6-Gal	Gal 2-substituída	12,0	2,4	18,5	2,7
2-Gal	Gal 4,6-disubstituída	1,0	3,0	1,5	4,6
Gal	Gal 2,4,6-trisubstituída	2,0	tr.	3,0	-
<i>Unidades 4-ligadas</i>					
2,3,6-Gal	Gal 4-ligada	15,0	20,5	9,5	28,0
2,3-Gal	Gal 6-substituída	5,0	2,0	9,4	-
3,6-Gal	Gal 2-substituída	1,5	-	3,8	-
2-AG	AG + 2-AG	5,0	4,8	3,7	13,6
AG	AG 2-substituída	13,5	12,4	11,0	3,0
<i>Unidades 3/4-ligadas<sup>c</sup></i>					
2,6-Gal	Gal 3,4-ligada/substituída	12,0	11,0	6,5	6,8
6-Gal	Gal 3,4-ligada/substituída 2-substituída	1,0	-	6,0 <sup>d</sup>	-
3/4-Gal	Gal 2,6-disubstituída	2,0	2,0	1,7	-
<i>Terminais não redutores</i>					
2,3,4,6-Gal	Gal 1-ligada	8,0	11,0	4,5	4,5
2,3,4-Xil	Xil 1-ligada	3,0	2,9	2,9	2,4

<sup>a</sup> Mol % de monossacarídeo contendo grupos O-metil nas posições indicadas; <sup>b</sup> S, R e M correspondem a substituição por sulfato, radical glicosil (galactose ou xilose) e O-metil, nas posições indicadas; <sup>c</sup> / significa e/ou; <sup>d</sup> correspondente a unidades 4-ligadas 3-sulfatadas.

A análise dos derivados metilados da fração dessulfatada DSi-1D comprova os resultados obtidos na metilação da fração nativa, posto o aumento dos derivados 2,4,6-Me<sub>3</sub>-galactose e 2-Me-galactose concomitantemente com a diminuição do derivado 4,6-Me<sub>2</sub>-galactose e desaparecimento da galactose não metilada.

A galactana despolimerizada DSi-1 é ainda constituída por unidades de  $\alpha$ -galactose não substituída (15 mol%) e menores proporções destas unidades sulfatadas em C-6 (5 mol%) e em C-2 (1,5 mol %). Em relação às unidades anidrogalactosídicas a presença do derivado 2-Me-3,6-anidrogalactose (2-AG) (5 mol%) está de acordo com a porcentagem de 2-O-metil-3,6-anidrogalactose determinada na composição monossacarídica de DSi-1 (2,1 mol%, Tabela 10) e com a presença de unidades não substituídas em C-2 (2,9 mol%).

Destaca-se a presença de 13,5 mol% do derivado 3,6-anidrogalactose (AG). Este pode indicar que a galactana despolimerizada DSi-1 contém unidades de 3,6-anidrogalactose substituídas em C-2 por grupos sulfato e/ou O-glicosil.

Resultados obtidos por Zibetti et al. (2005 e 2009) demonstram que as unidades de 3,6-anidrogalactose sulfatadas em C-2 apresentam o C-1 em 96,0-96,1 quando presentes nos polissacarídeos nativos de *C. seminervis* e *C. crenulata*, ou em 96,7 ppm como na galactana despolimerizada CS de *C. seminervis*. De fato o espectro de RMN de <sup>13</sup>C de DSi-1 apresenta um sinal anomérico em 96,5 ppm que poderia corresponder pelo menos em parte a este tipo de unidade sulfatada.

No entanto, a análise dos produtos de metilação de DSi-1D mostra 12,4 mol% do derivado 3,6-anidrogalactose (AG), cuja porcentagem é similar a da fração nativa DSi-1 (13,5 mol%). Este resultado pode indicar que a galactana DSi-1 é constituída por unidades anidrogalactosídicas glicosiladas em C-2. Alternativamente o processo de metilação conduzido com DSi-1 não teria sido efetivo na metilação do C-2 das unidades anidrogalactosídicas.

De acordo com os resultados de HSQC da fração DSi-1 (Tabela 16) pode-se observar que o sinal de C-1 em 98,4 ppm acopla com diferentes hidrogênios. Entre estes estão os acoplamentos 98,4/5,25 e 98,4/5,15 característicos de C-1/H-1 de 3,6-anidro- $\alpha$ -L-galactose e 2-O-metil-3,6-anidro- $\alpha$ -L-galactose adjacentes ou não, respectivamente, a unidades de  $\beta$ -D-galactose piruvatadas.

O sinal de C-1 em 98,4 ppm também acopla com sinais de H-1 em 5,38 e 5,48 ppm, os quais podem ser correspondentes a unidades de 3,6-anidro- $\alpha$ -L-galactose glicosiladas em C-2 por unidades simples de galactose e/ou xilose (13,5 mol%, Tabela 21).

Paralelamente a presença do derivado 2,6-Me<sub>2</sub>-galactose entre os produtos de metilação de DSi-1 (12 mol%) e DSi-1D (11 mol%) pode ser devida tanto à presença de unidades de  $\beta$ -D-galactose 4-substituída como de unidades de  $\alpha$ -galactose 3-substituída. Considerando a porcentagem destas unidades e de 3,6-anidrogalactose glicosilada seria esperado um total de 23,4 mol% de terminais não redutores contra 13,5 mol% obtidos entre os produtos de metilação de DSi-1D. Este fato pode ser explicado pela alta volatilidade e/ou degradação dos derivados 2,3,4-tri-O-metilxilose e 2,3,4,6-tetra-O-metilgalactose durante o processo de derivatização dos produtos da metilação (NEEDS e SELVENDRAN, 1994). De acordo com os resultados obtidos a fração DSi-1 apresenta elevado grau de ramificação por unidades simples de galactose e/ou xilose, glicosilando o C-2 de 3,6-anidrogalactose e o C-3 e/ou C-4 de unidades galactosídicas.

O processo exaustivo de extração dos polissacarídeos de *C. seminervis* conduzidos no presente trabalho (nove extrações a 80°C), contra três extrações (uma a temperatura ambiente de 25°C e duas a 80°C) realizadas por Zibetti et al. (2009) pode ter sido responsável pela obtenção de polissacarídeos contendo alta porcentagem de unidades anidrogalactosídicas 2-O-glicosiladas. Este tipo de unidade havia sido detectada apenas em baixas porcentagens nas galactanas homogêneas de *C. seminervis* (ZIBETTI et al., 2009).

Assim pelos resultados de metilação conclui-se que a galactana despolimerizada DSi-1 apresenta 25% das unidades A sulfatadas em C-2 e 29% de unidades não substituídas. Adicionalmente aproximadamente 6% das unidades A são piruvatadas, sendo 67% destas sulfatadas em C-2. De forma que ao considerar a porcentagem de unidades de  $\beta$ -D-galactose piruvatadas (sulfatadas ou não em C-2), a galactana DSi-1 contém uma substituição por acetal de ácido pirúvico a cada 33 unidades monossacarídicas.

Adicionalmente as unidades B, na forma anidrogalactosídica, são predominantemente glicosiladas em C-2 (34%), enquanto 13% das formas galactosídicas são sulfatadas em C-6, contra 38% destas unidades não substituídas.

Os resultados de metilação comprovam a grande complexidade estrutural da galactana DSi-1, a qual é intensificada pelo caráter híbrido da molécula comprovado pelas análises enantioméricas e de RMN.

A Tabela 21 também apresenta os resultados de metilação para a galactana despolimerizada DSi-2e, a qual apresenta 4,6-Me<sub>2</sub>-galactose (18,5 mol%) como principal derivado correspondente a unidades A de β-D-galactose 2-sulfato, além de 10,5 mol% destas unidades não sulfatadas em C-2.

A presença de unidades de β-D-galactose 2-sulfato é comprovada pela presença dos sinais em 100,7 e 78,0 ppm no espectro de RMN de <sup>13</sup>C da fração DSi-2e, os quais correspondem aos C-1 e C-2 destas unidades.

A presença de galactose não metilada e de 2-Me-galactose foi atribuída as unidades A substituídas por acetal de ácido pirúvico, sulfatadas ou não em C-2, respectivamente.

Os produtos de metilação da fração dessulfatada DSi-2eD comprovam os resultados obtidos na metilação da fração nativa, posto o aumento dos derivados 2,4,6-Me<sub>3</sub>-galactose e 2-Me-galactose concomitantemente com a diminuição do derivado 4,6-Me<sub>2</sub>-galactose e desaparecimento da galactose não metilada.

A galactana despolimerizada DSi-2e é constituída por quantidades similares de unidades de α-galactose não substituída (9,5 mol%) e sulfatadas em C-6 (9,4 mol%), além de possuir 3,8 mol% de α-galactose 2-sulfato, representada pelo derivado 3,6-Me<sub>2</sub>-galactose, o qual desaparece na fração dessulfatada juntamente com 2,3-Me<sub>2</sub>-galactose, equivalente as unidades de α-galactose 6-sulfato.

Unidades anidrogalactosídicas são representadas pelos derivados 2-Me-3,6-anidrogalactose (2-AG) (3,7 mol%) e 3,6-anidrogalactose (AG) (11,0 mol%). A presença do derivado 2-Me-3,6-anidrogalactose (2-AG) corresponde a porcentagem de 2-O-metil-3,6-anidrogalactose determinada na composição monossacarídica de DSi-2e (1,2 mol%, Tabela 11) e com a presença destas unidades não substituídas em C-2 (2,5 mol%).

A presença de 11,0 mol% do derivado 3,6-anidrogactose (AG) na fração nativa DSi-2e e sua diminuição na fração dessulfatada DSi-2eD (3,0 mol%) comprova que as unidades de 3,6-anidrogactose são sulfatadas em C-2.

Os resultados das análises de metilação corroboram com os dados obtidos por RMN de  $^{13}\text{C}$  onde os sinais em 96,0 e/ou 96,5 ppm correspondem a unidades de 3,6-anidro- $\alpha$ -L-gactose 2-sulfato. No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da fração dessulfatada (DSi-2eD) estes sinais desaparecem paralelamente ao aumento do sinal em 97,8 ppm correspondente a unidades de 3,6-anidro- $\alpha$ -L-gactose não substituídas em C-2.

Segundo os resultados de metilação, a fração dessulfatada DSi-2eD contém de 44,6 a 50,6 mol% de unidades B onde as unidades de 3,6-anidro- $\alpha$ -L-gactose representam de 30 a 27%, deste total, explicando assim a alta intensidade do sinal em 97,8 ppm no espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da gactana despolimerizada DSi-2eD. Adicionalmente, nesta as unidades de 3,6-anidrogactose podem estar ligadas a unidades de  $\beta$ -D-gactose piruvatadas ou não (sinais em 101,9 - 102,8 ppm) (Tabela 18).

Desta forma a fração DSi-2e representaria os blocos de gactanas enriquecidas por unidades de 3,6-anidro- $\alpha$ -L-gactose 2-sulfato, enquanto a gactana despolimerizada DSi-1 seria correspondente a blocos enriquecidos por unidades de 3,6-anidro- $\alpha$ -L-gactose 2-O-glicosiladas. O primeiro tipo de substituição esta presente em porcentagem significativa na gactana homogênea S2S-4 obtida de *C. seminervis* por Zibetti et al. (2009), enquanto o segundo tipo ainda não havia sido descrito.

A presença do derivado 2,6-Me<sub>2</sub>-gactose entre os produtos de metilação de DSi-2e (6,5 mol%) e DSi-1D (6,8 mol%) foi atribuída à presença de unidades de  $\alpha$ -gactose 3-O-glicosilada, que junto aos 3,1 mol% do derivado 2,4-Me<sub>2</sub>-gactose para a fração dessulfatada, referente a unidades A de  $\beta$ -D-gactose 6-O-glicosil, resultaria em aproximadamente 9,5 mol% de terminais não redutores. A fração DSi-1 apresenta 7,4 mol% de unidades como terminais não redutores (xilose e gactose). A alta volatilidade e/ou degradação destes derivados durante o processo de derivatização dos produtos da metilação resulta em porcentagens menores do que a esperada (NEEDS e SELVENDRAN, 1994).

Os resultados de metilação da galactana despolimerizada DSi-2e permitem concluir que dos 41,7 mol% correspondentes as unidades A, 45% são sulfatadas em C-2 (G2S e G2SP). Ao considerar a porcentagem de unidades de  $\beta$ -D-galactose piruvatadas, a galactana DSi-2e é menos piruvatada que DSi-1, contendo uma substituição por acetal de ácido pirúvico a cada 22 unidades monossacarídicas.

As unidades B nesta galactana despolimerizada são constituídas principalmente por unidades anidrogalactosídicas sulfatadas em C-2 (29 a 26%), enquanto as unidades galactosídicas são principalmente sulfatadas em C-6 e não substituídas, em porcentagens similares (21 a 19%).

Os resultados de metilação unidos as informações obtidas por RMN demonstram as diferenças estruturais das galactanas despolimerizadas DSi-1 e DSi-2e e estão de acordo com o maior grau de sulfatação de DSi-2e em relação a DSi-1.

## 6.8 CLIVAGEM DAS GALACTANAS DE *C. seminervis* POR HIDRÓLISE REDUTIVA PARCIAL

Ao analisar os dados obtidos para as galactanas despolimerizadas DSi-1, DSi-2e, DSi-3, DSi-4 e DSi-5 obtidas da alga *C. seminervis*, destaca-se que a hidrólise reductiva parcial permitiu a obtenção de frações ricas em unidades da série enantiomérica L- e frações ricas em unidades da série D-.

As frações homogêneas DSi-1, DSi-2e e DSi-3, além de apresentarem prevalência de díades de agaranas também mostram altas porcentagens de unidades anidrogalactosídicas e baixos teores de sulfato quando comparadas com as frações DSi-4 e DSi-5. Estas apresentam altos teores de sulfato, poucas unidades anidrogalactosídicas e caráter de carragenanas.

Outro aspecto importante a ser enfatizado é a massa molecular destas galactanas (Figura 60). A massa molecular ponderal média ( $M_w$ ) das frações homogêneas foi determinada baseando-se na taxa de variação do índice de refração com relação à concentração ( $dn/dc$ ) (Tabela 8). As galactanas DSi-4 e DSi-5, que apresentam perfil heterogêneo, tiveram suas massas moleculares ( $M_w$ ) estimadas, considerando-se o valor de  $dn/dc$  igual a 0,143, que corresponde a média da relação de  $dn/dc$  obtida para as galactanas homogêneas obtidas na primeira purificação por cromatografia de troca iônica em DEAE-Sephacel.

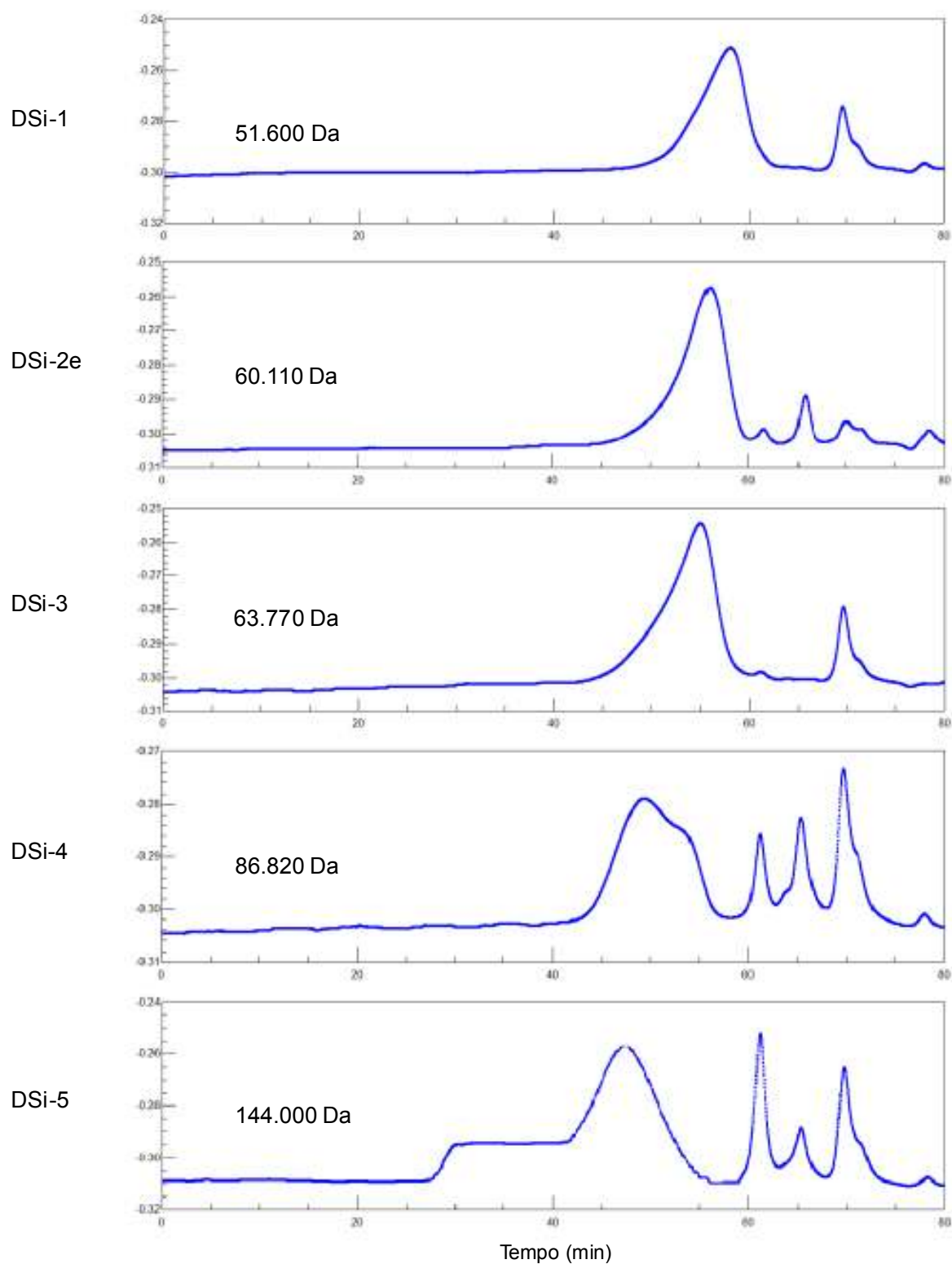


FIGURA 60 - COMPARAÇÃO ENTRE OS VALORES DE MASSA MOLECULAR PONDERAL MÉDIA ( $M_w$ ) DAS GALACTANAS HOMOGÊNEAS DSi-1, DSi-2e, DSi-3, E NÃO HOMOGÊNEAS DSi-4\* E DSi-5\*

\* Valores estimados com  $dn/dc$  igual a 0,143

Os valores de massa molecular ponderal média estimados para DSi-4 e DSi-5 correspondem a 86.820 e 144.000 Da, respectivamente. A comparação dos perfis de eluição destas galactanas em cromatografia de exclusão estérica (HPSEC) permite correlacionar as massas moleculares calculadas com os tempos de retenção, de forma que as moléculas menores possuem tempo de retenção maior (Figura 60).

Durante a cromatografia de troca iônica de polissacarídeos sulfatados há uma forte tendência das cadeias maiores serem eluídas em maiores concentrações do eluente, pois quanto maior a cadeia, mais grupos sulfato podem estar presentes.

As informações da Figura 60 permitem propor a existência de fragmentos resistentes a hidrólise redutiva parcial no *pull* de polissacarídeos da fração SS. Porções que possuem menor quantidade dos açúcares 3,6-anidrogactose e 2-O-metil-3,6-anidrogactose e altos teores de sulfato são mais resistentes a clivagem. As características das frações despolimerizadas indicam a especificidade da hidrólise redutiva parcial em quebrar as ligações anidrogactosídicas, porém a presença de substituições por grupos sulfato pode ocasionar resistência na quebra destas ligações.

A produção de oligossacarídeos a partir da agarose 6-sulfato e das carragenanas do tipo *kappa* e *theta* através de hidrólise redutiva parcial foi realizada por Gonçalves (2005). Da hidrólise das carragenanas foram obtidos di- e tetrassacarídeos, enquanto que a partir da agarose 6-sulfato foram obtidos apenas dissacarídeos.

As díades ideais para a *kappa*-carragenana são compostas por G4S → DA, enquanto a *theta*-carragenana apresenta G2S → DA2S. Na agarose 6-sulfato as díades são compostas por G6S → LA. Estas carragenanas apresentam grupos sulfato distantes a uma ligação de distância dos carbonos que participam da ligação glicosídica, enquanto a agarana apresenta o grupo sulfato a três ligações de distância do carbono envolvido na ligação glicosídica. Logo a formação de tetrassacarídeos a partir da hidrólise das carragenanas sugere que os grupos sulfato provoquem certa resistência das ligações glicosídicas próximas à substituição (GONÇALVES, 2005).

Nota-se que no presente trabalho, conforme aumentam os teores de sulfato nas galactanas despolimerizadas obtidas na eluição com força iônica crescente em DEAE-Sephacel, também aumentam as massas moleculares (Figura 60). De forma



que o aumento da massa molecular condiz com o aumento dos teores de sulfatação nas galactanas despolimerizadas (DSi-1 → DSi-5) e a concomitante diminuição de unidades anidrogalactosídicas, conforme indica a composição monossacarídica.

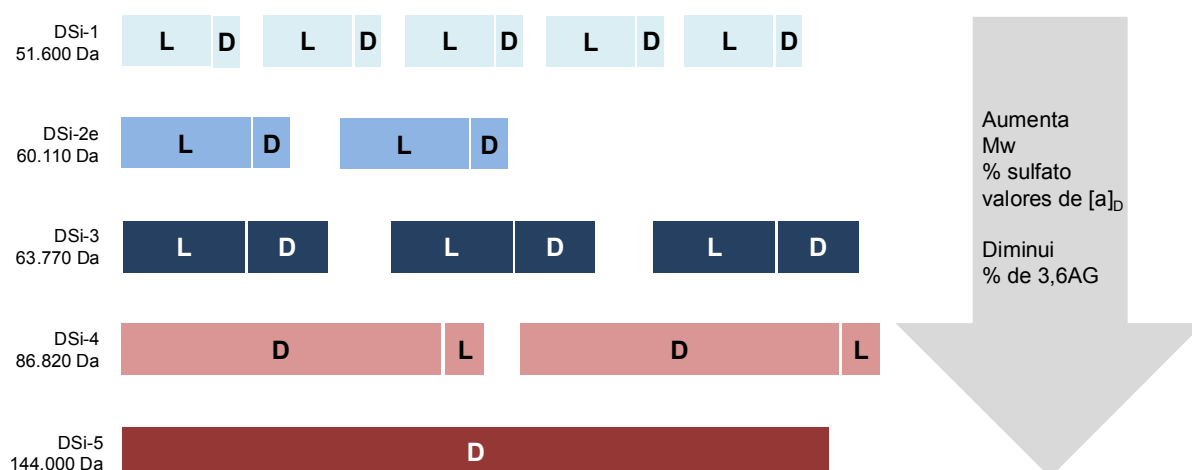
A hidrólise das ligações glicosídicas em meio ácido envolve o ataque nucleofílico do oxigênio da ligação glicosídica a um átomo de hidrogênio dos íons hidrônio formados no meio. Isto leva a formação de uma estrutura intermediária, onde o hidrogênio do meio permanece ligado ao oxigênio da ligação até a formação do carbocátion, que é estabilizado por ressonância com auxílio do oxigênio do anel. Esta estrutura estabilizada por ressonância sofre mutarrotação originando os anômeros  $\alpha$  e  $\beta$  (SOLOMONS e FRYHLE, 2002). Grupos substituintes grandes como éster de sulfato a uma ligação de distância do carbono envolvido na ligação glicosídica provavelmente causam impedimento estérico na formação do intermediário que origina o carbocátion, de forma a dificultar a hidrólise, mesmo que das ligações glicosídicas mais lábeis, como as anidrogalactosídicas.

A obtenção de frações despolimerizadas com características de agaranas ou de carragenanas através de hidrólise redutiva parcial (HRP) condiz com a teoria dos blocos. Esta teoria propõe que nas galactanas DL-híbridas as díades características de agaranas e carragenanas estão dispostas na forma de blocos, de maneira que existem porções das moléculas onde se concentram unidades B da série D- e porções onde se concentram unidades B da série L- (STORTZ e CERREZO, 2000).

Nota-se que a fração DSi-3 exibe rotação óptica de caráter intermediário mais intenso em comparação com as outras quatro galactanas despolimerizadas isoladas, pois dentre estas, DSi-3 mostra o valor mais baixo e caráter negativo ( $-12,0^\circ$ ). Além disso, DSi-3 apresenta o espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  com maior complexidade de sinais na região anomérica e porcentagens maiores de unidades na configuração D quando comparada com as frações DSi-1 e DSi-2e. Isto indica que a galactana DSi-3 apresenta um caráter de maior hibridéz quando comparada com as outras galactanas obtidas após a despolimerização da fração polissacarídica SS. Estes resultados podem indicar que a fração DSi-3 represente uma molécula derivada da clivagem de uma galactana DL-híbrida que mantém alto grau de complexidade, podendo corresponder a um ponto de junção entre os blocos de agarana e carragenana constituintes das galactanas DL-híbridas.

Considerando a estrutura da galactana majoritária e homogênea S2S-3 obtida de *C. seminervis* por Zibetti et al. (2009) e as características estruturais gerais das galactanas DSi-1, DSi-2e, DSi-3, DSi-4 e DSi-5 é possível esboçar um padrão de clivagem capaz de originar as galactanas despolimerizadas.

O polissacarídeo S2S-3 apresenta uma proporção aproximada de dois blocos constituintes de agarana para um de carragenana (ZIBETTI et al., 2009). Dentre as galactanas despolimerizadas obtidas da fração polissacarídica SS, existem três frações onde predominam monossacarídeos da série enantiomérica L- e duas onde predominam monossacarídeos da série D-, de forma que a proporção de blocos constituintes encontrada para a galactana majoritária e homogênea S2S-3 obtida de *C. seminervis* se repetiu após a despolimerização da fração polissacarídica SS solúvel em KCl 2M obtida da mesma espécie de alga durante este trabalho.



NOTA: as proporções de estruturas de agaranas (letras L) e carragenanas (letras D) para cada fração são representativas das proporções das unidades B nas díades propostas em acordo com os dados de RMN.

FIGURA 61 - RENDIMENTO PROPORCIONAL DAS FRAÇÕES DESPOLIMERIZADAS DSi-1, DSi-2e, DSi-3, DSi-4 E DSi-5 (5:2:3:2:1) OBTIDAS A PARTIR DA HRP DA FRAÇÃO POLISSACARÍDICA SS SOLÚVEL EM KCl 2M OBTIDA DE *C. seminervis*

A proporção de cada fração despolimerizada obtida do hidrolisado da fração polissacarídica SS é apresentada na Figura 61 em concordância com os rendimentos em peso seco de cada fração com relação a porção polissacarídica solúvel recuperada após o tratamento com KCl 2M. Enquanto a Figura 62 mostra pontos de clivagem hipotéticos que poderiam originar as frações despolimerizadas, as quais foram representadas por diferentes cores, número de unidades

monossacarídicas e proporção de unidades de 3,6-anidrogactose. No entanto é importante destacar que estas figuras são complementares, pois na verdade o *pull* de polissacarídeos da fração SS apresentaria o equivalente a cinco porções de DSi-1, duas porções de DSi-2e, três porções de DSi-3, duas porções de DSi-4 para uma porção de DSi-5.

A massa molecular ponderal média ( $M_w$ ) estimada para o *pull* de polissacarídeos da fração SS ( $dn/dc = 0,138^6$ ) corresponde a 362.800 Da, enquanto que a média ponderada dos valores de  $M_w$  encontrados para as galactanas despolimerizadas é igual a 66.759 Da, de maneira que a relação entre a massa original e a média encontrada para as frações após HRP apontam para um grau de despolimerização de 5,4. Assim os pontos de clivagem determinaram o rendimento de cinco principais galactanas com menor grau de polimerização, determinando frações com características diferenciadas.

Seria possível sugerir que os blocos DSi-2e, DSi-3, DSi-4 e DSi-5, em sua forma original, antes da HRP, constituiriam as diferentes galactanas híbridas de *C. seminervis* estudadas até o presente. Antes da HRP os blocos não possuiriam unidades de 3,6-anidrogactitol, não apresentariam perdas de sulfato em C-2 ou maior proporção de unidades B frente as unidades A, como ocorre para DSi-2e (dados de metilação). A diferença na proporção de unidades A e B pode ser explicada pela competição entre os processos de autohidrólise das ligações galactosídicas e a hidrólise redutiva parcial, que leva a perda de unidades B (NOSEDA e CERESO, 1993; ZIBETTI et al., 2009).

Assim é possível que o bloco DSi-2e, enriquecido com unidades de 3,6-anidro- $\alpha$ -L-gactose, seja parte constituinte da galactana homogênea S2S-4, a qual apresenta grande quantidade destas unidades segundo Zibetti et al. (2009).

Os blocos DSi-3, DSi-4 e DSi-5 poderiam compor a galactana S2S-3, arranjados de forma a assegurar a proporção de aproximada de dois blocos constituintes de agarana para um de carragenana encontrada para S2S-3 por Zibetti et al. (2009).

---

<sup>6</sup> O valor de  $dn/dc = 0,138$  é equivalente a média das taxas de variação do índice de refração com relação à concentração das frações homogêneas S2S-3 e S2S-4 obtidas por Zibetti et al. (2009).

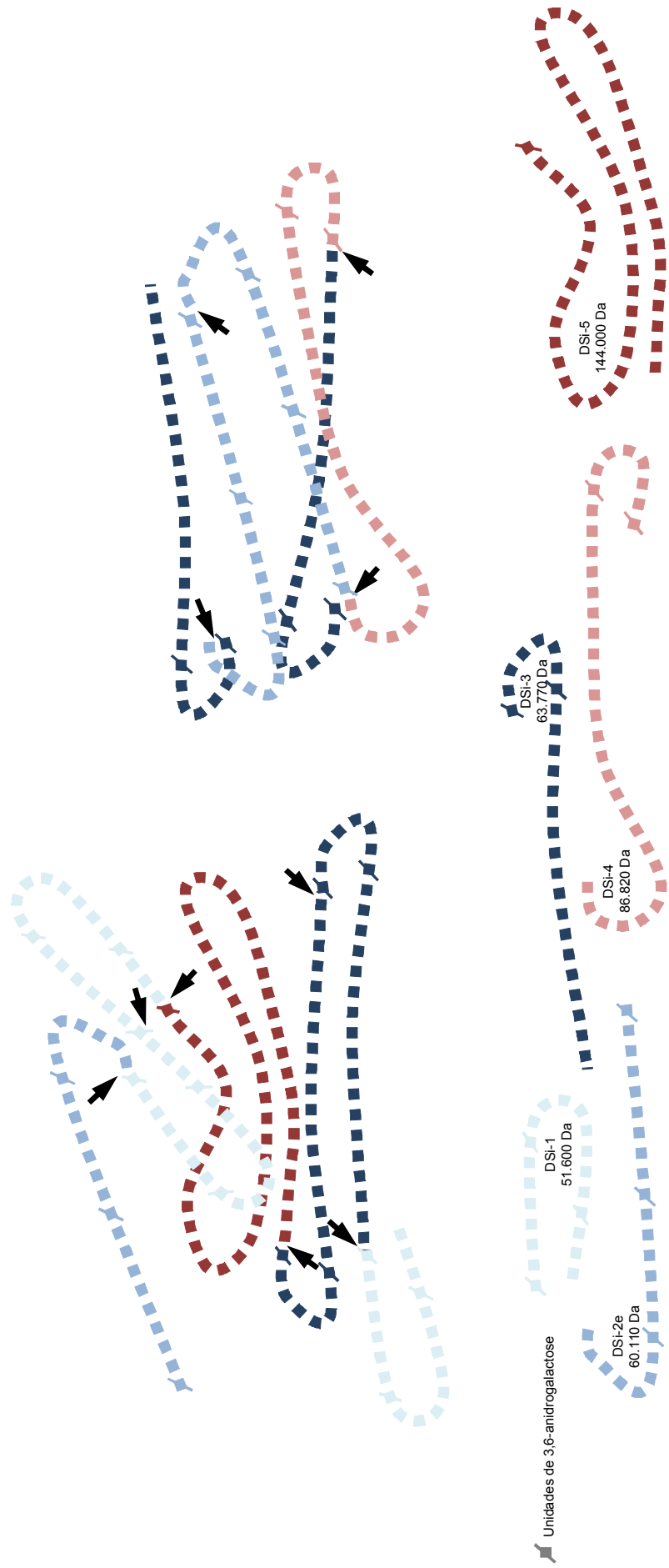


FIGURA 62 - ESBOÇO DO PADRÃO DE CLIVAGEM (INDICADO PELAS SETAS) EM DIFERENTES PORÇÕES ESTRUTURAIS DE POLISSACARÍDEOS HIPOTÉTICOS PRESENTES NA FRAÇÃO SS

## 6.9 ATIVIDADE ANTI-HSV DAS GALACTANAS DE *C. seminervis*

Devido às suas características polianiônicas os polissacarídeos sulfatados obtidos de algas marinhas apresentam grande potencial antiviral causando efeitos inibitórios na replicação de diversos vírus (WITVROUW e DE CLERQC, 1997).

O grau de sulfatação, a posição dos grupos sulfato e o peso molecular dos polissacarídeos estão correlacionados com a atividade antiviral destas moléculas.

Com o objetivo de correlacionar atividade antiviral das galactanas sulfatadas obtidas da alga *C. seminervis* com a estrutura química apresentada por estes biopolímeros a galactana homogênea S2S-4, obtida por Zibetti et al. (2009) a fração polissacarídica SS, obtida neste trabalho e os produtos de hidrólise redutiva parcial de SS, representados pelo hidrolisado DSi e pelas galactanas despolimerizadas e homogêneas DSi-1, DSi-2e e DSi-3 as quais não haviam sido avaliadas quanto a sua atividade antiviral; foram testados contra o HSV-1 e o HSV-2 isolados de lesões labiais e genitais, respectivamente.

A avaliação da atividade destas galactanas sobre os vírus herpes simplex tipos 1 e 2 foi realizada no laboratório de Virologia do Departamento de Virologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) pelo grupo de pesquisa da Professora Dra. Maria Teresa Villela Romanos, com o qual o Laboratório de Química de Carboidratos de Algas da Universidade Federal do Paraná (UFPR) possui colaboração científica.

### 6.9.1 TESTE DE CITOTOXICIDADE DAS GALACTANAS DE *C. seminervis* S2S-4, SS, DSi, DSi-1, DSi-2e E DSi-3

A galactana homogênea S2S-4, o extrato polissacarídico SS tratado com KCl 2M, o seu hidrolisado DSi e as galactanas homogêneas DSi-1, DSi-2e e DSi-3 foram primeiramente testados quanto a sua citotoxicidade em relação às células Vero através da verificação da alteração morfológica das células e da viabilidade das células quando tratadas com estas galactanas sulfatadas.

A maior concentração empregada em que não foi observada alteração morfológica foi denominada concentração máxima não tóxica (CMNT) e a concentração citotóxica 50% (CC<sub>50</sub>) foi calculada como a concentração das galactanas necessária para reduzir a viabilidade celular em 50% quando comparada

ao controle. Nenhum efeito tóxico para as células Vero foi observado, mesmo em concentrações maiores que 200 µg/mL.

#### 6.9.2 TESTE DE ATIVIDADE ANTIVIRAL DAS GALACTANAS SULFATADAS CONTRA HSV-1 E HSV-2

Não foram verificados efeitos citotóxicos para as galactanas S2S-4, SS, DSi, DSi-1, DSi-2e e DSi-3. Portanto, inicialmente foram feitos ensaios para avaliar a possível atividade das amostras de galactanas contra o HSV-1 e o HSV-2, empregando a concentração máxima não tóxica. O grau de atividade antiviral foi expresso em índice de inibição viral (IIV) e porcentagem de inibição (PI), através do método de redução do título viral (Tabela 22).

O índice de inibição viral foi calculado pela diferença entre o título viral na ausência das galactanas e na presença das galactanas, de forma que quanto maior o resultado desta diferença, maior é a ação antiviral da galactana. Se o título viral na presença da galactana é menor que na ausência dela, isto significa que a galactana promove de alguma forma a diminuição do título viral, atuando como antiviral.

A porcentagem de inibição viral foi calculada por  $[1 - (\text{antilog } T / \text{antilog } C)] \times 100$ , sendo que T corresponde às unidades infecciosas na cultura de células tratadas com a substância e C corresponde às unidades infecciosas na cultura de células não tratadas (controle). Isto significa que quanto menor for a quantidade de unidades infecciosas na cultura de células tratadas com a galactana em relação a cultura controle, maior será a porcentagem de inibição viral e mais eficiente é a ação antiviral da galactana.

Tendo em vista os resultados da Tabela 22 nota-se que as galactanas presentes nas frações polissacarídicas S2S-4 e SS apresentam alto grau de atividade antiviral contra HSV-1 e HSV-2 visto as elevadas porcentagens de inibição viral obtidas para estas frações. A fração DSi, obtida após hidrólise redutiva parcial de SS, também apresenta alto grau de atividade antiviral contra as duas cepas virais testadas (PI = 92,2 e 96,8, para HSV-1 e HSV-2, respectivamente). No entanto percebe-se uma leve diminuição dos índices para a fração hidrolisada DSi.

As galactanas despolimerizadas DSi-2e e DSi-3 apresentaram baixos graus de atividade antiviral para HSV-1 e HSV-2, medidos pelos índices de inibição viral (IIV) e porcentagem de inibição viral (PI) (Tabela 22). O mesmo acontece para DSi-1 contra o vírus HSV-2. Portanto os ensaios para determinar a cinética de inibição viral contra os respectivos vírus não foram realizados para estas galactanas.

TABELA 22 - AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL DAS GALACTANAS DE *C. seminervis*

Galactanas sulfatadas	CC <sub>50</sub> <sup>a</sup> (µg/mL)	HSV-1		HSV-2	
		IIV <sup>b</sup>	PI <sup>c</sup>	IIV	PI
S2S-4 <sup>d</sup>	> 200	2,90	99,9	3,50	99,9
SS	> 200	2,61	99,7	3,50	99,9
DSi	> 200	1,11	92,2	2,50	96,8
DSi-1	> 200	0,35	55,3	0	0
DSi-2e	> 200	0,14	27,5	0	0
DSi-3	> 200	0	0	0,20	36,9

<sup>a</sup> CC<sub>50</sub> = concentração citotóxica para 50% das células em cultura; <sup>b</sup> IIV = índice de inibição viral (diferença do título do vírus na ausência e na presença da galactana); <sup>c</sup> PI = porcentagem de inibição (PI = [1 - (antilog Teste / antilog Controle)] x 100); <sup>d</sup> Galactana homogênea obtida de *C. seminervis* por Zibetti et al. (2009).

A cinética de inibição viral origina um gráfico que correlaciona as diferentes concentrações testadas das galactanas com a porcentagem de inibição que elas apresentam. A partir desta curva dose-resposta é determinada a dose efetiva para reduzir o título viral em 50% (ED<sub>50</sub>). O índice de seletividade (IS) relaciona a concentração antiviral efetiva das galactanas (ED<sub>50</sub>) com a citotoxicidade (CC<sub>50</sub>) apresentada (Tabela 23).

Os dados da Tabela 23 mostram que as concentrações efetivas para reduzir o título viral em 50% (ED<sub>50</sub>) apresentadas pelas frações S2S-4 e SS são significativamente mais baixas que a concentração citotóxica (CC<sub>50</sub>). De forma que estas apresentam índices de seletividade (CC<sub>50</sub>/ ED<sub>50</sub>) da ordem de >37,7 / >24,4 e >11.111 / >18,182, para os vírus HSV-1 e HSV-2, respectivamente. Elevados índices de seletividade demonstram a especificidade do efeito inibitório dos compostos contra os vírus. O valor de IS é um parâmetro utilizado para avaliar o potencial de um composto como agente antiviral e está na ordem de 1000-20000 para os compostos mais ativos, os quais são representados por polissacarídeos sulfatados (DAMONTE et al., 2004). Os elevados índices de seletividade apresentados por

S2S-4 e SS demonstram que estes agentes antivirais são promissores candidatos para estudos futuros com os vírus Herpes simplex e outros vírus envelopados como HIV (HARDEN et al., 2009).

TABELA 23 - DOSE EFETIVA PARA REDUZIR O TÍTULO VIRAL EM 50% (ED<sub>50</sub>) E ÍNDICE DE SELETIVIDADE (IS) DAS GALACTANAS DE *C. seminervis*

Galactanas sulfatadas	CC <sub>50</sub> <sup>a</sup> (µg/mL)	HSV-1		HSV-2	
		ED <sub>50</sub> <sup>b</sup> (µg/mL)	IS <sup>c</sup> (CC <sub>50</sub> / ED <sub>50</sub> )	ED <sub>50</sub> (µg/mL)	IS (CC <sub>50</sub> / ED <sub>50</sub> )
S2S-4 <sup>d</sup>	> 200	5,3	>37,7	0,018	>11.111
SS	> 200	8,2	>24,4	0,011	>18.182
DSi	> 200	22,7	>8,81	38,1	>5,25
DSi-1	> 200	183,0	>1,10	n.r.	n.r.
Acyclovir <sup>®</sup>	> 200	0,8	>250	1,38	>144,9

n.r. = não realizado (ver texto); <sup>a</sup> CC<sub>50</sub> = concentração citotóxica para 50% das células em cultura; <sup>b</sup> ED<sub>50</sub> = dose efetiva capaz de inibir 50% da propagação viral; <sup>c</sup> IS = índice de seletividade (CC<sub>50</sub>/ ED<sub>50</sub>); <sup>d</sup> Galactana homogênea obtida de *C. seminervis* por Zibetti et al. (2009).

A fração DSi apresenta valores maiores de concentrações efetivas para reduzir o título viral em 50% (ED<sub>50</sub>) e menores índices de seletividade quando comparados as frações S2S-4 e SS .

A galactana despolimerizada DSi-1 apresenta alto valor relativo de ED<sub>50</sub> frente ao HSV-1, o que resulta em um baixo índice de seletividade e uma atividade não significativa frente ao HSV-1, embora signifique 55,3% de inibição. Em relação ao vírus HSV-2 a galactana DSi-1 não desempenha qualquer atividade.

A galactana homogênea S2S-4 e a fração polissacarídica SS apresentam índices de seletividade muito superiores aos apresentados pelo Acyclovir<sup>®</sup> quando testadas frente ao HSV-2. A fração S2S-4 possui índice de seletividade cerca de 77 vezes maior que o medicamento referência contra HSV-2. Enquanto a fração SS é mais efetiva contra o HSV-2 em 125 vezes com relação ao Acyclovir<sup>®</sup>.

A fração DSi, representativa do *pull* de estruturas derivadas da hidrólise redutiva parcial da fração SS, possui efetividade anti-HSV intermediária com relação as galactanas de maior massa molecular (S2S4 e SS) e a galactana despolimerizada DSi-1, que possui menor massa molecular.



A avaliação da atividade de agaranas sulfatadas obtidas de *Bostrychia montagnei* (Ceramiales) frente ao HSV-1 e ao HSV-2 revelou que a atividade antiviral foi efetiva para as galactanas com maior grau de sulfatação e maior massa molecular (DUARTE et al., 2001).

A galactana homogênea S2S-4 ( $M_w$  332.400 Da) possui teor de sulfatação de 26,6%, sendo formada principalmente por unidades de  $\beta$ -D-galactose 2-sulfato (11,9 mol%),  $\beta$ -D-galactose 2-sulfato 4,6-O-(1'-carboxietilideno) (6,0 mol%),  $\beta$ -D-galactose 2,6-disulfato (18,6 mol%), 3,6-anidro- $\alpha$ -L-galactose (7,3 mol%) e 3,6-anidro- $\alpha$ -L-galactose 2-sulfato (15,4 mol%).

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da fração polissacarídica SS com 20,0% de sulfato sugere elevado teor de unidades de  $\beta$ -D-galactose 2-sulfatadas além de unidades de  $\alpha$ -L-galactose e  $\alpha$ -D-galactose (C-6 sulfatadas ou não), 3,6-anidro- $\alpha$ -L-galactose 2-sulfato e 3,6-anidro- $\alpha$ -L-galactose.

A fração DSi (21% de sulfato) corresponde aos produtos de hidrólise reductiva parcial de SS e originou as galactanas homogêneas DSi-1, DSi-2e e DSi-3, as quais possuem porcentagem de sulfato de 14,1; 23,7 e 29,9% e apresentam  $M_w$  de 51.600, 60.110 e 63.770 Da, respectivamente.

Dentre as frações testadas S2S-4 apresenta os melhores resultados de ação antiviral enquanto as frações despolimerizadas apresentam baixa ou nula atividade contra HSV-1 e HSV-2. Mesmo que a fração DSi-3 (29,9% de sulfato) apresente maior porcentagem de sulfato que S2S-4 (26,6%) esta possui uma  $M_w$  cerca de cinco vezes menor que S2S-4. Além da massa molecular ressalta-se que tanto DSi-3 assim como DSi, DSi-1 e DSi-2e, são produtos de hidrólise reductiva parcial, processo este que paralelamente leva a perda dos grupos sulfato em C-2 das unidades de  $\beta$ -D-galactose (ZIBETTI et al., 2005 e 2009).

Segundo Zibetti et al. (2005), o detalhe estrutural representado pela díade G2S  $\rightarrow$  D(L)6S, presente na galactana C2S-3 obtida de *C. crenulata*, que apresenta atividade antiviral contra cepas de HVS-1 e HSV-2 resistentes a Acyclovir<sup>®</sup> com baixíssima citotoxicidade (TALARICO et al., 2004), é estruturalmente análogo a sequência mínima de ligação necessária para a interação do heparan sulfato com a glicoproteína gC do vírus HSV-1.

Desta forma a perda de grupos sulfato substituintes em C-2 de  $\beta$ -D-galactose aliada a massas moleculares menores, pode levar a perda significativa da atividade anti-HSV.

A fração despolimerizada DSi-1 apresentou baixa atividade frente a HSV-1, no entanto as frações DSi-2e e DSi-3 apresentaram índices de inibição viral não significativos contra HSV-1 e HSV-2. Isto pode ser devido ao incremento de glicosilações por xilose na fração DSi-1, como discutido na análise de metilação e espectroscopia de RMN desta fração, que podem aumentar o caráter hidrofóbico destas moléculas.

De acordo com Duarte et al. (2004) ajuste das cargas negativas e superfícies hidrofóbicas do polissacarídeo à zona de ligação da glicoproteína C viral pode ser facilitado pela rotação das unidades de açúcar através de suas ligações glicosídicas. As forças iônicas e hidrofóbicas atuam em conjunto na formação do complexo polissacarídeo sulfatado-glicoproteínas virais, resultando num efeito sinérgico de estabilização.

Em relação à enantiomericidade da unidade de galactose a galactana S2S-4, frações SS e DSi possuem caráter DL-híbrido apresentando estruturas de carragenanas e agaranas, enquanto que as galactanas despolimerizadas DSi-1, DSi-2e e DSi-3 são enriquecidas com díades de agaranas, como discutido durante nas análises espectroscópicas destas frações.

A enantiomeria das unidades B não consiste em fator de primeira importância na atividade antiviral desde que carragenanas e agaranas podem apresentar elevada atividade anti-HSV (DUARTE et al., 2001a, DUARTE et al., 2001b, DUARTE et al., 2004; GHOSH et al., 2009). Destaca-se, no entanto, que a configuração destas unidades pode influenciar na possibilidade dos polissacarídeos em adequar sua forma para posicionar os grupos sulfato na formação do complexo polissacarídeo-vírus (DUARTE et al., 2004).

Em geral polissacarídeos sulfatados com elevados teores de sulfato (igual ou maior que 20%) possuem tendência em apresentar atividade antiviral (GHOSH et al., 2009). No entanto a posição destes grupos é de grande importância para o desempenho da atividade antiviral posto que moléculas com baixo teor de sulfato podem apresentar regiões, ao longo do polímero, altamente sulfatadas e com grupos sulfato localizados em posições adequadas de modo a interagir fisicamente com regiões carregadas positivamente da glicoproteína gC. Este pode ser o caso da galactana DSi-1, que com 14% de sulfato apresentou baixa atividade enquanto DSi-2e e DSi-3 (23,7 e 29,9% de sulfato, respectivamente) foram desprovidas de atividade antiviral.

## 7 CONCLUSÃO

A partir da hidrólise reductiva parcial das galactanas de *C. seminervis* foram obtidos cinco tipos estruturais distintos de galactanas despolimerizadas as quais mantêm o caráter DL-híbrido.

Importantes diferenças estruturais tais como, predominância de estruturas de agaranas ou de carragenanas, teor e posicionamento de grupos sulfato, glicosil, presença de acetal de ácido pirúvico e massa molecular aliadas ao baixo rendimento das galactanas despolimerizadas constituídas majoritariamente por díades com enantiômeros da série D- permitem destacar que:

- . Os resultados obtidos demonstram que as galactanas DL-híbridas são constituídas por blocos ricos em agaranas e blocos ricos em carragenanas.
- . As galactanas despolimerizadas com maior caráter de agarana, menores massas moleculares e menores graus de sulfatação representam os blocos constituintes principais das galactanas nativas de *C. seminervis*.
- . Considerando a massa molecular das principais galactanas nativas de *C. seminervis* (415-332 kDa) e das galactanas despolimerizadas com maior caráter de agarana (52-64 kDa) e de carragenana (87-144 kDa), estas podem, em sua forma original, representar diferentes combinações que constituem as galactanas DL-híbridas produzidas por *C. seminervis*. De forma que pode ser estimada uma proporção teórica de 6-4:1 das diferentes galactanas despolimerizadas com caráter de agarana e de carragenana, respectivamente.

Outro aspecto importante deste estudo foi a possibilidade de identificar por RMN, nas galactanas despolimerizadas com maior caráter de carragenana, os sinais correspondentes a díades de carragenanas, que por estarem em baixa percentagem nos polissacarídeos nativos ainda não haviam sido assinaladas.

A avaliação da atividade anti-HSV das galactanas nativas e despolimerizadas frente aos vírus HSV-1 e HSV-2 demonstrou que as galactanas nativas apresentam potente e seletiva atividade principalmente contra HSV-2, enquanto as galactanas despolimerizadas apresentam baixa ou nula atividade. Assim fatores como massa molecular, porcentagem e posição de grupos sulfato são de fundamental importância para o desempenho da atividade anti-HSV destas galactanas DL-híbridas.

## REFERÊNCIAS

- ADAMS, G. A. Complete acid hydrolysis. In: **Methods in Carbohydrate Chemistry**, v. 5, p. 269-276, 1965.
- ALGAE BASE, [www.algaebase.org/](http://www.algaebase.org/). Acesso em: fev. 2010 e jan. 2011.
- ALLSOBROOK, A. J. R., NUNN, J. R; PAROLIS, H. Investigation of the acetolysis products of the sulphated polysaccharide of *Aeodes ulvoidea*. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 40, p. 337-344, 1975.
- ALLSOBROOK, A. J. R., NUNN, J. R; PAROLIS, H. Sulfated polysaccharides of the Grateloupiaceae family. V. Polysaccharides from *Aeodes ulvoidea*. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 16, p. 71-78, 1971.
- ARAKI, C.; HIRASE, S. Studies on the Chemical Constitution of Agar-agar. XVII Isolation of Crystalline Agarobiose Dimethylacetal by Partial Methanolysis of Agar-agar. **Bulletin of The Chemical Society of Japan**, v. 27, p. 109-112, 1954.
- ASSUMPÇÃO, R. M. V.; MORITA, T. **Manual de Soluções, Reagentes e Solventes**, 1ed.; Edgar Blücher: São Paulo, 1968; p 100.
- CÁCERES, P.J.; CARLUCCI, M.J.; DAMONTE, E.B.; MATSUHIRO, B.; ZÚÑIGA, E.A. Carrageenans from Chilean samples of *Stenogramme interrupta* (Phylloporaceae): structural analysis and biological activity. **Phytochemistry**, v. 53, p. 81-86, 2000.
- CAMPO, V. L. D.; KAWANO, F.; SILVA JR., D. B.; CARVALHO, I. Carrageenans: Biological properties, chemical modifications and structural analysis – A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 77, p. 167-180, 2009.
- CARLUCCI, M.J.; PUJOL, C.A.; CIANCIA, M.; NOSEDA, M.D.; MATULEWICZ, M.C.; DAMONTE, E.B.; CEREZO, A.S. Antiherpetic and anticoagulant properties of carrageenans from the red seaweed *Gigartina skottsbergii* and their cyclized derivatives: correlation between structure and biological activity. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 20, p. 97-105, 1997.
- CARPITA, N. C. e SHEA, E. Linkage structure of carbohydrates by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) of partially mutilated alditol acetates. In: BIERMANN, C. J. e MCGINNIS, G. D. **Analysis of carbohydrates by GLC and MS**, 2 ed., CRC Press, Boca Raton, Florida, p. 157-216, 1990.

CASES, M.R.; CERREZO, A.S.; STORTZ, C.A. Separation and quantitation of enantiomeric galactoses and their mono-O-methylethers as their diastereomeric acetylated 1-deoxy-1-(2-hydroxy-propylamino) alditols. **Carbohydrate Research**, v. 269, p. 333-341, 1995.

CERREZO, A.S. The carrageenan system of *Gigartina skottsbergii* S. et G. Part I. Studies on a fraction of kappa-carrageenan. **Journal of the Chemical Society, (C)**, p. 992-997, 1967.

CHIOVITTI, A.; BACIC, A.; CRAIK, D.J.; MUNRO, S.L.A.; KRAFT, G.T.; LIAO, M-L. Cell-wall polysaccharides from red algae of the family Solieriaceae (Gigartinales, Rhodophyta): novel, highly pyruvated carrageenans from the genus *Callophycus*. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 299, p. 229-243, 1997.

CHOPIN, T.; HANISAK, M.D.; CRAIGIE, J.S. Carrageenans from *Kallymenia westii* (Rhodophyceae) with a review of the phycocolloids produced by Cryptonemiales. **Botanica Marina**, Berlin, v. 37, p. 433-444, 1994.

CHOPIN, T.; KERIN, B. F.; MAZEROLLE, R. Phycocolloid chemistry as a taxonomic indicator of phylogeny in the Gigartinales, Rhodophyceae. **Phycological Research**, v. 47, no. 3, p. 167-188, 1999.

CIANCIA, M.; NOSEDA, M. D.; MATULEWICZ, M. C.; CERREZO, A. S. Alkali modification of carrageenans: Mechanism and kinetics in the kappa/iota-, mu/ nu- and lambda-series. **Carbohydrate Polymers**, v. 20, p. 95-98, 1993.

CIUCANU, I.; KEREK, F. A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. **Carbohydrate Research**, v. 131, p. 209-217, 1984.

COLODI, F.G. Galactanas sulfatadas extraídas da alga vermelha *Halymenia floridana* J. Agardh (Halymeniales, Rhodophyta). **Monografia de conclusão de curso** - Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 70 p., 2007.

DAMONTE, E. B.; MATULEWICZ, M. C.; CERREZO, A.S. Sulfate seaweed polysaccharides as antiviral agents. **Current Medicinal Chemistry**, v. 11, p. 2399-2419 2004.

DE CLERCQ, E.; DESCHAMPS, J.; VERHELST, G.; WALKER, R. T.; JONES, A. S.; TORRENCE, P. F.; SHUGAR, D. Comparative efficacy of antiherpes drugs against

different strains of herpes simplex virus. **Journal of Infectious Diseases**, v. 141, p. 563-574, 1980.

DE RUITER, G. A.; RUDOLPH, B. Carrageenan biotechnology. **Trends in Food Science & Technology**, v, 8, p. 389-395, 1997.

DODGSON, K.S. Determination of inorganic sulphate in studies on the enzymic and non-enzymic hydrolysis of carbohydrate and other sulphate esters. **Biochemical Journal**, London, v. 78, p. 312-319, 1961.

DUARTE, M. E. R.; NOSEDA, D. G.; NOSEDA, M. G.; TULIO S.; PUJOL, C. A.; DAMONTE, E. B., Inhibitory effect of sulfated galactans from the marine alga *Bostrychia montagnei* on herpes simplex virus replication in vitro. **Phytomedicine**, v. 8, p. 53-58, 2001a.

DUARTE, M. E. R.; NOSEDA, M. D.; CARDOSO, M. A; TULIO, S; CEREZO A. S., The structure of a galactan sulfate from the red seaweed *Bostrychia montagnei* **Carbohydrate Research**, v. 337, p. 1137-1144, 2001b.

DUARTE, M.E.; NOSEDA, D.G.; NOSEDA, M.D.; TULIO, S.; PUJOL, C.A.; DAMONTE, E.B. Inhibitory effect of sulfated galactans from the marine alga *Bostrychia montagnei* on herpes simplex virus replication in vitro. **Phytomedicine**, v. 8, p. 53-58, 2001.

DUARTE, M.E.R.; CAUDURO, J.P.; NOSEDA, M.D.; GOLÇALVEZ, 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. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 339, p. 335-347, 2004.

DUARTE, M.E.R.; NOSEDA, M.D.; CARDOSO, M.A.; TULIO, S.; CEREZO, A.S. The structure of a galactan sulfate from the red seaweed *Bostrychia montagnei*. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 337, p. 1137-1144, 2002.

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

DUCATTI, D. R. B. Oligossacarídeos obtidos por hidrólise redutiva parcial de polissacarídeos de algas vermelhas: estudos de ressonância magnética nuclear. **Dissertação de Mestrado**. Departamento de Bioquímica da UFPR, 113 p., 2005.

DUCKWORTH, M.; YAPHE, W. The structure of agar. Part II: The use of a bacterial agarase to elucidate structural features of the charged polysaccharides in agar. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 16, p. 435-445, 1971.

ERREA, M. I.; KOLENDER, A. A.; MATULEWICS, M. C. Absolute Configuration of 2,6-di-O-Alkylgalactose Obtained from Peralkylated Red Algal Polysaccharides. **Botanica Marina**, v. 44, p. 133-138, 2001.

ERREA, M.; CIANCIA, M.; MATULEWICZ, M.; CEREZO, A. Separation and quantitation of enantiomeric 3,6-anhydrogalactoses by conversion to the corresponding diastereomeric acetylated *sec*-butyl 3,6-anhydrogalactonates. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 311, p. 235-238, 1998.

ESTEVEZ, J.M.; CIANCIA, M.; CEREZO, A.S. DL-Galactan hybrids and agarans from gametophytes of the red seaweed *Gymnogongrus torulosus*. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 331, p. 27-41, 2001.

FALSHAW, R.; FURNEAUX, R. H. The structural analysis of disaccharides from red algal galactans by methylation and reductive partial-hydrolysis. **Carbohydrate Research**, v. 269, p. 183-189, 1995.

FALSHAW, R.; FURNEAUX, R. H.; STEVENSON, D. E. Structural analysis of carrageenans from the red alga, *Callophyllis hombroniana* Mont. Kütz (Kallymeniaceae, Rhodophyta). **Carbohydrate Research**, v. 340, p. 1149-1158, 2005.

FALSHAW, R.; FURNEAUX, R. H.; WONG, H.; LIAO, M.-L.; BACIC, A.; CHANDRKRACHANG, S. Structural analysis of carrageenans from Burmese and Thai samples of *Catenella cipa* Zanardini. **Carbohydrate Research**, v. 285, p. 81-98, 1996.

FALSHAW, R.; FURNEAUX, R.H. Carrageenan from the tetrasporic stage of *Gigartina decipiens* (Gigartinaceae, Rhodophyta). **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 252, p. 171-182, 1994.

FALSHAW, R.; FURNEAUX, R.H.; STEVENSON, D.E. Agars from nine of the red seaweeds in the genus *Curdiea* (Gracilariaceae, Rhodophyta) **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 308, p. 107-115, 1998.

FALSHAW, R.; FURNEAUX, R.H.; WONG, H. Analysis of pyruvylated  $\beta$ -carrageenan by 2D NMR spectroscopy and reductive partial hydrolysis. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 338, p. 1403-1414, 2003.

GAREGG, P. J.; LINDBERG, B.; KONRADSSON, P.; KVARNSTRÖM, I. Hydrolysis of glycosides under reducing conditions. **Carbohydrate Research**, v. 176, p. 145-148, 1988.

GAREGG, P.J.; LINDBERG, B.; KVARNSTROM, I. Preparation and N.M.R. studies of pyruvic acid and related acetals of pyranosides: configuration at the acetal carbon atoms. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 77, p. 71-78, 1979.

GERWIG, G. J.; KAMERLING, J. P.; Vliegenthart, J. F. G. Determination of the D and L configuration of neutral monosaccharides by high-resolution capillary GLC. **Carbohydrate Research**, v. 62, p. 349-357, 1978.

GEYER, R. e GEYER, H. Saccharide linkage analysis using methylation and other techniques. In: LENNARZ, W. J e HART, G. W. **Guide to techniques in glycobiology**, v. 230, p. 86-108, 1994.

GHOSH, T.; CHATTOPADHYAY, K.; MARSCHALL, M.; KARMAKAR, P.; MANDAL, P.; RAY, B. Focus on antivirally active sulfated polysaccharides: From structure-activity analysis to clinical evaluation. **Glycobiology**, v. 19, p.2-15, 2009.

GONÇALVES, A.G. Modificações químicas em oligossacarídeos derivados de polissacarídeos de algas marinhas. 162 p. **Tese (Doutorado em Ciências – Bioquímica)** – Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

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

GORIN, P.A.J.; MAZUREK, M.; DUARTE, H. S.; IACOMINI, M.; DUARTE, J.H. Properties of <sup>13</sup>C-N.M.R. spectra of O-(1'-carboxyethylidene) derivatives of methyl β-D-galactopyranoside: models for determination of pyruvic acid acetal structures in polysaccharides. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 100, p. 1-15, 1982.

GROS, E. G.; MASTRONARDI, I. O.; FRASCA, A. R. Pmr spectral assignments for O-methyl groups in mono-methylated D-hexoses. **Carbohydrate Research**, v. 16, p. 232-234, 1971.

HARDEN. E.A.; FALSHAW. R.; CARNACHAN. S.M.; KERN. E.R.; PRICHARD M.N. Virucidal activity of polysaccharide extracts from four algal species against Herpes simplex virus. **Antiviral Research**, p. 282-289, 2009.



HIRASE, S. D.; ARAKI, C. Studies on the chemical constitution of agar-agar. XVI. Isolation of crystalline agarobiose diethylmercaptal by mercaptolysis of agar-agar. **Bulletin of the Chemical Society of Japan**, v. 27, p. 105-109, 1954.

HIRASE, S. Studies on the chemical constitution of agar-agar. 19. Pyruvic acid as a constituent of agar-agar. (1). Identification and estimation of pyruvic acid in the hydrolysate of agar. **Bulletin of The Chemical Society of Japan**, Tokyo, v. 30, p. 68-79, 1957.

HIRASE, S.; ARAKI, C.; WATANABE, K. Component sugars of the polysaccharide of the red seaweed *Grateloupia elliptica*. **Bulletin of The Chemical Society of Japan**, Tokyo, v. 40, p. 1445-1448, 1967.

IZUMI, K. Structural analysis of agar-type polysaccharides by NMR spectroscopy. **Biochimica Biophysica Acta.**, v. 320, p. 311-317, 1973.

JANSSON, P.E.; KENNE, L.; LIEDRGREN, H.; LINDEBERG, B.; LÖNNGREN, J. A practical guide to the methylation analysis of carbohydrates. **Chemical Communications**, London, v. 8, p. 1-71, 1976.

JOL. C. N.; NEISS, T. G.; PENNINKHOF, B.; RUDOLPH, B.; DE RUITER, G. A. Novel High-Performance Anion-Exchange Chromatographic Method for the Analysis of Carrageenans and Agars Containing 3,6-Anhydrogalactose. **Analytical Biochemistry**, v. 268, p. 213-222, 1999.

KLOAREG, B.; QUATRANO, R.S. Structure of the cell walls of marine algae and ecophysiological functions of matrix polysaccharides. **Oceanography and Marine Biology: An Annual Review**, Winchester, v. 26, p. 259-315, 1988.

KNUTSEN, S. H.; GRASDALEN, H. The use of neocarrabiose oligosaccharides with different length and sulphate substitution as model compounds for <sup>1</sup>H-NMR spectroscopy. **Carbohydrate Research**, v. 229, p. 233-244, 1992.

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

KNUTSEN, S. H.; SLETMOEN, M.; KRISTENSEN, T.; BARBEYRON, T.; KLOAREG, B.; POTIN, P., A rapid method for the separation and analysis of carrageenan oligosaccharides released by iota- and kappa-carrageenase. **Carbohydrate Research**, v. 315, p.101-106, 2001.

KOLENDER, A. A.; MATULEWICZ, M. C. Desulfation of sulfated galactans with chlorotrimethylsilane. Characterization of  $\beta$ -carrageenan by  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy. **Carbohydrate Research**, v. 339, p. 1619-1629, 2004.

LAGROTA, M. H. C. Atividade antiviral *in vitro* de substâncias sintéticas e naturais. **Dissertação de Mestrado**, UFRJ, Rio de Janeiro, 1978.

LAHAYE, M.; YAPHE, W.; ROCHAS, C.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectral analysis of sulfated and desulfated polysaccharides of the agar type. **Carbohydrate Research**, v. 143, p. 240-245, 1985.

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

LEONTEIN, K.; LINDBERG, B.; LÖNNGREN, J. Assignment of absolute configuration of sugars by GLC of their acetylated glycosides formed from chiral alcohols. **Carbohydrate Research**, v. 62, p. 359-362, 1978.

LIAO, M.-L.; KRAFT, G.-T.; MUNRO, S.-L. A.; CRAIK, D.-J.; BACIC, A. Beta/kappa-carrageenans as evidence for continued separation of the families Dicranemataceae and Sarcodiaceae (Gigartinales, Rhodophyta). **Journal of Phycology**, v. 29, p. 833-844, 1993.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A. L.; RANDALL, K.L. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 193, p. 265, 1951.

MARKOULATOS, P.; GEORGOPOULOU, A.; SIAFAKAS, N.; PLAKOKEFALOS, E.; TZANAKAKI, G.; KOUREA-KREMASTINO, J. Laboratory diagnosis of common herpes virus infections of the central nervous system by a multiplex PCR assay. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, p. 4426-4432, 2001.

MATULEWICZ, M. C.; CIANCIA, M.; NOSEDA, M. D.; CERESO, A. S. Methylation analysis of carrageenans from tetrasporic and cystocarpic stages of *Gigartina skottsbergii*. **Phytochemistry**, v. 29, p. 3407-3410, 1990.

MATULEWICZ, M. C.; CIANCIA, M.; NOSEDA, M. D.; CERESO, A. S. Methylation analysis of carrageenans from tetrasporic and cystocarpic stages of *Gigartina skottsbergii*. **Phytochemistry**, v. 29, p. 3407-3410, 1990.

McHUGH, D. J. A guide to the seaweed industry: **FAO fisheries technical paper**, n. 441, p. 1-72, Rome: FAO, 2003.

MILLER, I. J.; BLUNT, J. W. New  $^{13}\text{C}$  NMR methods for determining the structure of algal polysaccharides. Part 3. The structure of the polysaccharide from *Cladhymenia oblongifolia*. **Botanica Marina**, Berlin, v. 43, p. 263-271, 2000.

MILLER, I. J.; FALSHAW, R.; FURNEAUX, R.H. Structural analysis of the polysaccharide from *Pachymenia lusoria* (Cryptonemiaceae, Rhodophyta), **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 268, p. 219-232, 1995.

MILLER, I.J. Evaluation of the structures of polysaccharides from two New Zealand members of the Rhodomelaceae by  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopy. **Botanica Marina**, Berlin, v. 46, p. 386-391, 2003.

MULLOY, B. The specificity of interactions between proteins and sulfated polysaccharides, **Annals of the Brazilian Academy of Sciences**, v. 77, p. 651-664, 2005.

MURANO, E.; TOFFANIN, R.; ZANETTI, F.; KNUTSEN, S.H.; PAOLETTI, S.; RIZZO, R. Chemical and macromolecular characterization of agar polymers from *Gracilaria dura* (C. Agardh) J. Agardh (Gracilariaceae, Rhodophyta). **Carbohydrate Polymers**, v. 18, p. 171-178, 1992.

NAGASAWA, K.; INOUE, Y.; TOKUYASU, T. An improved method for the preparation of the chondroitin by solvolytic desulfation of chondroitin sulfates. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 86, p. 1323-1327, 1979.

NAVARRO, D. A. e STORTZ, C. A. Determination of the configuration of 3,6-anhydrogalactose and cyclizable  $\alpha$ -galactose 6-sulfate units in red seaweed galactans. **Carbohydrate Research**, v. 338, p. 2111-2118, 2003.

NAVARRO, D. A.; STORTZ, C. A. The system of xylogalactans from the red seaweed *Jania rubens* (Corallinales, Rhodophyta). **Carbohydrate Research**, v. 343, p. 2613-2622, 2008.

NEEDS, P. W.; SELVENDRAN, R. R. A critical assessment of a one-tube procedure for the linkage analysis of polysaccharides as partially methylated alditol acetates. **Carbohydrate Research**, v. 254, p. 229-244, 1994.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger: Princípios de Bioquímica**. 3 ed. Sarvier, São Paulo, 2002.

NELSON, W.A.; KNIGHT, G.A.; FALSHAW, R.; FURNEAUX, R.H.; FALSHAW, A.; LYND, S.M. Characterization of the enigmatic, endemic red alga *Gelidium allanii* (Gelidiales) from northern New Zealand-morphology, distribution, agar chemistry. **Journal of Applied Phycology**, v. 6, p. 497-507, 1994.

NEYNDORFF, H. C.; BARTEL, D. L.; TUFARO, F.; LEVY, J. G. Development of a model to demonstrate photosensitizer-mediated viral inactivation in blood. **Transfusion**, v. 30, p. 485-490, 1990.

NISHIMURA, T.; TOKU, K.; FUKUYASU, H. Antiviral compounds. XII. Antiviral activity of aminohydrazone of alkoxyphenyl substituted carbonyl compounds against influenza virus in eggs and mice, KITASATO Arch. **Experimental Medicine**, v. 50, p. 39-46, 1977.

NOSEDA, M. D.; CEREZO, A. S. Room temperature, low-field  $^{13}\text{C}$ -NMR spectra of degraded carrageenans: Part 3. Autohydrolysis of a lambda carrageenan and of its alkali-treated derivative. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 15, p. 177-181, 1993.

NOSEDA, M. D.; VIANA, A. G.; DUARTE, M. E. R.; CEREZO, A. S. Alkali modification of carrageenans. Part IV. Porphyrans as model compounds. **Carbohydrate Polymers**, v. 42, p. 301-305, 2000.

NOSEDA, M.D. Polissacarídeos sulfatados isolados da fase tetraesporofítica de *Gigartina skottsbergii* (Rhodophyta, Gigartinales). **Tese de doutorado**. Departamento de Bioquímica da UFPR, 180 pp., 1994.

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

NUNN, J.R.; PAROLIS, H. A polysaccharide from *Aeodes orbitosa*. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 8, p.1-11, 1968.

PAINTER, T. J. Algal Polysaccharides. In: ASPINALL, G. **The polysaccharides**, v. 2, p. 195-285, 1983.

PAREKH, R. G.; DOSHI, Y. A.; CHAUHAN, V. D. Polysaccharides from marine red algae *Acanthophora spicifera*, *Grateloupia indica* and *Halymenia porphyroides*. **Indian Journal of Marine Sciences**, v. 18, p. 139-140, 1989.

PENMAN, A.; REES, D. A. Carrageenans. Part XI. Mild oxidative hydrolysis of  $\kappa$  and  $\iota$ -carrageenans and the characterization of oligosaccharide sulphates. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1**, v.19, p. 2191-2196, 1973.

RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E. **Biologia Vegetal**. 6 ed. Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro, p. 344-366, 2001.

REED, L. J.; MUENCH, H. A simple method of estimating fifty percents endpoints. **American Journal of Hygiene**, v. 27, p. 493-497, 1938.

REES, D. A. The carrageenan system of polysaccharides. Part I. The relation between the *kappa* and the *lambda* components. **Journal of Chemical Society**, p. 1821-1832, 1963.

ROCHAS, C.; LAHAYE, M.; YAPHE, W.  $^{13}\text{C}$ -nmr spectroscopic investigation of agarose oligomers. **Carbohydrate Research**, v. 148, p. 199-207, 1986.

SAITO, R. M.; OLIVEIRA, E. C. Chemical screening of Brazilian marine algae producing carrageenans, **Hydrobiologia**, Bucharest, v. 204/205, p. 585-588, 1990.

SASSAKI, G.L.; GORIN, P.A.J.; SOUZA, L.M.; CZELUSNIAK, P.A.; IACOMINI, M. Rapid synthesis of partially O-methylated alditol acetate standards from GC-MS: some relative activities of hydroxyl groups of methyl glycopyranosides on Purdie methylation. **Carbohydrate Research**, v. 340, p. 731-739, 2005.

SAUNDERS, G.W.; KRAFT, G.T. Small-subunit rRNA gene sequences from representatives of selected families of the Gigartinales and Rhodymeniales (Rhodophyta). 2. Recognition of the Halymeniales ord. nov. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 74, p. 694-707, 1996.

SEN SR, A. K; DAS, A. K.; SARKAR, K. K.; SIDDHANTA A. K; TAKANO, R.; KAMA, K.; HANA, R. An agaroid-carrageenan hybrid type backbone structure for the antithrombotic sulfated polysaccharide from *Grateloupia indica* Boergensen (Halymeniales, Rhodophyta). **Botanica Marina**, Berlin, v. 45, p. 331-338, 2002.

ŠIMKOVIĆ, I. What could be greener than composites made from polysaccharides? **Carbohydrate Polymers**, v. 74, p. 759-762, 2008.

SOLOMONS, G.; FRYHLE, C. **Química Orgânica**. 7 ed, v. 1 e 2. LTC Editora S.A., Rio de Janeiro, 2002.

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

STORTZ, C. A.; CEREZO, A. S. Novel findings in carrageenans, agaroids and "hybrid" red seaweed galactans. **Current Topics in Phytochemistry**, v. 4, p. 121-134, 2000.

TAKANO, R. Desulfation of Sulfated Carbohydrates. **Trends in Glycoscience and Glycotechnology**, v.14 (80), p. 343–351, 2002.

TAKANO, R.; HAYASHI, K.; HARA, S.; HIRASE, S. Funoran from red seaweed, *Gloiopeltis complanata*: polysaccharides with sulphated agarose structure and their precursor structure. **Carbohydrate Polymers**, Essex, v. 35, p. 81-87, 1998.

TAKANO, R.; HAYASHI, K.; HARA, S.; HIRASE, S. Funoran from the red seaweed, *Gloiopeltis complanata*: polysaccharides with sulphated agarose structure and their precursor structure. **Carbohydrate Polymers**, v. 27, p. 305-311, 1995.

TAKANO, R.; NOSE, Y.; HAYASHI, K.; HARA, S.; HIRASE, S. Agarose-carrageenan hybrid polysaccharide from *Lomentaria catenata*. **Phytochemistry**, v. 37, p. 1615-1619, 1994.

TALARICO, L. B.; ZIBETTI, R. G. M.; FARIA, P. C. S.; SCOLARO, L. A.; DUARTE, M. E. R.; NOSEDA, M. D.; PUJOL, C. A.; DAMONTE, E. B. Anti-herpes simplex virus activity of sulfated galactanas from the red seaweeds *Gymnogongrus griffithsiae* and *Cryptonemia crenulata*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 34, p. 63-71, 2004.

TALARICO, L. B.; DUARTE, M. E. R.; ZIBETTI, R. G. M.; NOSEDA, M. D.; DAMONTE, E. B. An Algal-Derived DL-Galactan Hybrid is an Efficient Preventing Agent for *in vitro* Dengue Virus Infection. **Planta Medica**, v. 73, p. 1464-1468, 2007.

TALARICO, L. B.; PUJOL, C. A.; ZIBETTI, R. G. M.; FARIA, P. C. S.; NOSEDA, M. D.; DUARTE, M. E. R.; DAMONTE, E. B. The antiviral activity of sulfated polysaccharides against dengue virus is dependent on virus serotype and host cell. **Antiviral Research**, v. 66, p. 103-110, 2005.

USOV, A. I. Structural analysis of red seaweed galactans of agar and carrageenan groups. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 12, p. 301-308, 1998.

USOV, A. I.; ELASHVILI, M., Polysaccharides from Algae. 51. Partial reductive hydrolysis of sulfated galactan from red alga *Laurencia coronopus* J. Ag. (Rhodophyta, Rhodomelaceae). **Russian Journal of Bioorganic Chemistry**, v. 23, p. 502-511, 1997.

USOV, A. I.; SHASHKOV, A. S. Polysaccharides of algae. 34. Detection of iota-carrageenan in *Phyllophora brodiaei* (Turn.) J. Ag. (Rhodophyta) using  $^{13}\text{C}$ -NMR spectroscopy. **Botanica Marina**, v. 28, p. 367-373, 1985.

USOV, A.I. NMR spectroscopy of red seaweed polysaccharides: agars, carrageenans and xylans. **Botanica Marina**, Berlin, v. 27, p. 189-202, 1984.

USOV, A.I. Sulfated polysaccharides of the red seaweeds. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 6, p. 9-23, 1992.

USOV, A.I.; ELASHVILI, Y.A. Polysaccharides of Algae: 44. Investigation of sulfated galactan from *Laurencia nipponica* Yamada (Rhodophyta, Rhodomelaceae) using partial reductive hydrolysis. **Botanica Marina**, Berlin, v. 34, p. 553-560, 1991.

USOV, A.I.; KLOCHKOVA, N.G. Polysaccharides of algae. 45. Polysaccharide composition of red seaweeds from Kamachatka coastal waters (Northwestern Pacific) studied by reductive hydrolysis of biomass. **Botanica Marina**, Berlin, v. 35, p. 371-378, 1992.

USOV, A.I.; YAROTSKII, S.V.; SHASHKOV, A.S.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectroscopy of red algal galactans. **Biopolymers**, New York, v. 19, p. 977, 1980.

VAN DE VELDE, F.; PEREIRA, L.; ROLLEMA, H. S. The revised NMR chemical shift data of carrageenans. **Carbohydrate Research**, v. 339, p. 2309-2313, 2004.

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

WITVROUW, M.; DE CLERCQ, E. Sulfated polysaccharides extracted from sea algae as potential antiviral drugs. **General Pharmacology**, v. 29, p. 497-511, 1997.

WONG, K.F.; CRAIGIE, J.C. Sulfohydrolase activity and carrageenan biosynthesis in *Chondrus crispus* (Rhodophyceae). **Plant Physiology**, v. 61, p. 663-666, 1978.

YOUNG, K. S.; BHATTACHARJEE, S. S.; YAPHE, W. Enzymic cleavage of the  $\alpha$ -linkages in agarose, to yield agaro-oligosaccharides. **Carbohydrate Research**, 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. **Carbohydrate Research**, v. 337, p. 433-440, 2002.

ZABLACKIS, E., PEREZ, J. A partially pyruvated carrageenan from Hawaiian *Grateloupia fillicina*. **Botanica Marina**, Berlin, v. 33, p. 273-276, 1990.

ZIBETTI, R. G. M. Determinação da estrutura química de polissacarídeos isolados de algas pertencentes à ordem Halymeniales (Rhodophyta). **Tese de Doutorado** Departamento de Bioquímica da UFPR, 2005.

ZIBETTI, R. G. M.; DUARTE, M. E. R.; NOSEDA, M. D.; COLODI, F. G.; DUCATTI, D. R. B.; FERREIRA, L. G.; CARDOSO, M. A., CEREZO, A. S. Galactans from *Cryptonemia* species. Part II: studies on the system of galactans of *Cryptonemia seminervis* (Halymeniales) and on the structure of major fractions. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 344, p. 2364-2374, 2009.

ZIBETTI, R.G.M.; NOSEDA, M.D.; CEREZO, A.S.; DUARTE, M.E.R. The system of galactans from *Cryptonemia crenulata* (Halymeniaceae, Halymeniales) and structure of two major fractions. Kinetic studies on the alkaline cyclization of the unusual diad G2S  $\rightarrow$  D(L)6S. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 340, p. 711-722, 2005.