

ADRIANO GONÇALVES VIANA

ESTUDO DOS CARBOIDRATOS DA ALGA VERMELHA
Porphyra spiralis var *amplifolia* Oliveira Filho e Coll:
(BANGIALES, RHODOPHYTA)

Trabalho de Monografia apresentado a
Coordenação do Curso de Biologia como
requisito final para obtenção do grau de
Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Miguel Daniel Nosedá
Co-orientador: Prof.^a Madalena Shirata

Curitiba
1999

AGRADECIMENTOS

A minha mãe Janira e meus irmãos Cristina e Luís;

À Miguel e Maria Eugênia, pela orientação nesse trabalho e pelos ensinamentos e paciência durante esses três anos de convívio;

À Prof^a Madalena Shirata pela ajuda na identificação dos exemplares;

Aos amigos de laboratório com os quais tenho ou tive o prazer de conviver nesses três anos: Marco, Diogo, Fabíola, Siumara, Gladis Anne, Carla, Priscila, Milene e Fláviapor terem tornado o ambiente de trabalho muito divertido e por muito me ajudarem;

Ao amigo Jean Patrik, agradeço por me ajudar a compreender os “mecanismos” que regem a química;

À Silvia, minha irmãzinha do coração;

Aos amigos e colegas do departamento: Gisele, Luciane, Fabíola, Ana Paula, Angela, Andréia (pelas análises de GLC), Juan (pela análises de GPC e assessoria técnica), Ana e Fernanda, Juliana, Renato, Guilherme, César, Selene, Cíntia, Patrícias, Fabiana, Elaine, Rodrigo, João e Thiago;

À Eliana e Selma por terem aceito prontamente integrarem a minha banca de monografia, muito obrigado;

Aos bons professores que tive na graduação, que me ensinaram, sobretudo, a como ser um bom profissional da área de biologia;

Aos queridos amigos da graduação: Carolina, Luciano e Lilian (ainda continuaremos unidos, e que venha o mestrado!!!!); Flávia e Larissa, Eloisa (e nossa amizade “gangorra”), Gustavo, Paula, Andréa e Luciana, pela certeza de que a nossa amizade não termina com a graduação.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	iii
LISTA DE TABELAS.....	v
LISTA DE ABREVIATURAS.....	v
RESUMO.....	vi
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. ALGAS E SUA IMPORTÂNCIA ECONÔMICA.....	1
1.2 OS CARBOIDRATOS DE BAIXA MASSA MOLECULAR.....	2
1.3 AS GALACTANAS SULFATADAS.....	3
2. OBJETIVOS.....	9
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	10
3.1.MATERIAL.....	10
3.2. EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS E CARBOIDRATOS DE BAIXA MASSA MOLECULAR	10
3.3 PURIFICAÇÃO DOS CARBOIDRATOS DE BAIXA MASSA MOLECULAR.....	11
3.4 ESTUDO DAS PORFIRANAS SULFATADAS DE ALGAS VERMELHAS.....	12
3.4.1 TRATAMENTO ALCALINO.....	12
3.4.2 HIDRÓLISE ÁCIDA TOTAL DO TIPO HIDRÓLISE REDUTIVA.....	12
3.4.3 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE GRUPOS SULFATO.....	12

3.4.4 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS.....	13
3.4.4.1 CROMATOGRAFIA LÍQUIDO-GASOSA (GLC)	13
3.4.4.2 CROMATOGRAFIA DE GEL PERMEAÇÃO (GPC) – ANÁLISE DE HOMOGENEIDADE E MASSA MOLECULAR.....	13
3.4.5 MÉTODO ESPECTROSCÓPICO - RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE ¹³ C (RMN de ¹³ C).....	15
3.5 ESTUDO DOS CARBOIDRATOS DE BAIXA MASSA MOLECULAR.....	15
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	16
4.1 OBTENÇÃO DO MATERIAL.....	16
4.2 EXTRAÇÃO E ESTUDO DOS CARBOIDRATOS DE BAIXA MASSA MOLECULAR (CBM).....	18
4.3 EXTRAÇÃO E ESTUDO DOS POLISSACARÍDEOS.....	23
5. CONCLUSÃO.....	38
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	39

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1: Estrutura química dos florideosídeos [α -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 2)-D-glicerol], Isoflorideosídeos com configuração 'D' [α -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 1)-D-glicerol] e 'L' [α -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 1)-L-glicerol] e digeneasídeo [α -D-manopiranosil-(1 \rightarrow 2)-D-glicerato] os carboidratos de baixo peso molecular presentes nas algas pertencentes a divisão Rhodophyta.....3
- FIGURA 2: Estrutura apresentada pelos polialcoois D-manitol, D-sorbitol e D-dulcitol encontrados em diferentes grupos de algas vermelhas.....4.
- FIGURA 3: Reação de ciclização em galactanas do tipo ágar: transformação das unidades de α -L-galactose 6-sulfato (1C_4) em 3,6-anidro- α -L-galactose (4C_1), em meio alcalino.....6
- FIGURA 4: Alga *Porphyra spiralis* var. *amplifolia* Filho & Coll.....17
- FIGURA 5: Fluxograma da extração e fracionamento dos carboidratos de baixa massa molecular extraídos da alga *Porphyra spiralis* var. *amplifolia* Filho & Coll.....20
- FIGURA 6: Espectro de RMN de ^{13}C das frações CBP-I, CBP-I-H₂O, CBP-I-25, CBP-I-50 e CBP-I-100, obtidas a partir do sobrenadante etanólico resultante da extração a frio, mostrando a presença de acetato de potássio nas frações CBP-I e CBP-I-H₂O e de carboidratos de baixa massa molecular na fração CBP-I-25.....21
- FIGURA 7: Espectro de RMN de ^{13}C da fração CBP-I-25 mostrando a ocorrência dos heterosídeos: D-isoflorideosídeo, L-isoflorideosídeo e florideosídeo.....22
- FIGURA 8: Extração dos polissacarídeos extraídos da alga *Porphyra spiralis* var. *amplifolia* Filho & Coll.....24
- FIGURA 9: Alteração química e estrutural das porfiranas constituintes da fração SHW como decorrência do tratamento alcalino: mudança da unidade de galactose 6-sulfato para 3,6-anidrogalactose.....25

FIGURA 10: Análise por ressonância magnética nuclear de carbono 13 (RMN de ^{13}C) das frações SCW, SHW e SAE, mostrando na região correspondente ao carbono anomérico do espectro (110 – 90 ppm) os sinais para cada unidade monossacarídica presente nestas galactanas sulfatadas.....29

FIGURA 11: Espectro de RMN de ^{13}C das frações modificadas por tratamento alcalino (NaOH 1M, 3 h a 80°C), mostrando a ocorrência apenas dos sinais correspondentes aos C-1 das unidades de β -D-galactose ou 6-O-metil β -D-galactose substituídas glicosidicamente em C-1 e C-3 por 3,6-anidro- α -L-galactose e das unidades de 3,6-anidro- α -L-galactose.....31

FIGURA 12: Espectro de RMN de ^{13}C da fração SHW_{m3}, mostrando a ocorrência apenas dos sinais correspondentes aos C-1 das unidades de β -D-galactose ou 6-O-metil β -D-galactose e de 3,6-anidro- α -L-galactose, comparada ao espectro da fração PC75_{m3}, obtida a partir da alga *P. columbina* Montagne (NOSEDA *et al.*, in press), mostrando a alta similaridade entre os polissacarídeos biossintetizados por ambas as algas.....32

FIGURA 13: Estrutura apresentada pelos polissacarídeos extraídos da alga *Porphyra spiralis* var. *amplifolia* presentes nas frações SCW, SHW e SAE.....34

FIGURA 14: Perfil cromatográfico apresentado pelas frações SCW, SHW e SAE, mediante análise de homogeneidade por GPC, indicando ocorrência de fragmentos moleculares na primeira e última fração.....35

FIGURA 15: Perfil de caráter crescente apresentado pela fração SHW, mostrando que nesta fração se encontram presentes polímeros de alta massa molecular.....36

FIGURA 16: Perfil comparativo das massas moleculares cumulativas das porfiranas presentes nas frações SCW, SHW e SAE, obtido mediante análise por GPC.....37

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Composição monossacarídica das frações SCW, SHW e SAE determinada por CLG na forma de alditóis acetatos, em mol%.....23

TABELA 2: Composição monossacarídica das frações nativas e modificadas por tratamento alcalino, determinada por CLG na forma de alditóis acetatos, em mol%.....26

TABELA 3: Sinais correspondentes aos carbonos anoméricos (C-1) dos monossacarídeos presentes nas galactanas sulfatadas das frações SCW, SHW e SAE, por ressonância magnética nuclear de carbono 13 (RMN de ^{13}C) - NOSEDA *et al.*, in press -28

LISTA DE ABREVIATURAS

CBM Carboidratos de Baixa Massa Molecular

GLC Gas-Liquid Chromatography (Cromatografia Líquido-Gasosa)

GPC Gel Permeation Chromatography (Cromatografia de Gel Permeação)

HPSEC - MALLS High Pressure Steric Exclusion Columns - Multi Angle Laser Light Scattering

RMN de ^{13}C Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13

RESUMO

As algas vermelhas (Rhodophyta) caracterizam-se por biossintetizarem polissacarídeos, que apresentam altos teores de unidades de galactose que se arranjam em uma estrutura basicamente repetitiva, como agares e carragenanas, e carboidratos de baixa massa molecular (CBM), heterosídeos de galactose e glicerol. A alga *Porphyra spiralis* var. *amplifolia* foi submetida a extrações: aquosa, a temperatura ambiente e à 80°C (1,5 p/v) e alcalina (KOH 4M, temperatura ambiente), os extratos obtidos foram precipitados com 3 volumes de etanol e acetato de potássio, originando frações polissacarídicas denominadas SCW (5,1% de rendimento), SHW (13%) e SAE (6,4%), respectivamente. O sobrenadante etanólico resultante da precipitação do extrato aquoso a frio, foi concentrado e liofilizado resultando na fração CBP-I, a qual continha os CBM. Após fracionamento em filtro de carvão/celite (1:1), utilizando como eluente água e etanol (25, 50 e 100%), obteve-se 4 sub-frações denominadas: CBP-I-H₂O, CBP-I-25, CBP-I-50 e CBP-I-100. Quando analisadas por RMN de ¹³C verificou-se a presença de heterosídeos somente na fração CBP-I-25, sendo D-isoflorideosídeo o predominante. As frações polissacarídicas foram analisadas por HPSEC - MALLS e se mostraram praticamente homogêneas, cujos polissacarídeos majoritários apresentaram massas moleculares crescentes (387.000; 613.400; e 716.500 respectivamente). Os espectros de RMN de ¹³C indicaram tratar-se de galactanas sulfatadas do tipo ágar. A composição monossacarídica das frações, determinada por tratamento alcalino, hidrólise redutiva e GLC, em mol% foi: β-D-galactose (SCW 36,3%; SHW 31,7% e SAE 40,9%), 6-O-metil-β-D-galactose (SCW 13,3%; SHW 15,9% e SAE 11,9%), 3,6-anidro-α-L-galactose (SCW 13,7%; SHW 13,2% e SAE 25,9%) e α-L-galactose 6-sulfato (SCW 36,7%; SHW 39,2% e SAE 21,3%).

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. ALGAS E SUA IMPORTÂNCIA ECONÔMICA

As macroalgas encontram-se agrupadas em três divisões: Chlorophyta (algas verdes), Rhodophyta (algas vermelhas) e Phaeophyta (algas pardas). Podem ser encontradas em alto mar e no litoral fixadas a substrato rochoso ou calcáreo. No ambiente marinho, o número de espécies de algas vermelhas é maior do que o das algas pardas e verdes juntas, sendo particularmente abundantes em águas tropicais quentes, podendo estar presentes também nas regiões mais frias do mundo. As algas vermelhas geralmente crescem presas a rochas ou sobre outras algas; existindo poucas espécies flutuantes e poucas formas unicelulares e coloniais. As paredes celulares da maioria das algas vermelhas incluem um componente interno rígido formado por microfibrilas, que pode ser celulose ou outro polissacarídeo com estrutura equivalente e uma matriz mucilaginosa, constituída por galactanas sulfatadas, tais como ágar ou carragenana. É esta matriz mucilaginosa que confere às algas vermelhas a flexibilidade e a textura escorregadia, características desse grupo. A maioria das algas vermelhas apresenta uma estrutura filamentosa, que cresce a partir de uma única célula apical que se divide sequencialmente em segmentos originando um eixo que, por sua vez, forma verticilos de ramos laterais. Poucos gêneros, como *Porphyra*, possuem células justapostas formando lâminas de uma ou duas camadas. A substância de reserva das algas vermelhas é o amido das florídeas, um polímero que se assemelha à fração amilopectina do amido verdadeiro e não à fração amilose, sendo portanto mais semelhante ao glicogênio do que ao amido (RAVEN *et al.*, 1996). Estas algas ainda biossintetizam carboidratos de baixo peso molecular e/ou polióis, os quais apresentam função de osmorregulação (KARSTEN *et al.*, 1996).

As algas apresentam importância econômica muito diversificada. Em muitos países orientais, como o Japão, as algas fazem parte da dieta alimentar. Apesar de não possuírem alto valor nutritivo como fonte de carboidratos porque o homem carece de enzimas necessárias para digerir a maioria das substâncias da parede celular, como a celulose e a

matriz intercelular, rica em polissacarídeos sulfatados, as algas marinhas fornecem sais, inúmeras vitaminas e elementos-traço importantes. O ágar, extraído da parede celular de algas vermelhas, é utilizado para fazer cápsulas que contêm vitaminas e drogas, assim como material de moldes dentários, base para cosméticos e meio de cultura para bactérias e outros microorganismos. A agarose purificada é o gel utilizado frequentemente em eletroforese, na experimentação bioquímica. O ágar também é utilizado na fabricação de gelatinas e sobremesas instantâneas e como conservante temporário para carnes e peixes nas regiões tropicais. A carragenina, também extraída da parede celular, é utilizada principalmente como estabilizador de emulsões tais como tintas, cosméticos e laticínios (RAVEN *et al.*, 1996).

1.2 OS CARBOIDRATOS DE BAIXA MASSA MOLECULAR

As macroalgas biossintetizam, além de polissacarídeos, carboidratos de baixa massa molecular (heterosídeos e digeneasídeos), polióis (manitol, dulcitol, sorbitol) e sacarose os quais em muitos casos podem representar os principais produtos fotossintéticos. Por exemplo as algas vermelhas, Rhodophyta, biossintetizam carboidratos de baixa massa molecular (florideosídeo, isoflorideosídeo, digeneasídeo) e polióis (sorbitol e dulcitol) enquanto que as algas verdes, Chlorophyta, e pardas, Phaeophyta, produzem principalmente sacarose e manitol, respectivamente - KARSTEN *et al.*, 1991.

Os carboidratos de baixa massa molecular (CBM) são principalmente heterosídeos de galactose e glicerol denominados: Florideosídeo [α -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 2)-D-glicerol] e Isoflorideosídeos de configuração 'D' [α -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 1)-D-glicerol] ou 'L' [α -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 1)-L-glicerol] (MENG *et al.*, 1987), produzidos por todas as ordens de Rhodophyta, exceto pela ordem Ceramiales, a qual produz digeneasídeo, o qual é formado por α -D-manopiranosil-(1 \rightarrow 2)-D-glicerato e se mostra restrito a este grupo (KIRST, 1980) - FIGURA 1. Tais CBM possuem atividade osmorreguladora, funcionando como osmólitos ou solutos compatíveis, tendo efeito estabilizante em enzimas, membranas e em estruturas de macromoléculas sob condições de hipersalinidade, mostrando-se acumulados no

citoplasma celular (KARSTEN *et al.*, 1991 e 1999).

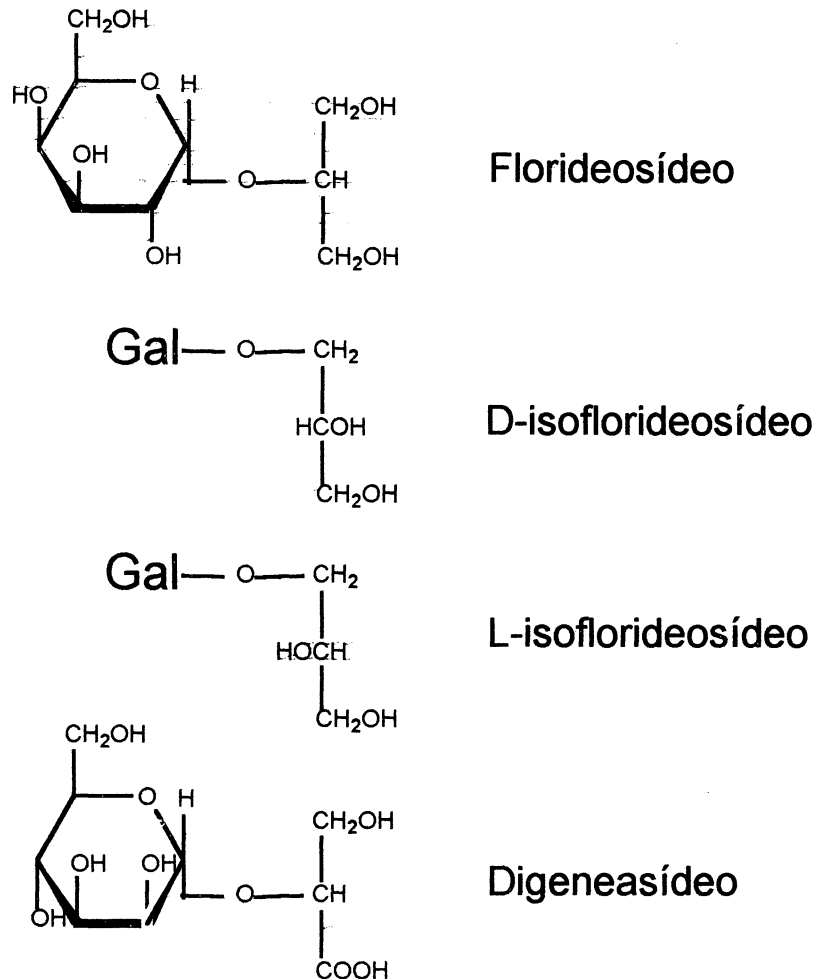


FIGURA 1: Estrutura química dos florideosídeos [α -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 2)-D-glicerol], Isoflorideosídeos de configuração 'D' [α -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 1)-D-glicerol] ou 'L' [α -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 1)-L-glicerol] e digeneasídeo [α -D-manopiranosil-(1 \rightarrow 2)-D-glicerato] os carboidratos de baixo peso molecular presentes nas algas pertencentes a divisão Rhodophyta.

Os polióis são formados a partir de unidades monossacarídicas reduzidas, constituindo dessa maneira poliálcoois de D-manose, D-glucose e D-galactose (D-manitol, D-sorbitol e D-dulcitol, respectivamente), possuindo como principal função a manutenção dos níveis das pressões osmótica e de turgor, embora este mecanismo ainda não seja conhecido -

FIGURA 2. A sacarose possui função estabilizadora em membranas após dessecação e osmorregulação (CROWE et al. 1987).

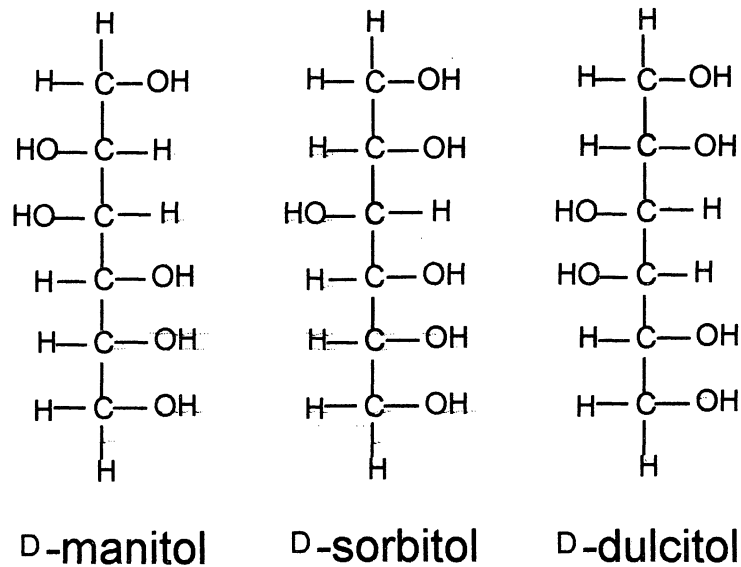


FIGURA 2: Estrutura apresentada pelos polialcoois D-manitol, D-sorbitol e D-dulcitol encontrados em diferentes grupos de algas varmelhas.

Os CBM são ainda muito úteis nas algas vermelhas como critério taxonômico e filogenético, quando associados a outros caracteres, tais como: morfologia, ultraestrutura, desenvolvimento e ciclo de vida, bem como biologia molecular.

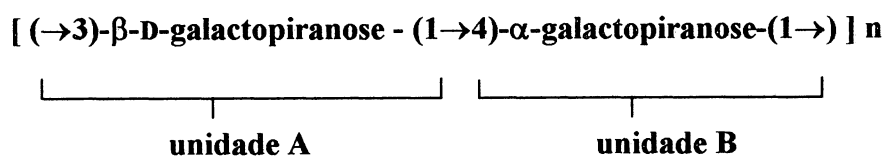
Em geral, para que um componente orgânico seja útil como marcador na sistemática é necessário que este seja específico de um certo taxon ou grupo de organismos e que seja suficientemente abundante para ser detectado e identificado com segurança. Desta maneira, os carboidratos de baixo peso molecular sintetizados durante a fotossíntese por diferentes algas têm sido considerados como um promissor caráter quimiotaxonômico. Por exemplo, o heterosídeo florideosídeo é considerado como sendo o principal produto fotossintético e de reserva em todas as ordens de Rhodophyta, exceto em Ceramiales, onde em geral, os membros deste grupo sintetizam e acumulam digeneasídeos. Membros da ordem Bangiales,

como *Porphyra* e *Bangia*, contém em adição aos florideosídeos as 2 formas isoméricas de iso-florideosídeo: D-iso-florideosídeo e L-iso-florideosídeo (KARSTEN *et al.*, 1993). Embora a distribuição destes diferentes glicosídeos em ordens de algas vermelhas tenha sido considerado como quimiotaxonomicamente útil, recentemente tem-se demonstrado que alguns gêneros de Ceramiales produzem e acumulam florideosídeos e não digeneasídeos. Outras exceções bioquímicas são relatadas em Bostrychioideae (Ceramiales, Rhodomelaceae), taxon caracterizado por sintetizar os polialcoois sorbitol e dulcitol, componentes não muito comuns em algas vermelhas e no gênero *Caloglossa* (Ceramiales, Delesseriaceae) onde o principal carboidrato de baixo peso molecular sintetizado é o manitol (KARSTEN *et al.*, 1999), componente este utilizado como marcador quimiotaxonômico de algas pardas.

Porphyra e *Bangia* são os únicos gêneros de macroalgas conhecidos que biossintetizam um ou ambas as formas isoméricas de florideosídeo manitol (KARSTEN *et al.*, 1999).

1.3 AS GALACTANAS SULFATADAS

As galactanas sulfatadas biossintetizadas pelas algas vermelhas (Divisão Rhodophyta), denominadas de ágar e carragenana apresentam uma estrutura repetitiva formada por:



podendo apresentar grupos substituintes (metil ou sulfato) em diferentes posições. O grupo das carragenanas caracteriza-se por apresentar, na unidade B, a configuração enantiomérica D-galactose, enquanto o grupo do ágar por apresentar L-galactose. Alguns polissacarídeos híbridos apresentam ambas as configurações enantioméricas (D- e L-galactose) na unidade B.

Porfirana, um sub-grupo dos agares, é o nome genérico dado aos principais

polissacarídeos biossintetizadas por algas dos gêneros *Porphyra* e *Bangia*. As porfiranas são galactanas sulfatadas estruturalmente semelhantes ao ágar, porém mais complexas, devido à ocorrência natural de radicais 6-metil-éter em algumas unidades de D-galactose e de 6-sulfato ou do anel 3,6-anidro em algumas unidades de L-galactose, desta maneira estes polissacarídeos não se apresentam como uma simples repetição de unidades (REES, *et al.* 1962; PAINTER, 1984).

Tais galactanas sulfatadas apresentam ainda o poder de formar géis e soluções viscosas, esta capacidade está diretamente relacionada com a conformação helicoidal em dupla hélice do polissacarídeo. Segundo REES (1969), as hélices se formam nas regiões do polissacarídeo onde se encontram seqüências dissacarídicas repetitivas, nas regiões sem nenhum tipo de regularidade a dupla hélice se interrompe permitindo a interação com outra cadeia polissacarídica, denominadas zonas de união, formando agregados que podem conter 1×10^4 hélices, como descrito por ARNOTT *et al.* (1974), em condições favoráveis, geralmente por resfriamento. A presença de unidades de 3,6-anidrogalactose são necessárias para a formação do gel, por esse motivo o tratamento alcalino potencializa o poder de geleificação do polissacarídeo.

O tratamento alcalino consiste num método artificial de obtenção de unidades monossacarídicas 3,6-anidrogalactose, a partir de unidades de galactose-6-sulfato precursoras presentes no polissacarídeo, por meio de uma reação de ciclização (FIGURA 3).

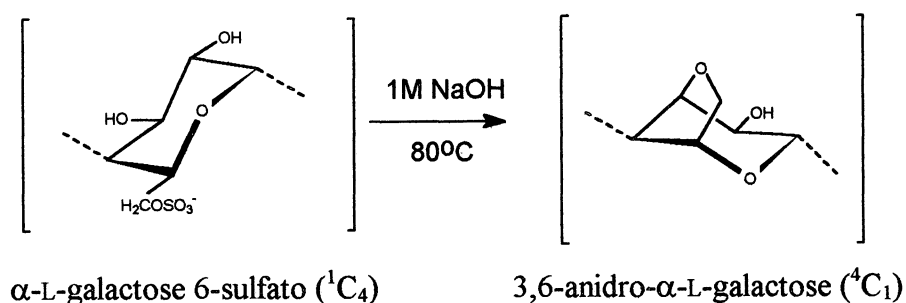


FIGURA 3: Reação de ciclização em galactanas do tipo ágar: transformação das unidades de $\alpha\text{-L-galactose 6-sulfato } (^1\text{C}_4)$ em 3,6-anidro- $\alpha\text{-L-galactose } (^4\text{C}_1)$, em meio alcalino.

O tratamento alcalino pode ainda ser utilizado laboratorialmente para se determinar quantitativamente as unidades de α -galactose 6-sulfato através da diferença na percentagem de sulfato presente na amostra antes e após o tratamento. A reação de ciclização ocorre sob alta temperatura (80°C) e na presença de álcali (NaOH 1M). Para impedir a degradação do polissacarídeo, reduz-se sua extremidade redutora com NaBH₄, um agente redutor estável em meio básico, antes e após a adição da base. A ciclização ocorre mediante a liberação do grupo sulfato, por um processo de eliminação, sob catálise básica e a concomitante formação do anel 3,6-anidro, mediante a perda de uma molécula de água. A eliminação é acompanhada por inversão da configuração do átomo de carbono ao qual estava unido (reação de substituição nucleofílica bimolecular, S_N2), ou seja, como resultado desta reação os resíduos de α -galactose passam de uma conformação ⁴C₁ para ¹C₄ em carragenanas (D-galactose) e de ¹C₄ para ⁴C₁ em ágar e porfiranas (L-galactose).

A troca da conformação, além de facilitar a ciclização por aproximar o oxigênio em C-3 e o sulfato em C-6, que passam a se encontrar em posições cis diaxiais favorecendo o ataque nucleofílico, também promove um aumento do poder geleificante do polissacarídeo como resultado da aquisição de uma conformação helicoidal da molécula. A reação somente ocorrerá com as unidades de α -galactose que possuírem sulfato no carbono 6 e que podem dar origem ao anel 3,6-anidro, estando sob controle da temperatura, concentração de álcali e do tempo de reação (CIANCIA, 1994).

As unidades de 3,6-anidrogactose então produzem uma importante alteração na estrutura da molécula como um todo, sendo denominadas de unidades de dobramento, sendo necessárias para a formação do gel. A geleificação se deve a formação de uma rede tridimensional, sendo necessária ainda a presença de cátions específicos, os quais neutralizam a repulsão entre as duplas hélices.

GUISELEY (1970) realizou estudos com diferentes tipos de ágares e determinou que a temperatura de geleificação de soluções de agarose 1,5% aumenta com o aumento de unidades de 6-O-metil galactose no polímero.

CRAIGIE *et al.* (1984), estudou diferentes espécies de algas pertencentes ao gênero *Gracilaria* e verificou que o melhor gel foi obtido a partir de tratamento alcalino de *G. sjoestedtii*. É interessante notar que o ágar tratado continha o menor nível de sulfatação e

6-*O*-metil galactose e o maior teor de 3,6-anidrogactose.

Assim o poder de geleificação apresentado por diferentes tipos de algas é uma consequência da composição monossacarídica da molécula, onde a força do gel é diretamente proporcional ao conteúdo de 3,6-anidrogactose e inversamente proporcional ao teor de galactose 6-sulfato. A presença de unidades de 6-*O*-metil galactose aumenta a temperatura de geleificação porém não afeta a força do gel (CRAIGIE *et al.*, 1984).

Desde que as algas vermelhas do gênero *Porphyra* são de grande rentabilidade na indústria alimentícia e seus carboidratos de baixo peso molecular (CBM) são utilizados como critério taxonômico, o presente trabalho de monografia refere-se ao estudo estrutural do principal componente da matriz extracelular (galactana sulfatada) e dos CBM biossintetizados pela alga *Porphyra spiralis* variedade *amplifolia*.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

O presente trabalho de monografia tem como objetivos:

- 1- Extração, purificação e caracterização dos carboidratos de baixa massa molecular (CBM) e dos polissacarídeos sulfatados (porfiranas) isolados da alga vermelha *Porphyra spiralis* var. *amplifolia* Filho & Coll.
- 2- Determinação da estrutura química fina utilizando métodos químicos e espectroscópios, dos CBM e polissacarídeos extraídos.

MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. MATERIAL

Neste trabalho estudou-se os polissacarídeos extraídos da alga vermelha *Porphyra spiralis*, variedade *amplifolia*:

Divisão: Rhodophyta

Classe: Rhodophyceae

Subclasse: Bangioideae

Ordem: Bangiales

Família: Bangiaceae

Gênero: *Porphyra*

Espécie: *Porphyra spiralis* var. *amplifolia* Filho & Coll.

Os exemplares da alga foram coletados na Ilha do Farol em Caiobá, no estado do Paraná, durante o mês de setembro de 1999. Após retirados do mar foram lavados com água corrente e desidratados à sombra.

3.2. EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS E CARBOIDRATOS DE BAIXO PESO MOLECULAR

A alga seca foi moída em moinho de faca e submetida à extração aquosa (1,5% p/v) sob agitação mecânica, à temperatura ambiente por 15 h, o extrato aquoso assim obtido foi centrifugado (12.000 rpm por 15 minutos), obtendo-se uma fração sobrenadante, e um precipitado, denominado de RESÍDUO-I.

Os polissacarídeos, presentes no extrato aquoso, foram precipitados mediante adição de etanol (3 volumes) e acetato de potássio, o extrato etanólico assim obtido foi centrifugado (12.000 rpm por 20 min.), o precipitado então originou a fração nativa SCW após ressolubilização, diálise e liofilização; enquanto que o sobrenadante etanólico

foi concentrado em rotaevaporador, originando a fração CBP-I, a qual continha os carboidratos de baixo peso molecular.

O RESÍDUO-I foi sequencialmente submetido à extração à quente (80°C) por 5 h. Seguindo os mesmos processos anteriormente descritos para obtenção da fração SCW, obteve-se a fração SHW e o RESÍDUO-II, o qual foi ainda submetido à extração alcalina (KOH 4M) durante 4 h. Novamente utilizando-se da mesma metodologia anteriormente descrita, obteve-se a fração SAE e o RESÍDUO-III, o qual foi reservado.

3.3 PURIFICAÇÃO DOS CARBOIDRATOS DE BAIXO PESO MOLECULAR

A fração CBP-I, a qual continha os carboidratos de baixo peso molecular, foi submetida à cromatografia de adsorção em filtro de carvão-celite (terra de infusórios), com a finalidade de remover os pigmentos (liberados da alga durante a extração), dessalinificar a fração (acetato de potássio utilizado na precipitação dos polissacarídeos) e finalmente fracioná-la. O filtro foi montado em funil com placa porosa, em 4 camadas: uma camada fina de celite, uma camada contendo mistura de carvão (20g) : celite (20g) proporção 1 : 1, uma camada contendo uma mistura da amostra (1,5g) com carvão:celite e por final uma última camada fina de celite sobre a qual colocou-se algodão. Utilizou-se como eluentes água destilada e etanol 25, 50 e 100%, os eluatos assim obtidos originaram 4 sub-frações: CBP-I-H₂O, CBP-I-25, CBP-I-50 e CBP-I-100 respectivamente, após concentrados em rotaevaporador e liofilizados (WHISTLER et al., 1950)

3.4 ESTUDO DAS PORFIRANAS SULFATADAS DE ALGAS VERMELHAS.

3.4.1 TRATAMENTO ALCALINO

Para obtenção de frações quimicamente modificadas: as frações SCW, SHW e SAE, foram solubilizadas em água destilada (0,2 g%), reduzidas com boroidreto de sódio (NaBH_4 - 10% em massa do polissacarídeo) por 16 h. Adicionando-se então hidróxido de sódio 3M (0,4 g%), concentração final 1M, novamente adicionou-se NaBH_4 (5% em massa). As soluções foram então mantidas a temperatura de 80°C em banho termostatizado por 3 horas (NOSEDA E CERREZO, 1995) para a obtenção de frações quimicamente modificadas, denominadas SCW_{m3}, SHW_{m3} e SAEm₃. As frações foram então neutralizadas, dializadas e liofilizadas.

3.4.2 HIDRÓLISE ÁCIDA TOTAL DO TIPO HIDRÓLISE REDUTIVA

As frações SCW, SHW e SAE foram submetidas a hidrólise ácida total de acordo com o método de STEVENSON E FURNEAUX (1991), a qual se processa em duas etapas, na primeira, utiliza-se ácido trifluoracético (TFA 3M) e 4-metil morfoline borane (agente redutor estável em meio ácido) a 80° C por 15 minutos para que ocorra redução das unidades de 3,6-anidro- α -L-galactopiranosose, protegendo-as da degradação em meio ácido; a segunda se dá a 120° C, nesta fase ocorre a redução das demais unidades constituintes do polissacarídeo. Uma vez reduzidas todas as unidades, as mesmas foram acetiladas com anidrido acético e TFA concentrado durante 15 minutos a 50° C, uma vez na forma de acetato de alditol seguiu-se então análise por cromatografia líquido gasosa (CLG).

3.4.3 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE GRUPOS SULFATO

O teor de sulfato das amostras foi determinado de acordo com o método gelatina- BaCl_2 (DODGSON, 1961), após hidrólise das amostras com HCl 1M (5h, 105°C), utilizando-se como padrão Na_2SO_4 (1mg/mL), as leituras fotocolorimétricas

foram realizadas em espectrofotometro a 360nm (limite de sensibilidade do método: 20-200 µg de sulfato) .

3.4.4 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

3.4.4.1 CROMATOGRAFIA LÍQUIDO-GASOSA (CLG)

As análises por cromatografia líquido-gasosa foram realizadas em Cromatógrafo Hewlett Packard 5890, com detector de ionização de chama (300°C) e injetor (250°C), utilizando nitrogênio como gás de arraste e coluna capilar de sílica fundida (30 m x 0,25 mm de d. i.), revestida com DB-225 (0,25 µm) em diferentes temperaturas: as análises cromatográficas para acetatos de alditol foram realizadas na temperatura de 220°C, utilizando-se padrões para galactose, 6-O-metil galactose e 3,6-anidro galactose.

3.4.4.2 CROMATOGRAFIA DE GEL PERMEAÇÃO (GPC - HPSEC-MALLS) – ANÁLISE DE HOMOGENEIDADE E MASSA MOLECULAR

Determinação da variação do índice de refração com relação à concentração (dn/dc): soluções de 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1,0 mg da amostra em 1 mL de NaNO₃ e azida de sódio de cada fração, foram previamente filtradas em membranas MILLIPORE 0,45 µm e armazenadas em frascos viais rigorosamente limpos. As análise foram realizadas utilizando-se injeções de 500 µL de cada solução em HPLC acoplado a detector de espalhamento de luz, com fluxo de 0,6 mL/min e pressão de 67 psi a 20°C.

Análise de homogeneidade e de determinação da massa molecular ponderal média (M_w): para a análise de homogeneidade preparou-se uma solução de 2 mg da amostra em 1 mL de nitrito de sódio (NaNO₃ 0,1M) e azida de sódio (200ppm) dissolvidas em água milliQ, previamente filtradas em membranas MILLIPORE (acetato de celulose) de 0,45 e 0,22 µm. A análise foi realizada utilizando-se injeções de 500 µL de solução em HPLC acoplado a detector de espalhamento de luz, com fluxo de 0,6 mL/min. Para a determinação da massa molecular ponderal média utilizou-se o valor de dn/dc anteriormente obtido juntamente à análise de homogeneidade.

As análises por GPC foram realizadas em cromatógrafo de exclusão estérica de alta pressão (HPSEC) WATERS, equipado com um detector de índice de refração 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. Foram utilizadas 4 colunas de gel permeação WATERS, com limites de exclusão de 1.10^6 , 4.10^5 , 8.10^4 e 5.10^3 , em série. O eluente utilizado foi uma solução de NaNO_3 $0,1\text{mol.L}^{-1}$ contendo NaN_3 200 ppm, pressão de 920 psi a 20°C .

Utilizou-se o programa ASTRA (WAYTT TECHNOLOGY), para analisar os dados obtidos. Para cada amostra pode se efetuar uma medida do espalhamento do feixe luminoso em função da concentração do polímero e em função do ângulo. A relação que permite calcular M_w é:

$$\frac{Kc(1+\cos^2\theta)}{\Delta R_\theta} = (1/M_w + 2A_2C + \dots)P^{-1}(\theta)$$

onde $K=(2\pi^2n^2/\lambda_0^4N)/(dn/dc)^2$

n = índice de refração do solvente no comprimento de onda λ_0

λ_0 = comprimento de onda da luz incidente

N = número de Avogadro

dn/dc = taxa de variação do índice de refração com a concentração

c = concentração do polímero

θ = ângulo do feixe de luz espalhado

A_2 = segundo coeficiente virial

$P(\theta)$ = função que leva em consideração as interferências entre as diferentes vibrações emitidas por uma mesma partícula

ΔR_θ = diferença entre o R_θ da solução e o R_θ do solvente

R_θ = fator de Rayleigh, calculado através da seguinte equação

$$R_\theta = \frac{G_\theta \cdot D}{G_0 \cdot \sigma' \cdot l'}$$

Onde G_0 é a intensidade relativa correspondente ao feixe espalhado, G_0 a intensidade relativa correspondente ao feixe incidente, D , σ' , l' são constantes do aparelho.

3.4.5 MÉTODO ESPECTROSCÓPICO - RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE CARBONO-13 (RMN - ^{13}C)

Os espectros de ressonância magnética nuclear de carbono-13 foram obtidos na frequência base de 100,16 Mhz, no espectroscópio da marca BRUKER, série Avance, modelo DRX 400. O intervalo de aquisição do sinal foi de 0,6 segundos tendo sido feitas, em média, 100K aquisições. Utilizou-se intervalo de 0,1 segundo entre os pulsos. As amostras foram dissolvidas em D_2O e colocadas em tubos de 5 mm e 10 mm de diâmetro para análise no espectroscópio à temperatura de 70°C . Os deslocamentos químicos, expressos em δ (ppm), foram determinados utilizando acetona como padrão interno ($\delta = 30,2$).

3.5 ESTUDO DOS CARBOIDRATOS DE BAIXO PESO MOLECULAR

Os carboidratos de baixo peso molecular foram caracterizados por ressonância magnética nuclear de ^{13}C (RMN de ^{13}C), seguindo o mesmo procedimento descrito para os polissacarídeos, utilizando padrões previamente purificados no laboratório e dados obtidos em bibliografia.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 OBTENÇÃO DO MATERIAL

Existem no litoral brasileiro três espécies de algas pertencentes ao gênero *Porphyra*: *P. roseana*, *P. acanthophora* e *P. spiralis* (FILHO & COLL, 1975). Todas são plantas que crescem em tufos multi-laminares, diferindo quanto a forma e tamanho destas lâminas. A espécie *P. roseana* é representada por plantas de tamanho reduzido (1-3 cm de altura) com lâminas sub-orbiculares, enquanto que as espécies *P. acanthophora* e *P. spiralis* representam plantas de tamanho superior (7-15 cm de altura), sendo estas morfologicamente muito semelhantes, o que dificulta a distinção entre elas. O critério morfológico de maior significância para a distinção entre estas duas espécies é a presença de microscópicos dentes marginais presentes na lâmina de *P. acanthophora*, os quais se mostram ausentes em *P. spiralis*. Ambas as espécies apresentam duas variedades cada: *P. acanthophora* variedade *acanthophora* e variedade *brasiliensis*; *P. spiralis* variedade *spiralis* e variedade *amplifolia*.

Segundo FILHO & COLL (1975), a espécie *Porphyra spiralis* apresenta ainda os seguintes caracteres morfológicos distintivos: plantas formando tufos, podendo atingir até 15 cm de altura, cujas lâminas, muito finas, apresentam-se retorcidas e com a margem pregueada, quando recentemente desidratadas possuem coloração violácea. Suas duas variedades *spiralis* e *amplifolia* são facilmente distinguíveis. *P. spiralis* variedade *spiralis* possui lâminas muito estreitas, torcidas, com margens fortemente pregueadas, atingindo até 7 cm de altura, enquanto que a variedade *amplifolia* possui lâminas não muito estreitas, com margem lisa ou ondulada, parcialmente divididas maiores e mais largas podendo atingir até 15 cm de altura.

Desta maneira dentre as algas coletadas na Ilha do Farol, em Caiobá, no estado do Paraná poderiam estar presentes ambas as algas *P. acanthophora* e *P. spiralis*, uma vez que ambas apresentam o mesmo habitat, se fixando a rochas expostas a maré. Assim o critério morfológico mais evidente e de maior facilidade de visualização escolhido para seleção dos exemplares a serem estudados neste trabalho foi o tamanho e forma das lâminas de *P. spiralis* variedade *amplifolia*, uma vez que para a realização da diferenciação entre *P.*

acanthophora e *P. spiralis* variedade *spiralis* seria necessário o uso de lupas para a visualização dos dentes laminares marginais, análise essa que necessitaria de muito tempo disponível, o qual não seria possível, por tratar-se deste trabalho uma dissertação de monografia. Assim estudou-se a alga pertencente a espécie *P. spiralis* variedade *amplifolia* (FIGURA 4).



FIGURA 4: Alga *Porphyra spiralis* var. *amplifolia* Oliveira Filho & Coll.

4.2 EXTRAÇÃO E ESTUDO DOS CARBOIDRATOS DE BAIXA MASSA MOLECULAR (CBM)

Após a extração à temperatura ambiente da alga seca e moída, o sobrenadante etanólico utilizado na precipitação dos polissacarídeos da fração SCW, foi concentrado e liofilizado, resultando na fração CBP-I, a qual continha os carboidratos de baixa massa molecular. Esta fração foi então submetida a uma cromatografia de adsorção em carvão-terra de infusórios, com a finalidade de remover-se os pigmentos e o sal acetato de potássio utilizado na precipitação dos polissacarídeos, resultando em 4 sub-frações denominadas de CBP-I-H₂O (eluída com H₂O destilada), CBP-I-25 (eluída com etanol 25%), CBP-I-50 e CBP-I-100 (eluídas com etanol 50 e 100%, respectivamente), como mostrado na FIGURA 5.

Todas as frações (CBP-I, CBP-I-H₂O, CBP-I-25, CBP-I-50 e CBP-I-100) foram submetidas a análise por RMN de ¹³C, com a finalidade de verificar-se quais carboidratos de baixo peso molecular eram biossintetizados por esta espécie de alga, heterosídeos, digeneasídeos ou polióis. A análise do espectro de RMN de ¹³C das frações CBP-I e CBP-I-H₂O indicaram somente a presença de sal (acetato de potássio), como indicam os sinais em 180,28 ppm e 23,48 ppm, correspondentes aos carbonos do grupo carboxílico e metílico, respectivamente. Na mesma análise para a fração CBP-I-25, verificou-se a presença de sinais atribuídos aos carboidratos de baixo peso molecular e a ausência dos sinais correspondentes ao sal acetato de potássio, indicando que este foi totalmente removido durante a eluição com água destilada. Os espectros para as frações CBP-I-50 e CBP-I-100 mostraram uma ausência total de sinais, com exceção daqueles referentes à acetona utilizada para calibrar o aparelho, indicando que todos os carboidratos foram eluídos com etanol 25% (FIGURA 6).

A análise do espectro de RMN de ¹³C em DEPT, da fração CBP-I-25, mostrou a presença de sinais característicos dos heterosídeos: D-isoflorideosídeo (98,706 ppm), L-isoflorideosídeo (98,342 ppm) e florideosídeo (97,973 ppm), correspondentes aos carbonos anoméricos das unidades de α-D-galactose (os demais sinais são atribuídos aos carbonos 2, 3, 4, 5 e 6 da galactose e aos carbonos 1, 2 e 3 do glicerol, como mostrado na FIGURA 7).

Esta análise mostrou ainda que nesta espécie, ocorre uma predominância do heterosídeo D-isoflorideosídeo em relação aos demais, ao contrário do que é observado para todas as outras espécies de algas pertencente ao mesmo gênero (*Porphyra*), as quais apresentam maiores teores de L-isoflorideosídeo como *P. columbina* (KARSTEN *et al.*, 1993 e 1999) e *P. lucasii* (KARSTEN *et al.*, 1999) ou maiores teores de florideosídeo como *P. dioica*, *P. leucosticta*, *P. perforata*, *P. saldanhae*, *P. umbilicales* e *P. yezoensis* (KARSTEN *et al.*, 1999).

KARSTEN *et al.* (1993) realizou estudos com os heterosídeos biossintetizados pela alga *P. columbina* Montagne, coletadas em diferentes épocas do ano e verificou uma variação sazonal nas suas concentrações, indicando que a biossíntese deste CBM sofrem influência ambiental. Assim a predominância do heterosídeo L-isoflorideosídeo em *P. spiralis* var. *amplifolia* pode ser um reflexo da condição ambiental a qual a alga estava sujeita na época em que foi coletada (setembro) e não uma característica intrínseca a esta espécie. Para confirmar este resultado, um acompanhamento sazonal dos CBM sintetizados por esta alga deveria ser feito, verificando desta maneira se são apenas momentâneos ou se o heterosídeo majoritário sempre o é durante o ano.

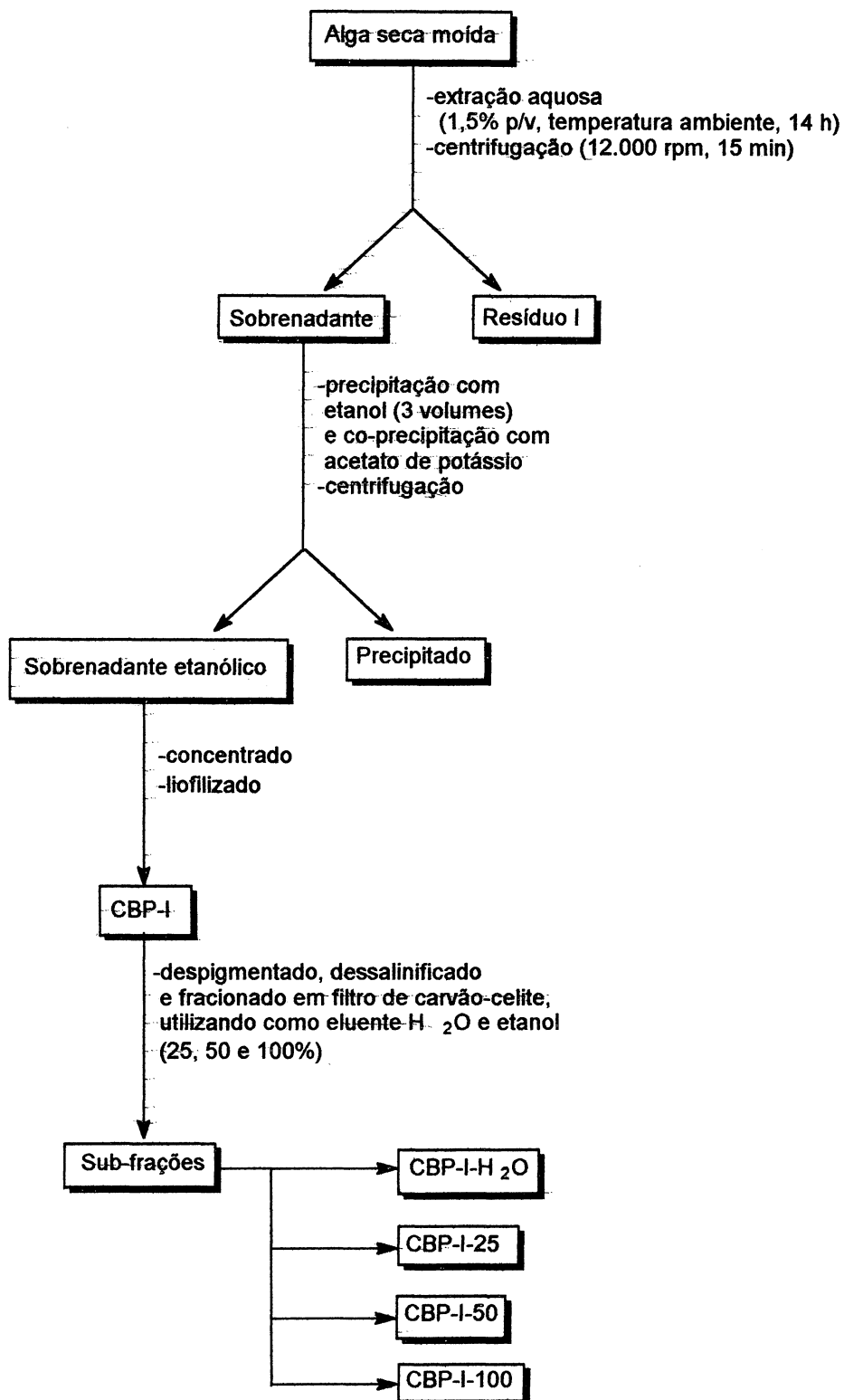
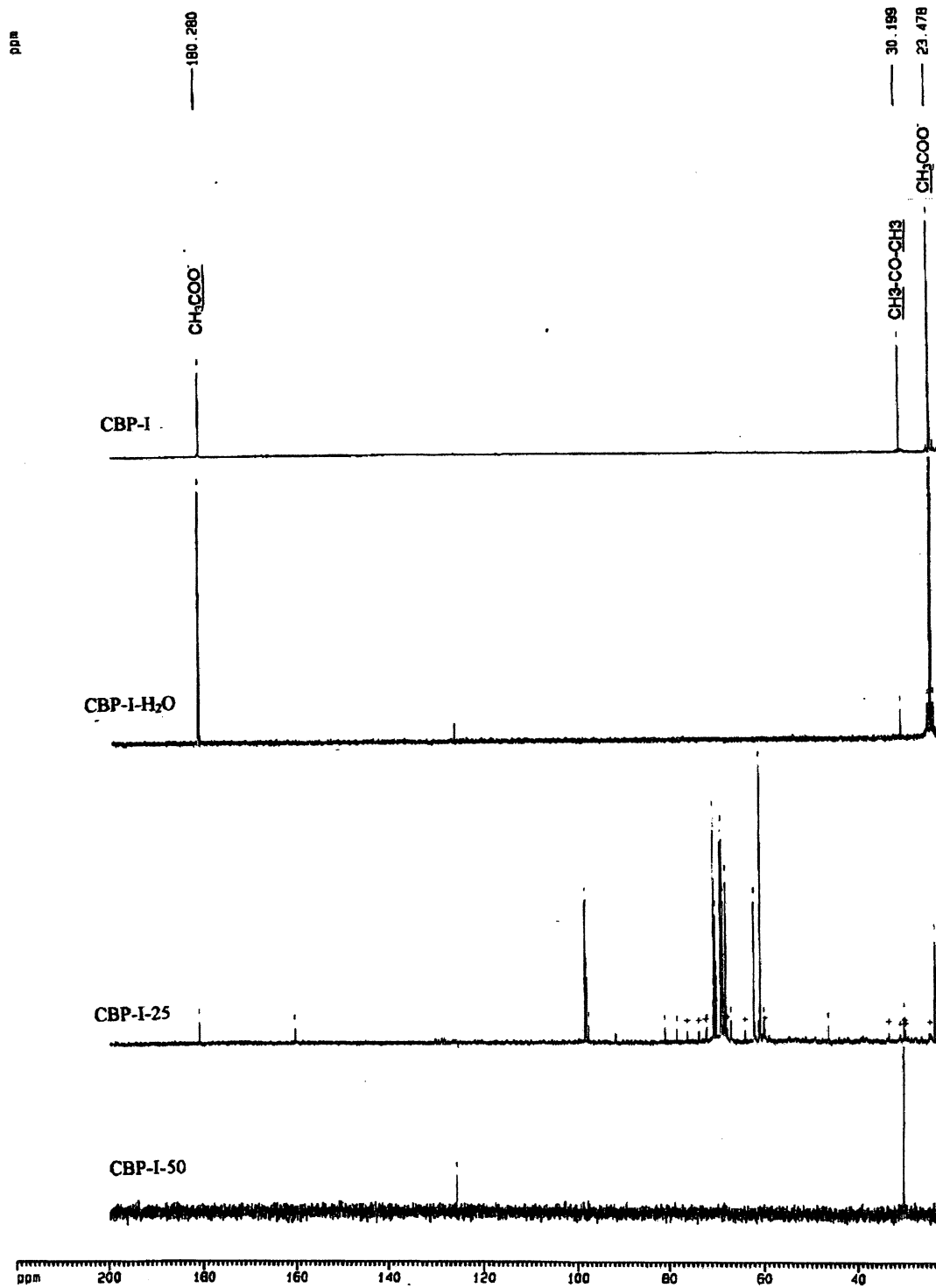
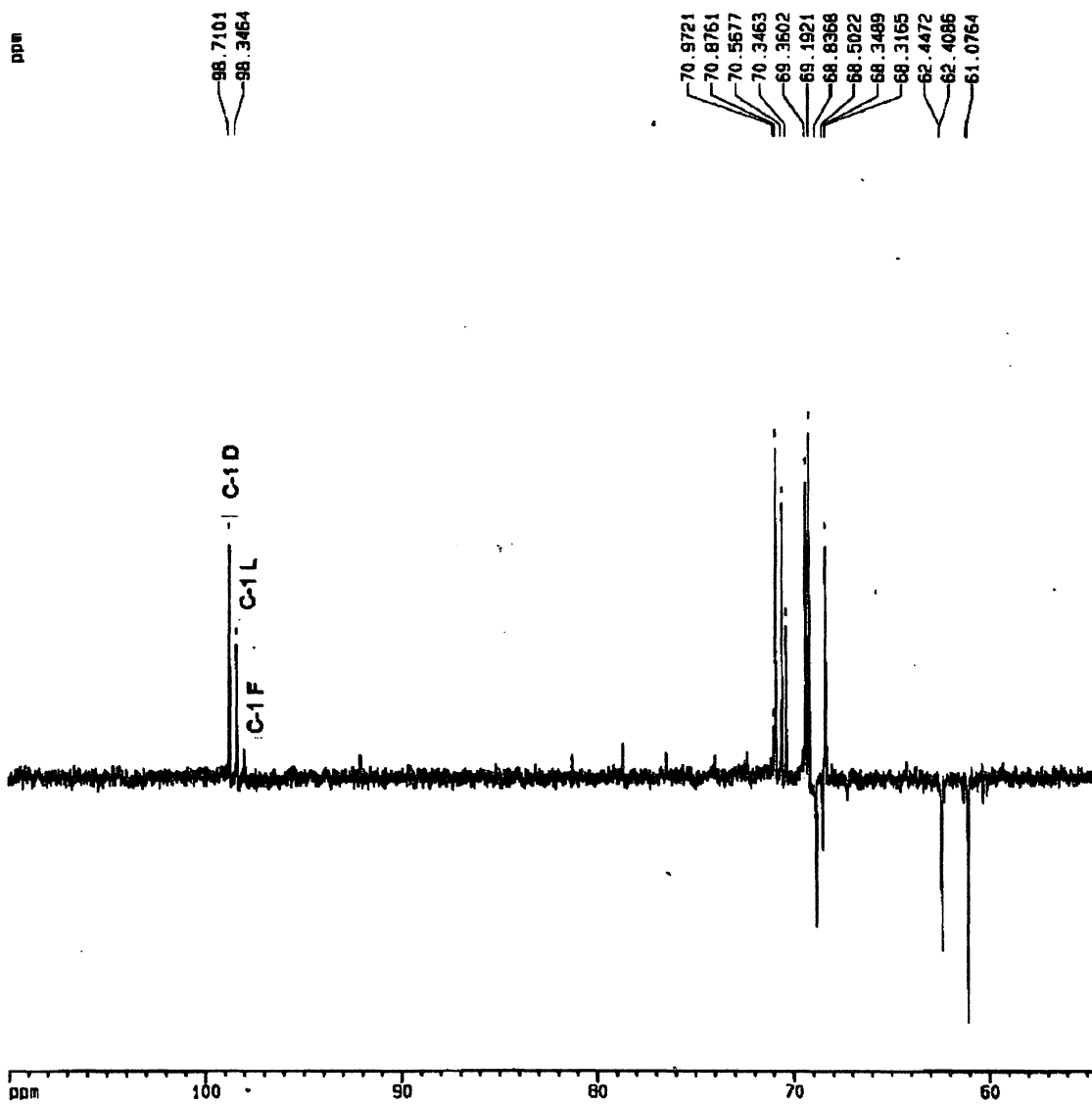


FIGURA 5: Fluxograma da extração e fracionamento dos carboidratos de baixa massa molecular extraídos da alga *Porphyra spiralis* var. *amplifolia* FILHO & COLL.



$\text{CH}_3\text{-COO}^-$ acetato de potássio
 $\text{CH}_3\text{-CO-CH}_3$ acetona

FIGURA 6: Espectro de RMN de ¹³C das frações CBP-I, CBP-I-H₂O, CBP-I-25, CBP-I-50 e CBP-I-100, obtidas a partir do sobrenadante etanólico resultante da extração a frio, mostrando a presença de acetato de potássio nas frações CBP-I e CBP-I-H₂O e de carboidratos de baixa massa molecular na fração CBP-I-25.



C-1 D carbono anomérico do heterosídeo D-isoflorideosídeo
 C-1 L carbono anomérico do heterosídeo L-isoflorideosídeo
 C-1 F carbono anomérico do heterosídeo Florideosídeo

FIGURA 7: Espectro de RMN de ^{13}C em DEPT da fração CBP-I-25 mostrando a ocorrência dos heterosídeos: D-isoflorideosídeo, L-isoflorideosídeo e florideosídeo.

4.3 EXTRAÇÃO E ESTUDO DOS POLISSACARÍDEOS

A partir da alga seca e moída obtiveram-se 3 frações, além daquela contendo os carboidratos de baixo peso molecular, denominada CBP-I, as frações SCW, SHW e SAE, com rendimentos de 5,1; 13,0 e 6,4 % respectivamente, contendo as porfirinas extraídas da matriz extracelular da alga *Porphyra spiralis* var. *amplifolia* (FIGURA 8).

Para a determinação da composição monossacarídica das frações SCW, SHW e SAE realizou-se hidrólise redutiva e acetilação, seguida de análise por cromatografia líquido gasosa (CLG), indicando que os polissacarídeos presentes nestas frações são polímeros de galactose (galactanas) constituídos unicamente por unidades de: 3,6-anidrogalactose (13,7; 13,2; 25,9), 6-*O*-metil galactose (13,3; 15,9; 11,9) e galactose (73,0; 70,9; 62,2 mol%) - TABELA 1.

TABELA 1: Composição monossacarídica das frações SCW, SHW e SAE determinada por CLG na forma de alditóis acetatos, em mol%.

Fração	Rendimento (%)	Monossacarídeos (mol%)		
		3,6-Angal ¹	6- <i>O</i> -Megal ²	Gal ³
SCW	5,1	13,7	13,3	73,0
SHW	13,0	13,2	15,9	70,9
SAE	6,4	25,9	11,9	62,2

¹3,6-anidrogalactose; ²6-*O*-metil galactose; ³galactose.

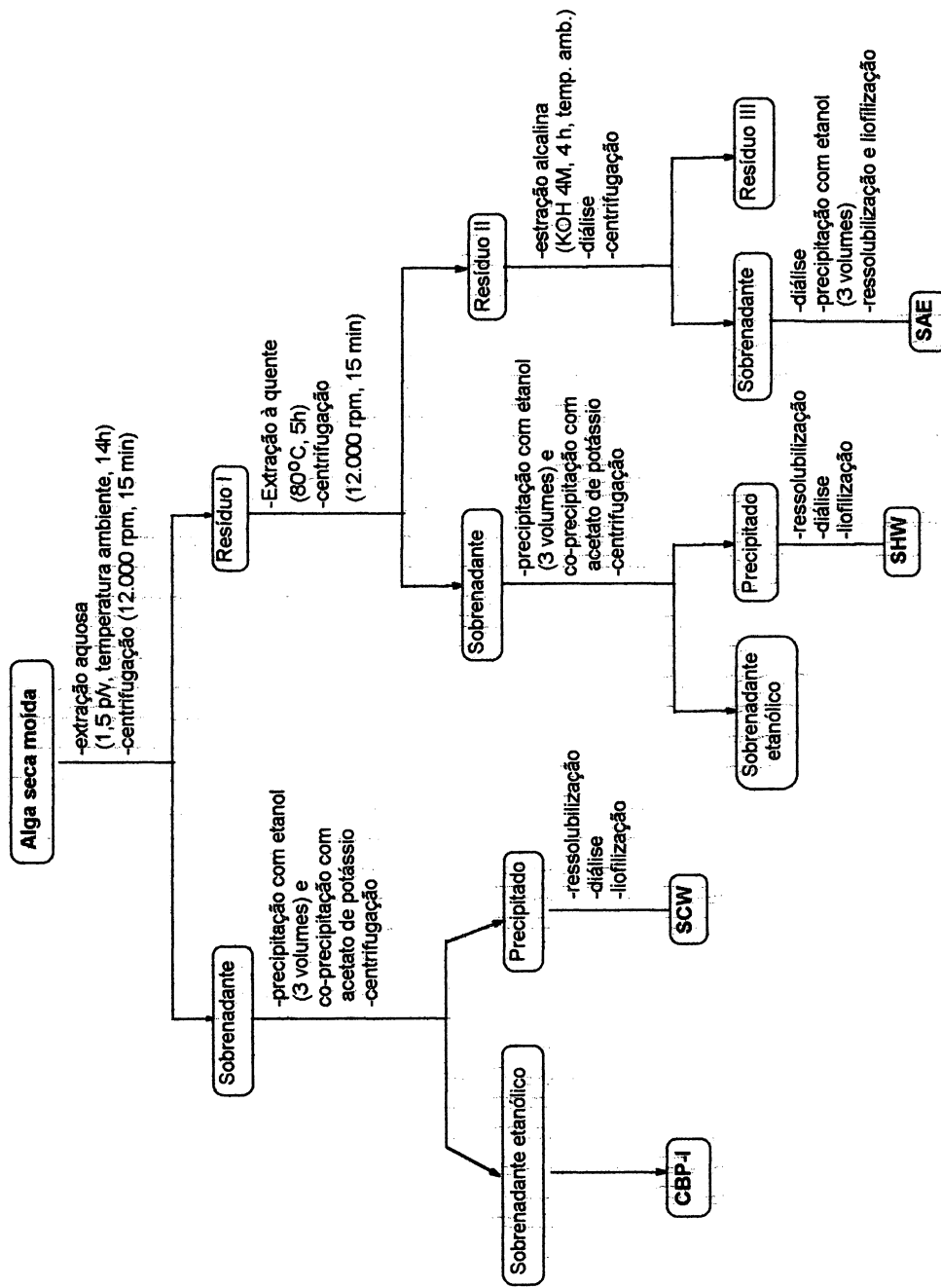


FIGURA 8: Extração dos polissacarídeos da alga *Porphyra spiralis* var. *ampifolia* Filho & Coll.

A presença de unidades de 3,6-anidrogalactose determinada por CLG, é um indicativo de que estas galactanas podem ser sulfatadas, isto é, conter ainda unidades de galactose substituídas por grupos sulfato em carbono 6 (C-6), galactose 6-sulfato, as quais não podem ser detectadas diretamente por CLG devido a perda do grupo sulfato durante a hidrólise do polissacarídeo sendo, desta maneira, incluídas na percentagem total de galactose.

Para comprovar a presença das referidas unidades de galactose 6-sulfato nas frações, as mesmas foram submetidas a tratamento alcalino (NaOH 1M, 3h, 80°C – FIGURA 9) resultando em frações quimicamente modificadas, denominadas de SCWm₃, SHWm₃ e \$AEm₃.

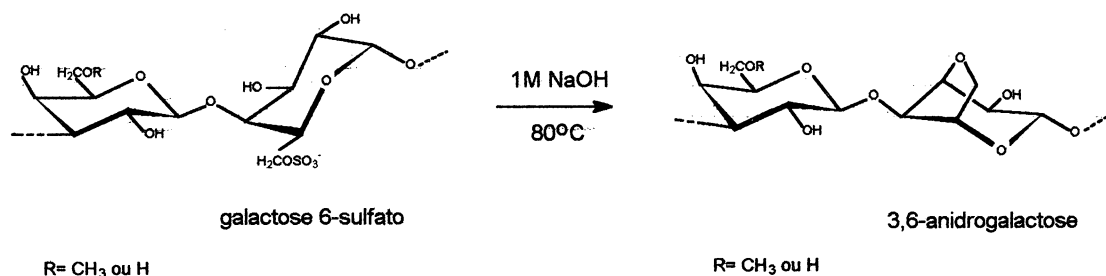


FIGURA 9: Alteração química e estrutural das porfiranas constituintes da fração SHW como decorrência do tratamento alcalino: mudança da unidade de galactose 6-sulfato para 3,6-anidrogalactose.

Analisadas por CLG, após hidrólise reductiva e acetilação, verificou-se uma redução no teor de galactose após tratamento alcalino e um concomitante aumento no teor de 3,6-anidrogactose em todas as frações, confirmando-se a presença de unidades de galactose naturalmente sulfatadas em C-6 nos polissacarídeos nativos, o teor total de grupos sulfato das frações nativas e modificadas também foi determinado de acordo com o método gelatina-bário (DODGSON, 1961) - TABELA 2. A fração SCW apresentou uma redução do teor sulfato de 22,06% na fração nativa para 5,8% na fração modificada (valores expressos como SO₃K), enquanto que as frações SHW e SAE apresentaram uma redução de 18,22 para 11,2% e de 29,5 para 6,1%, respectivamente. Nas frações modificadas quimicamente ainda detectou-se a presença de grupos sulfato, indicando presença de unidades de galactose 6-sulfato que não sofreram ciclização mediante tratamento alcalino ou a presença de grupos sulfato substituindo outras posições que não C-6.

TABELA 2: Composição monossacarídica das frações nativas e modificadas por tratamento alcalino, determinada por CLG na forma de alditóis acetatos, em mol%.

Fração	SO ₃ K (%)	Monossacarídeos (mol%)		
		3,6-Angal ¹	6-O-Megal ²	Gal ³
SCW	22,06	13,7	13,3	73,0
SCWm ₃ *	5,8	56,4	7,3	36,3
SHW	18,22	13,2	15,9	70,9
SHWm ₃	11,2	59,7	8,6	31,7
SAE	29,5	25,9	11,9	62,2
SAEm ₃	6,1	50,3	8,8	40,9

*fração modificada por tratamento alcalino (NaOH 1M, 80°C, 3h);

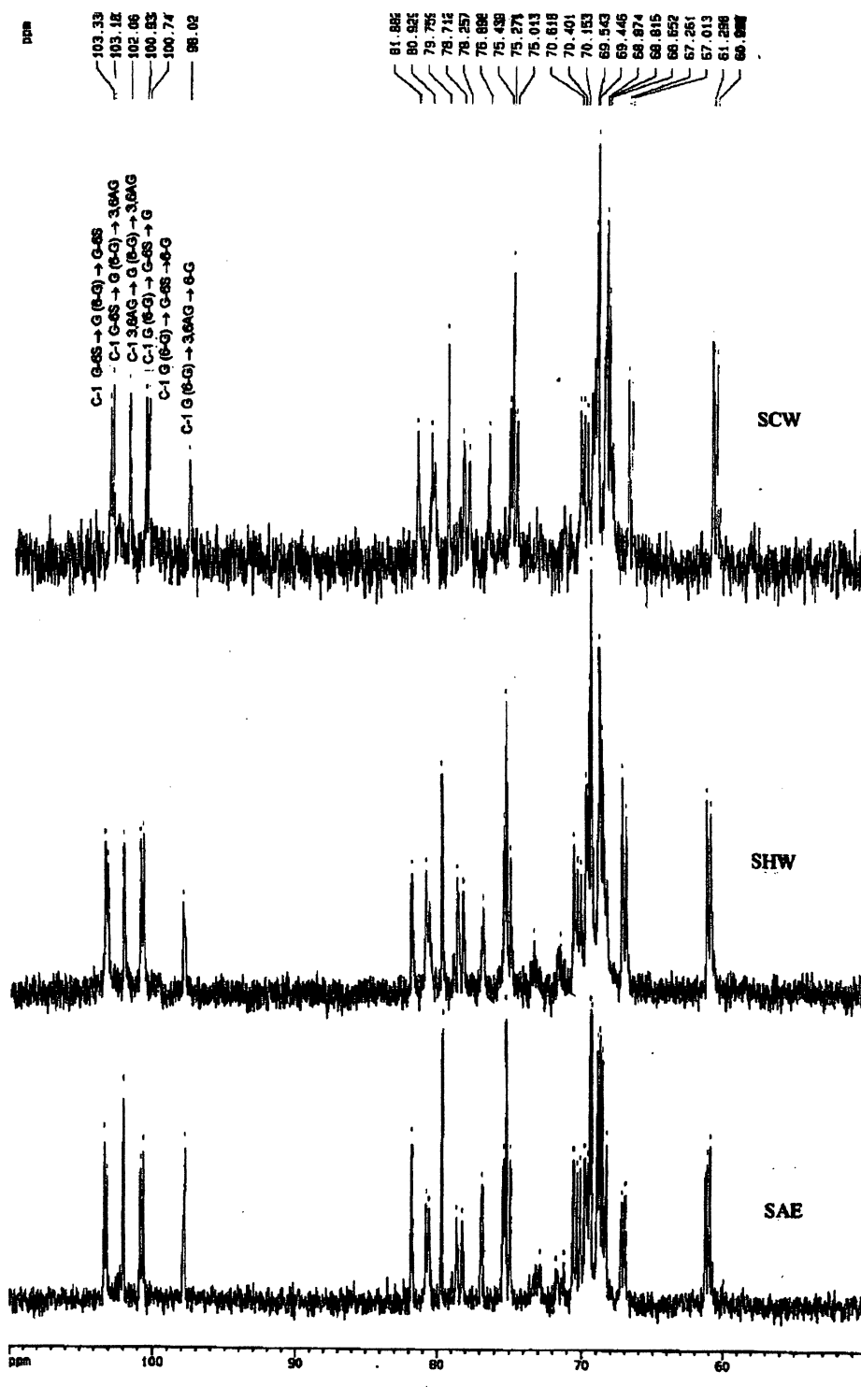
¹3,6-anidrogactose; ²6-O-metil galactose; ³galactose.

As galactanas sulfatadas nativas das frações SCW, SHW e SAE foram então submetidas à análise por ressonância magnética nuclear de carbono 13 (RMN de ^{13}C). Comparando-se a região do carbono anomérico do espectro (110 - 90 ppm) de todas as frações é possível verificar a ocorrência de 6 sinais, correspondentes ao C-1 das seguintes unidades monossacarídicas: para β -D-galactose ou 6-*O*-metil β -D-galactose quando substituída glicosidicamente em C-1 e C-3 por α -L-galactose 6-sulfato (103,33 – 103,29 ppm), para β -D-galactose ou 6-*O*-metil β -D-galactose quando substituída glicosidicamente em C-1 por α -L-galactose 6-sulfato e em C-3 por 3,6-anidro- α -L-galactose (103,18 – 103,13 ppm), para β -D-galactose ou 6-*O*-metil β -D-galactose quando substituída glicosidicamente em C-1 e C-3 por 3,6-anidro- α -L-galactose (102,06 – 102,02 ppm), para α -L-galactose 6-sulfato quando substituída glicosidicamente em C-1 por β -D-galactose ou 6-*O*-metil β -D-galactose e em C-4 por β -D-galactose (100,93 – 100,85 ppm), para α -L-galactose 6-sulfato quando substituída glicosidicamente em C-1 por β -D-galactose ou 6-*O*-metil β -D-galactose e em C-4 por 6-*O*-metil β -D-galactose (100,74 – 100,67 ppm) e para 3,6-anidro- α -L-galactose quando substituída glicosidicamente em C-1 por β -D-galactose ou 6-*O*-metil β -D-galactose e em C-4 por 6-*O*-metil β -D-galactose (98,02 – 97,82 ppm), indicando dessa maneira a presença dos mesmos monossacarídeos porém em diferentes proporções, confirmando os resultados obtidos por CLG (FIGURA 10) e ainda a ausência de grupos sulfato em outras posições que não em C-6 das unidades de α -L-galactose.

TABELA 3: Sinais correspondentes aos carbonos anoméricos (C-1) dos monossacarídeos presentes nas galactanas sulfatadas das frações SCW, SHW e SAE, por ressonância magnética nuclear de carbono 13 (RMN de ^{13}C) - NOSEDA *et al.*, in press.

Sinais do C-1 (ppm)	Unidade correspondente	Unidade 1-O-ligada	Unidade 3 ou 4-O-ligada
103,33 – 103,29	β -D-Gal ¹ ou 6Me β -D-Gal ²	α -L-Gal 6-S	α -L-Gal 6-S
103,18 – 103,13	β -D-Gal ou 6Me β -D-Gal	α -L-Gal 6-S	3,6-An- α -L-Gal
102,06 – 102,02	β -D-Gal ou 6Me β -D-Gal	3,6-An- α -L-Gal	3,6-An- α -L-Gal
100,93 – 100,85	α -L-Gal 6-S ³	β -D-Gal ou 6Me β -D-Gal	β -D-Gal
100,74 – 100,67	α -L-Gal 6-S	β -D-Gal ou 6Me β -D-Gal	6Me β -D-Gal
98,02 – 97,82	3,6-An- α -L-Gal ⁴	β -D-Gal ou 6Me β -D-Gal	6Me β -D-Gal

¹ β -D-galactose; ²6-O-metil β -D-galactose; ³ α -L-galactose 6-sulfato; ⁴3,6-anidro- α -L-galactose



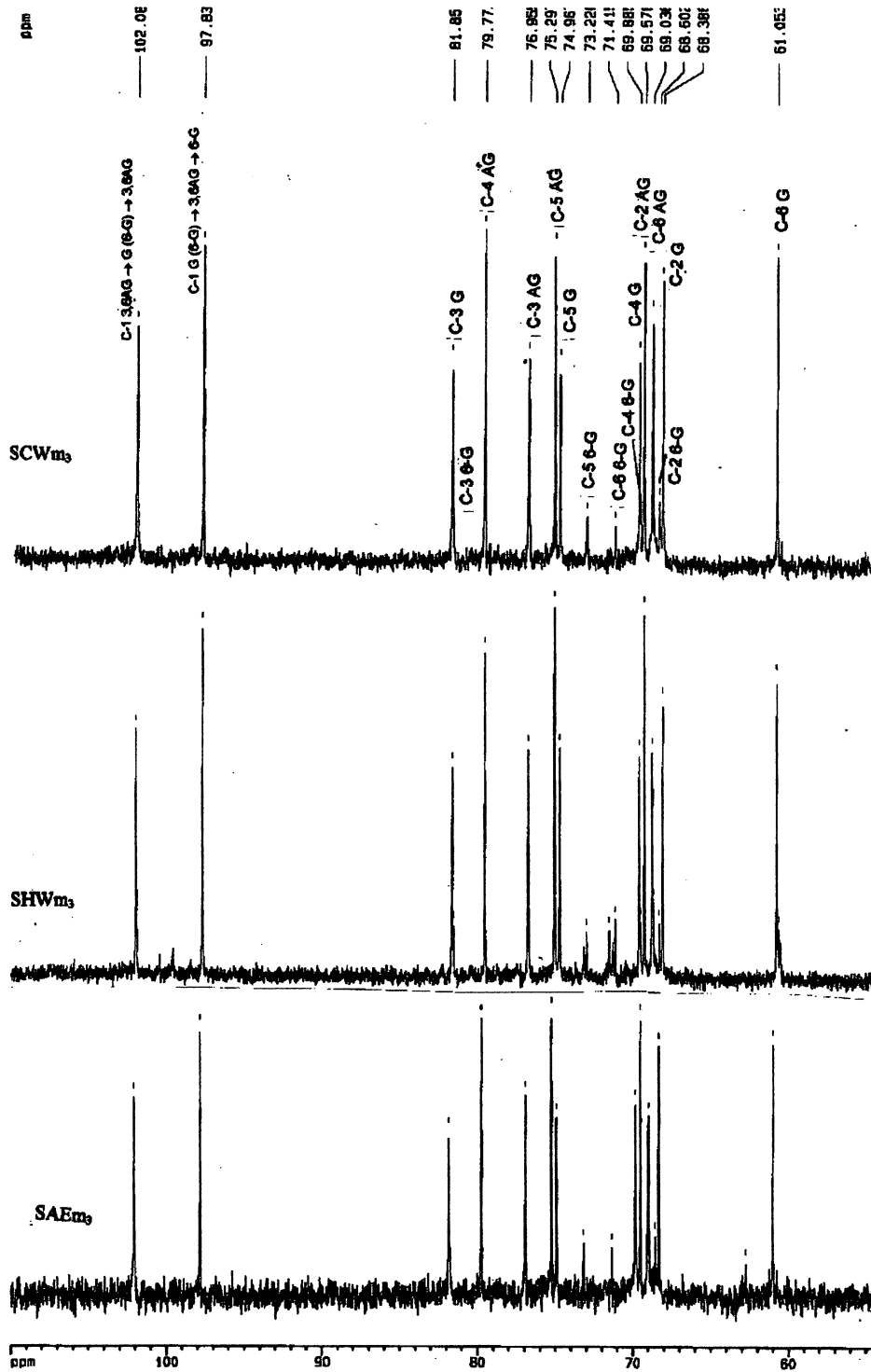
G- β-D-galactose; G-6S - α-L-galactose 6 sulfato; 3,6AG - 3,6anidro α-L-galactose;
6-G - 6-O-metil β-D-galactose

FIGURA 10: Análise por ressonância magnética nuclear de carbono 13 (RMN de ¹³C) das frações SCW, SHW e SAE, mostrando na região correspondente ao carbono anomérico do espectro (110 - 90 ppm) os sinais para cada unidade monossacarídica presente nestas galactanas sulfatadas.

A análise da região anomérica do espectro das frações modificadas, mostrou um aumento nos sinais correspondentes aos C-1 das unidades de 3,6-anidro- α -L-galactose em 97,824 ppm substituída glicosidicamente em C-1 por β -D-galactose ou 6-O-metil β -D-galactose e C-3 por 6-O-metil β -D-galactose e de β -D-galactose ou 6-O-metil β -D-galactose quando substituída glicosidicamente em C-1 e C-3 por 3,6-anidro- α -L-galactose (102,04 ppm), e a ausência dos sinais correspondentes ao C-1 das unidades de α -L-galactose 6-sulfato (100,93 – 100,85 ppm; 100,74 – 100,67 ppm), bem como dos sinais correspondentes as unidades de β -D-galactose ou 6-O-metil β -D-galactose quando substituídas glicosidicamente em C-1 e/ou C-3(4) por α -L-galactose 6-sulfato (103,33 – 103,29 ppm; 103,18 – 103,13 ppm), como pode ser verificado na FIGURA 11, indicando assim que os valores de teor sulfato apresentado pelas frações modificadas provavelmente são devido à interferência de resíduos presentes no momento da análise.

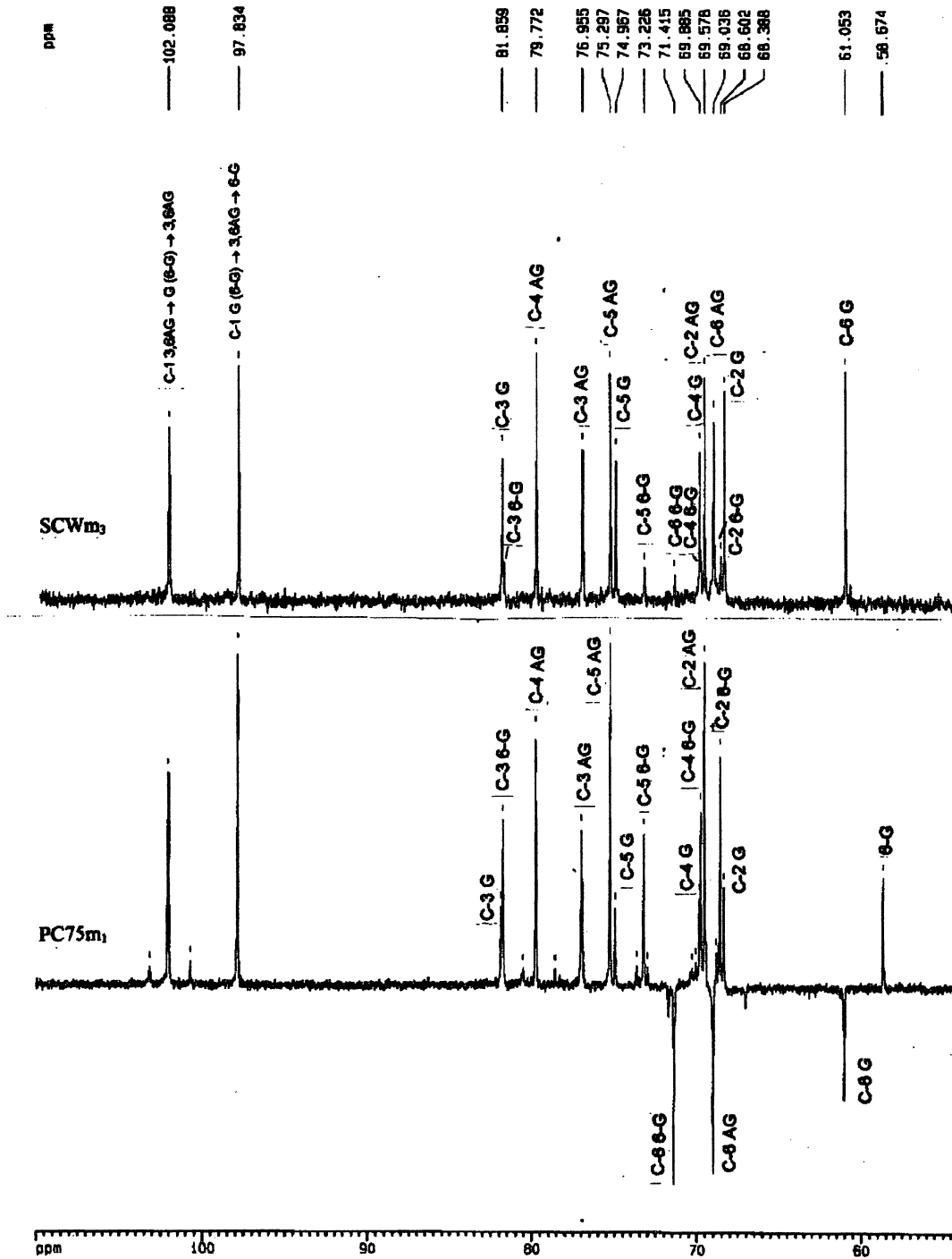
Os resultados obtidos pelas análises de RMN de ^{13}C para as frações obtidas a partir da alga vermelha *P. spiralis* var. *amplifolia* (SCW, SHW e SAE) são muito semelhantes daqueles obtidos para a fração PC75 obtida a partir da alga *P. columbina* Montagne (NOSEDA *et al.*, in press). Tal fração era constituída por galactanas sulfatadas do tipo ágar, apresentando uma estrutura dissacarídica repetitiva formada unicamente por unidades de β -D-galactopiranosose substituídas glicosidicamente em C-3, podendo apresentar-se metilada em C-6 (6-O-metil- β -D-galactose) ou não (β -D-galactose), unidade A, e por α -L-galactopiranosose 6-sulfato, substituídas glicosidicamente em C-4, sendo que apenas essas unidades apresentavam grupos sulfato substituintes, podendo esta, ainda, estar substituída pelo seu anidro-açúcar correspondente 3,6-anidrogalactose, unidade B (FIGURA 12).

Baseando-se na alta similaridade entre os sinais característicos apresentados por esses polissacarídeos, pode-se afirmar que os polissacarídeos biossintetizados pela alga estudadas nesse trabalho também apresentam uma estrutura dissacarídica repetitiva formada unicamente por unidades de β -D-galactopiranosose substituídas glicosidicamente em C-3, metiladas ou não em C-6 e por α -L-galactopiranosose substituídas glicosidicamente em C-4, sulfatadas em C-6 ou substituída pelo seu anidro-açúcar correspondente 3,6-anidrogalactose.



3,6 AG - 3,6-anidro- α -L-galactose; 6-G - 6-O-metil β -D-galactose; G - β -D-galactose

FIGURA 11: Espectro de RMN de ¹³C das frações modificadas por tratamento alcalino (NaOH 1M, 3 h a 80°C), mostrando a ocorrência apenas dos sinais correspondentes aos C-1 das unidades de β -D-galactose ou 6-O-metil β -D-galactose substituídas glicosidicamente em C-1 e C-3 por 3,6-anidro- α -L-galactose e das unidades de 3,6-anidro- α -L-galactose.



3,6AG - 3,6 anidro α -L-galactose; 6-G - 6-O-metil β -D-galactose; G - β -D-galactose

FIGURA 12: Espectro de RMN de ^{13}C da fração SHWm₃, mostrando a ocorrência apenas dos sinais correspondentes aos C-1 das unidades de β -D-galactose ou 6-O-metil β -D-galactose e de 3,6-anidro- α -L-galactose, comparada ao espectro da fração PC75m₃, obtida a partir da alga *P. columbina* (NOSEDA *et al.*, in press), mostrando a alta similaridade entre os polissacarídeos biossintetizados por ambas as algas.

Observou-se nas frações obtidas por tratamento alcalino SCW_{m3}, SHW_{m3} e SAE_{m3} aumento na capacidade de geleificar a temperatura ambiente, uma vez que como pode ser observado na TABELA 2, as referidas frações apresentaram redução no teor de grupos sulfato e aumento no teor 3,6-anidrogactose, porém nenhum experimento para medir-se a força do gel foi realizado.

A análise de composição monossacarídica e de ¹³C fornece informações importantes a respeito da estrutura das porfiranas constituintes das frações SCW, SHW e SAE, pode-se concluir assim que são galactanas sulfatadas, formadas por β-D-galactopiranosose (36,3; 31,7; 40,9% respectivamente) e seu derivado naturalmente metilado 6-O-metil-β-D-galactose (13,3; 15,9; 11,9%) substituídas glicosidicamente em C-3, bem como por α-L-galactopiranosose 6-sulfato (36,7; 39,2; 21,3%), obtido a partir da diferença entre o teor antes e após o tratamento alcalino, e seu anidro açúcar correspondente 3,6-anidro α-L-galactose (13,7; 13,2; 25,9%) substituídas glicosidicamente em C-4, apresentando portanto uma estrutura do tipo ágar (FIGURA 13).

A homogeneidade dos polissacarídeos das frações SCW, SHW e SAE, foi determinada por cromatografia de gel permeação (GPC - HPSEC-MALLS). O perfil de eluição obtido para os polissacarídeos de todas as frações indica que estes apresentam-se praticamente homogêneos, apresentando apenas pequenas concentrações de fragmentos moleculares nas frações SCW e SAE, além dos polissacarídeos, conforme mostrado na FIGURA 14 (onde as linhas vermelhas se referem ao espalhamento de luz, captado pelo fotossensor 11, o qual se encontra formando um ângulo de 90° com o feixe de luz - laser - e indica o tamanho de cada molécula presente na fração, enquanto que as linhas azuis se referem ao índice de refração, indicando a concentração de cada tamanho molecular presente na fração) é interessante ressaltar que se tratam de frações brutas que não sofreram nenhum tipo de fracionamento.

A análise conjunta de todos os perfis obtidos pelos 18 fotossensores presentes no aparelho, ao redor da célula, e sabendo-se que o peso molecular e o espalhamento de luz são diretamente proporcionais, pode-se concluir que o polímero presente nessas frações possui uma alta massa molecular, devido a maior intensidade de luz espalhada em altos ângulos, como pode ser verificado pela sequência crescente obtida para a fração SHW (FIGURA 15).

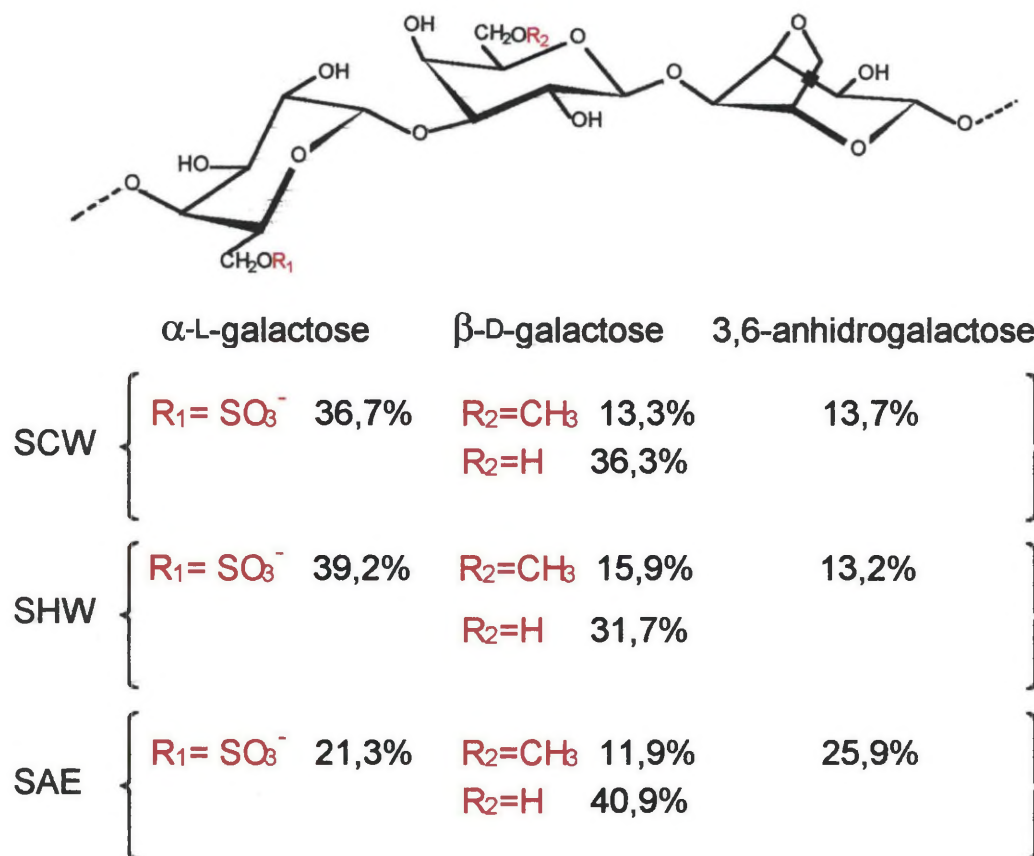


FIGURA 13: Estrutura apresentada pelos polissacarídeos extraídos da alga *Porphyra spiralis* var. *amplifolia* presentes nas frações SCW, SHW e SAE.

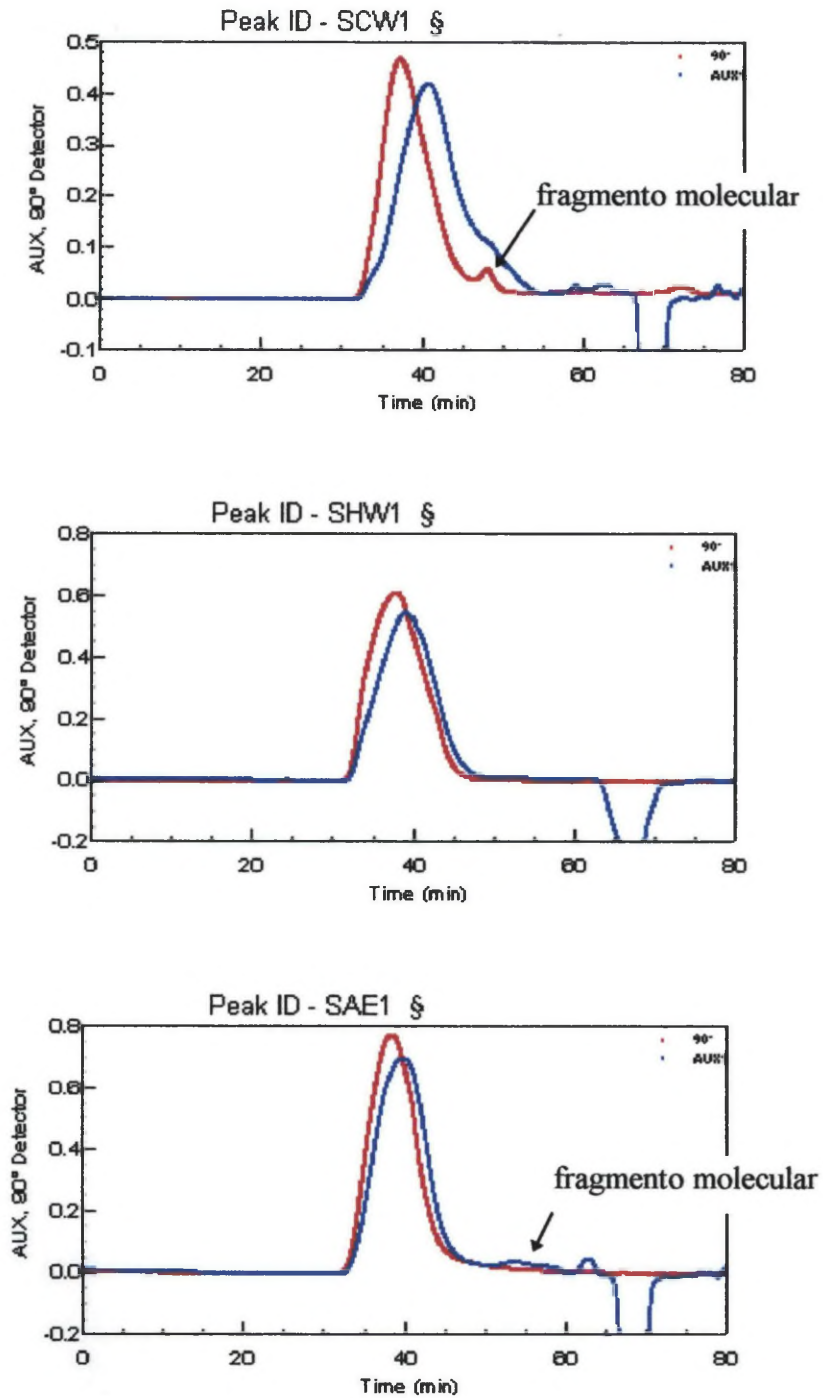


FIGURA 14: Perfil cromatográfico apresentado pelas frações SCW, SHW e SAE, mediante análise de homogeneidade por GPC, indicando ocorrência de fragmentos moleculares na primeira e última fração.

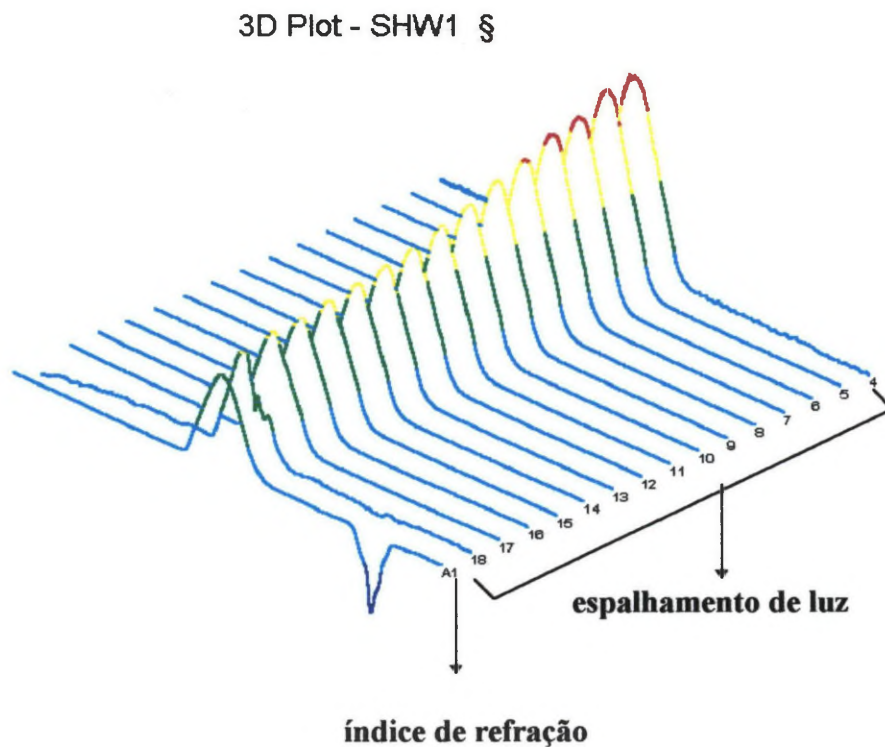


FIGURA 15: Perfil de caráter crescente apresentado pela fração SHW, mostrando que nesta fração se encontram presentes polímeros de alta massa molecular.

Para se confirmar os resultados acima mencionados, a massa molecular das porfiranas foi determinada, pelo aparelho (HPSEC – MALLS), a partir de seu perfil de eluição e de seu dn/dc (variação do índice de refração com relação a variação da concentração). Assim a massa molecular determinada para o polissacarídeo majoritário da fração SCW foi de 387.200 ($dn/dc = 0.161$), da SHW foi 613.400 ($dn/dc = 0.120$) e da SAE foi 716.500 ($dn/dc = 0.115$), correspondendo a forma de extração a partir da qual foram obtidas, isto é, condições mais brandas (aquosa à temperatura ambiente) removeram polissacarídeos de menor massa, enquanto que condições mais drásticas (utilizando KOH 4M) removeram polissacarídeos de maior massa molecular.

A determinação da massa molecular por este método é mais seguro do que aquele determinado por coluna de massa molecular, por levar em consideração o conformação espacial do polímero.

A FIGURA 16 mostra um perfil comparativo das massas moleculares das porfiranas de cada fração.

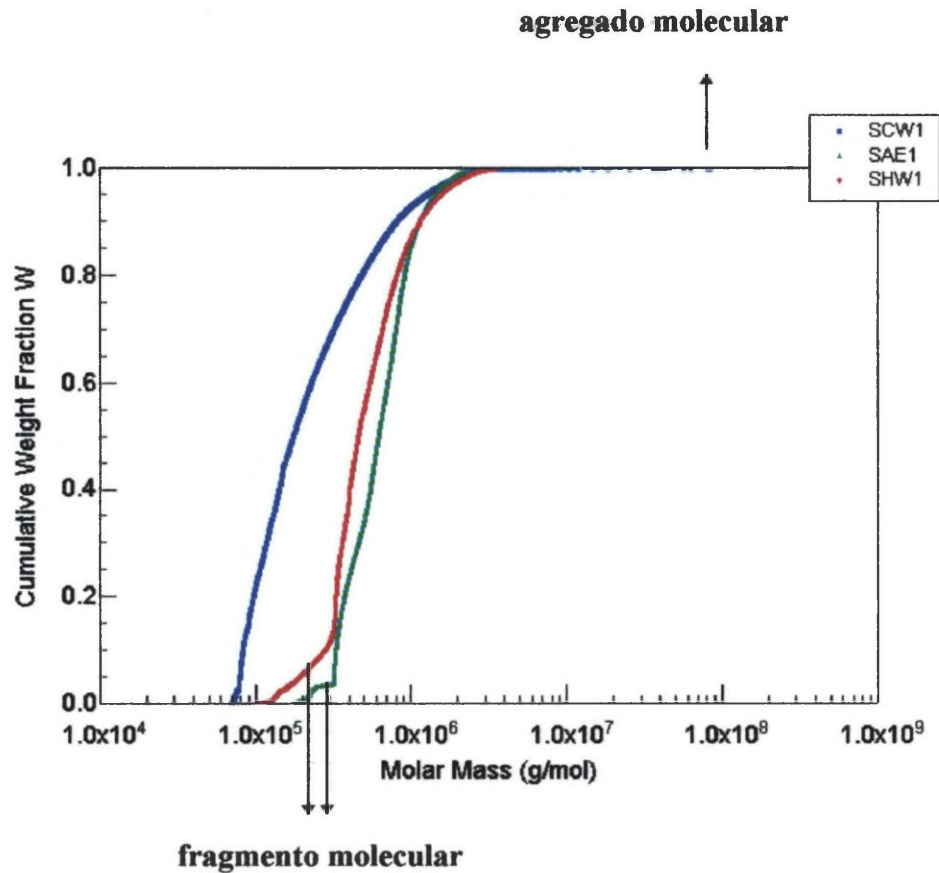


FIGURA 16: Perfil comparativo das massas moleculares cumulativas das porfiranas presentes nas frações SCW, SHW e SAE, obtido mediante análise por GPC.

Na figura pode-se observar que os polisacarídeos de todas as frações se encontram dentro de uma mesma faixa de massa molecular, além disso as frações SHW e SAE possuem pequenas percentagens de fragmentos moleculares (indicado pelo desvio radical na inclinação das retas), e ainda de agregados moleculares nas frações SCW e SHW (indicado por linhas pontilhadas), não observados na análise de homogeneidade.

CONCLUSÃO

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos permitem concluir que

- A alga *Porphyra spiralis* var. *amplifolia* apresenta somente heterosídeos como carboidratos de baixa massa molecular, dentre estes predominando D-isoflorideose;
- A partir da alga seca e moída, obteve-se três frações, a frio, SCW (5,1 %), a quente, SHW (13,0 %) e alcalina, SAE (6,4 %), praticamente homogêneas, de massas moleculares crescentes (387.000; 613.400; e 716.500 respectivamente) correspondendo a forma de extração;
- Os polissacarídeos presentes nas três frações são galactanas sulfatadas do tipo ágar, formadas pelas mesmas unidades monossacarídicas, diferindo apenas quanto as suas percentagens relativas: β -D-galactopiranosose substituídas glicosidicamente em C-3, podendo apresentar-se metilada em C-6 (6-O-metil- β -D-galactose: SCW 13,3%; SHW 15,9% e SAE 11,9%) ou não (β -D-galactose: SCW 36,3%; SHW 31,7% e SAE 40,9%), unidade A, e por α -L-galactopiranosose substituídas glicosidicamente em C-4, sulfatada em C-6 (α -L-galactose 6-sulfato: SCW 36,7%; SHW 39,2% e SAE 21,3%) ou substituída pelo seu anidro-açúcar correspondente 3,6-anidro α -L-galactose (SCW 13,7%; SHW 13,2% e SAE 25,9%), unidade B.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARNOTT, S.; FULNER, A.; SCOTT, W.E. The agarose double helix and its function in agarose gel structure. **J. Mol. Biol.**, **90**: 269-284, 1974.
- CIANCIA, M. Estudio de los carragenanos de plantas cistocarpicas del alga roja *Gigartina skottsbergii*. **Tesis de doutorado**. Departamento de Química Orgánica, Universidad de Buenos Aires, 307p., 1994.
- CRAIGIE, J. S., WEN, Z. C. & MEER, V. Interspecific, intraspecific and nutritionally-determined variations in the composition of agars from *Gracilaria spp.* **Botanica Marina**, **27**: 55-61, 1984.
- CROWE, J.; CROWE, L.; CARPENTER, J. & WISTROM, C. Stabilization of dry phospholipid bilayers and proteins by sugars. **Bioch. J.** **242**: 1-10, 1987.
- DODGSON, K.S. Determination of inorganic sulphate in studies on the enzymic and non-enzymic hydrolysis of carbohydrate and other sulphate esters. **Biochem. J.**, **78**: 312-319, 1961.
- FILHO, E. C. O.; COLL, J. The genus *Porphyra* C. Ag. (RHODOPHYTA – Bangiales) in the American South Atlantic. I. Brazilian species. **Botanica Marina**, **38**: 191-197, 1975.
- GUISELEY, K. B. The relationship between methoxyl content and gelling temperature of agarose. **Carbohydrate Res.** **13**: 247-256, 1970.

- KARSTEN, U.; BARROW, K. D. & KING, R. J. Floridoside, L-Isofloridoside and D-isofloridoside in the red alga *Porphyra columbina* – Seasonal and osmotic effects. **Plant Physiol.** **103**: 485-491, 1993.
- KARSTEN, U.; THOMAS, D.N.; WEYKAM, G.; DANIEL, C. & KIRST, G.O. A simple and rapid method for extraction and separation of low molecular weight carbohydrates from macroalgae using high-performance liquid chromatography. **Plant Physiol. Biochem.**, **29**: 373-378, 1991.
- KARSTEN, U.; WEST, J. A.; ZUCCARELLO, G. C.; NIXDORF, O; BARROW, K. D. & KING, R. J. Low molecular weight carbohydrate patterns in the Bangiophyceae (RHODOPHYTA). **J. Phycol.**, **35**: 967-976, 1999.
- KIRST, G. O. Low m w carbohydrates and ions in Rhodophyceae: quantitative measurement of floridoside and digeneaside. **Phytoch.**, **19**: 1107-1110, 1980.
- MENG, J.; ROSELL, K.G. & SRIVASTAVA, L.M. Chemical characterization of floridosides from *Porphyra perforata*. **Carbohydr. Res.**, **161**: 171-180, 1987.
- NOSEDA, M. D. & CEREZO, A. S. Methylation analysis of a lambda carrageenan from the tetrasporic phase of the red seaweed *Gigartina skottsbergii*. **An. Asoc. Quím. Argent.**, **83**: 49-53, 1995.
- NOSEDA, M.D.; VIANA, A. G.; DUARTE, M. E. R. & CEREZO, A.S. Alkali-modification of carrageenans – part IV – Porphyrans as model compounds. **Carbohydr. polym.** In press.

PAINTER, T.J. Algal Polysaccharides. In Aspinall, G.O., ed., *The Polysaccharides*, vol. 2. Academic Press, Orlando, Florida, 196-285, 1982.

RAVEN, P.H.; EVERT, R.F. & EICHHORN, S.E. **Biologia Vegetal**, 5^o edição. Guanabara/Koogan, Rio de Janeiro. p 248-259, 1996.

REES, D.A. Structure, conformation, and mechanism in the formation of polysaccharide gels and networks. **Adv. Carbohydr. Chem.**, **24**: 267-332, 1969.

REES, D.A. & CONWAY, E. The structure and biosynthesis of Porphyrin: a comparison of some samples. **Biochem. J.**, **84**: 411-416, 1962.

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

WHISTLER, R. L.; DURSO, D. F. J. Chromatographic separation of sugars on charcoal. **J. Amer. Chem. Soc.**, **72**: 677-679, 1950.