

ROSIANE GUETTER MELLO ZIBETTI

**DETERMINAÇÃO DA ESTRUTURA QUÍMICA DE GALACTANAS
HÍBRIDAS-D/L ISOLADAS DA ALGA VERMELHA
Cryptonemia crenulata (CRYPTONEMIALES, RHODOPHYTA).**

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

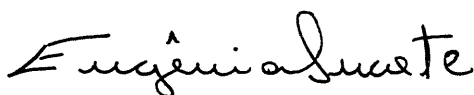
Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria Eugênia Rabello Duarte

**CURITIBA
2001**

Rosiane Guetter Mello Zibetti

**DETERMINAÇÃO DA ESTRUTURA QUÍMICA DE GALACTANAS
HÍBRIDAS-D/L ISOLADAS DA ALGA VERMELHA
Cryptonemia crenulata (CRYPTONEMIALES, RHODOPHYTA).**

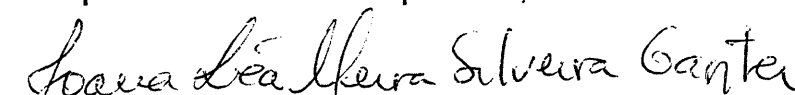
Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre, pelo Curso de Pós-Graduação em Ciências – Área Bioquímica do Setor de Ciências Biológicas da UFPR, pela seguinte banca examinadora:



Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria Eugênia Rabello Duarte
Departamento de Bioquímica, UFPR



Prof. Dr. Philip Albert James Gorin
Departamento de Bioquímica, UFPR



Prof.^a Dr.^a Joana Lea Ganter
Departamento de Bioquímica, UFPR



Prof. Dr. Marcos José Machado
Departamento de Análises Clínicas, UFSC

Curitiba, 21 de junho de 2001.

Dedico esta tese ao grande amor da minha vida Geomar e a minha filha Rocielle.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Prof^a. Maria Eugênia Rabello Duarte, pela orientação, pelo apoio em todas as horas e principalmente pelo exemplo profissional e amizade, e ao Prof. Miguel Daniel Nosedá, pela orientação e sempre disposição a ajudar.

Especialmente agradeço aos meus pais, Rosilene e Gilberto, pelo encorajamento em todas as batalhas da vida e pelos braços sempre abertos.

Ao meu marido, Geomar, pelo apoio a qualquer hora, até quando teve que deixar de assistir “o coxa”, e a minha filha, Rocielle, pela inspiração e pelos momentos de descontração.

Agradeço também a minha sogra (Nelis) e ao meu sogro (Donato), pela força em todos os momentos.

Não posso esquecer de agradecer a Prof^a. Eva Gunilla Skare Carnieri pelos primeiros incentivos a pesquisa e pela sempre amizade.

A coordenação e aos professores do curso de Pós-graduação em Bioquímica, que contribuíram para a minha formação.

Agradeço aos amigos Adriano, Paulinha, Alan, Sergio, Flávia, Marco, Dani, Diogo, Fabiola e Alexandre, pela ajuda incondicional, carinho e por tornarem o dia-a-dia muito agradável.

Aos amigos Carol, Juliana, Lucimara, Patrícia, Selene, Guilherme, Renato, César, Rodrigo Reis e Clarice pelas conversas científicas e pela sempre disposição á ajudar.

Aos colegas de turma Ana Paula, Carol, Lílian, Andréa, Angelita, Stefan, Luciano, Lucy, Angela pela divertida convivência.

A Dra. Marina Ciancia pela realização das análises enantioméricas.

Ao Angelo Roberto dos Santos Oliveira do Departamento de Química, pelas análises de infra vermelho.

Ao Lauro, Andréa e ao Juan pela execução das análises de CLG-EM, CLG e GPC.

As bibliotecárias, em especial a Telma, Izabella, Ana Maristela e Ruth, pela sempre ajuda e contribuição para que este trabalho fosse feito com qualidade.

Ao PRONEX-Carboídratos, projeto VITAE e a CNPq pelo suporte financeiro.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	iii
LISTA DE TABELAS.....	v
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	vii
RESUMO.....	viii
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 ALGAS VERMELHAS.....	1
1.2 GALCTANAS: ESTRUTURA GERAL.....	2
1.2.1 Carragenanas.....	3
1.2.2 Agaranas.....	6
1.3 GALACTANAS DA ORDEM CRYPTONEMIALES.....	8
1.4 <i>Cryptonemia crenulata</i>	14
2. OBJETIVOS.....	16
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	17
3.1 MÉTODOS ANÁLITICOS GERAIS.....	17
3.2 COLETA E PROCESSAMENTO.....	18
3.3 EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS.....	18
3.4 TRATAMENTO DOS POLISSACARÍDEOS COM KCl.....	18
3.5 PURIFICAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS DE <i>C. crenulata</i> POR CROMATOGRAFIA DE TROCA-IÔNICA.....	19
3.6 HIDRÓLISE ÁCIDA TOTAL DO TIPO HIDRÓLISE REDUTIVA.....	19

3.7	HIDRÓLISE ÁCIDA TOTAL.....	20
3.8	METILAÇÃO.....	20
3.9	DESSULFATAÇÃO POR TRATAMENTO SOLVOLÍTICO.....	21
3.9.1	Preparo do Sal de Piridônio.....	21
3.9.2	Solvólise.....	21
3.10	TRATAMENTO ALCALINO.....	21
3.11	DETERMINAÇÃO DA CONFIGURAÇÃO ENANTIOMÉRICA.....	22
3.12	MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS.....	23
3.12.1	Cromatografia Líquido-Gasosa.....	23
3.12.2	Cromatografia Líquido-Gasosa acoplada à Espectrometria de Massa (CLG-EM).....	23
3.12.3	Cromatografia de Gel Permeação (GPC - HPSEC-MALLS) - Análise de Homogeneidade e Massa Molecular.....	24
3.13	RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE CARBONO-13 (RMN – ¹³C)....	25
3.14	ESPECTROSCOPIA DE INFRA VERMELHO.....	26
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	27
5.	CONCLUSÃO.....	61
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	62

LISTA DE FIGURAS

ESQUEMA-1 EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS DA ALGA VERMELHA <i>Cryptonemia crenulata</i>	28
FIGURA-1 ESTRUTURA BÁSICA REPETITIVA DE CARRAGENANAS, COM UNIDADES D-ALTERNANTES.....	3
FIGURA-2 ESTRUTURA BÁSICA REPETITIVA DE AGARANAS, COM UNIDADES D- E L- ALTERNANTES.....	6
FIGURA-3 FOTO DA ALGA VERMELHA <i>Cryptonemia crenulata</i>	15
FIGURA-4 ESTRUTURA DE UMA UNIDADE DE β -D-GALACTOPIRANOSE ESTERIFICADA EM SEUS CARBONOS 4 E 6 POR ACETAL DE ÁCIDO PIRÚVICO.....	34
FIGURA-5 ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DO EXTRATO C1-2N DE <i>C. crenulata</i>	36
FIGURA-6 ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DO EXTRATO C2-2N DE <i>C. crenulata</i>	36
FIGURA-7 ANÁLISE DE HOMOGENEIDADE DA FRAÇÃO C2m.....	40
FIGURA-8 ANÁLISE DE HOMOGENEIDADE DA FRAÇÃO C2u.....	40
FIGURA-9 ESPECTRO DE INFRA VERMELHO DA FRAÇÃO C2u DE <i>C. crenulata</i>	42
FIGURA-10 ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DAS FRAÇÕES C2u E C2ud DE <i>C. crenulata</i>	45

FIGURA-11 ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DA FRAÇÃO C2m DE <i>C. crenulata</i>	46
FIGURA-12 REAÇÃO DE CICLIZAÇÃO EM GALACTANAS DO TIPO AGARANAS.....	47
FIGURA-13 ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DA FRAÇÃO C2T DE <i>C. crenulata</i>	48
FIGURA-14 ESTRUTURA APRESENTADA PELO GRUPO ACETAL DE ÁCIDO PIRÚVICO ESTERIFICANDO UMA UNIDADE DE β -D-GALACTOSE-2-SULFATO E SEUS RESPECTIVO DESLOCAMENTOS QUÍMICOS POR RMN DE ^{13}C	53
FIGURA-15 PRINCIPAIS UNIDADES MONOSSACARÍDICAS PRESENTES NA GALACTANA C2u DE <i>C. crenulata</i>	60

LISTA DE TABELAS

TABELA-1 CLASSIFICAÇÃO DAS CARRAGENANAS DE ACORDO COM ESTRUTURAS IDEAIS DAS UNIDADES A E B.....	5
TABELA-2 GALACTANAS ISOLADAS DE ALGAS PERTENCENTES À ORDEM CRYPTONEMIALES.....	8
TABELA-3 RENDIMENTO E ANÁLISE QUÍMICA DAS FRAÇÕES DE <i>C. crenulata</i> , APÓS EXTRAÇÃO AQUOSA À TEMPERATURA DE 25°C E 80°C.....	29
TABELA-4 ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES C-1, C-2 E C-3 DE <i>C. crenulata</i>	31
TABELA-5 RENDIMENTO E ANÁLISE QUÍMICA DAS FRAÇÕES DE <i>C. crenulata</i> , SUBMETIDAS À PURIFICAÇÃO COM KCl 2M A PARTIR DE C-1 E C-2.....	33
TABELA-6 ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES DE <i>C. crenulata</i> SOLÚVEIS EM KCl 2M.....	34
TABELA-7 RENDIMENTO E ANÁLISE DOS POLISSACARÍDEOS OBTIDOS POR CROMATOGRAFIA DE TROCA-IÔNICA DE C2-2N DE <i>C. crenulata</i>	37
TABELA-8 ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES DE <i>C. crenulata</i> PROVENIENTES DE C2-2N SUBMETIDA A COLUNA DE TROCA -IÔNICA.....	39
TABELA-9 COMPARAÇÃO DA COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DA FRAÇÃO C2u ANTES E APÓS TRATAMENTO SOLVOLÍTICO.....	43

TABELA-10 COMPARAÇÃO DA COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DA FRAÇÃO C2u E C2uT DA ALGA *C. crenulata*.....47

TABELA-11 DESLOCAMENTOS QUÍMICOS REFERENTES AOS CARBONOS ANOMÉRICOS DAS UNIDADES MONOSSACARÍDICAS PRESENTES NAS GALACTANAS C2u, C2ud E C2uT.....49

TABELA-12 RESULTADOS DAS ANÁLISES DE METILAÇÃO DAS FRAÇÕES C2u, C2ud E C2uT.....51

TABELA-13 ASSINALAMENTOS QUÍMICOS DE RMN DE ¹³C OBSERVADO NA C2u DE *Cryptonemia crenulata* E EM OUTRAS GALACTANAS.....56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

C-1 - Fração obtida da extração aquosa a temperatura de 25°C;

C-2 - Fração obtida da 1ª e da 2ª extração com tampão fosfato a temperatura de 80°C;

C-3 - Fração obtida da 3ª extração com tampão fosfato a temperatura de 80°C;

C1-2N - Fração solúvel em cloreto de potássio 2M, proveniente do tratamento da fração C-1;

C2-2N - Fração solúvel em cloreto de potássio 2M, proveniente do tratamento da fração C-2;

C2w - Fração eluída da coluna de troca-iônica (DEAE-Sephacel) com água, a partir da fração solúvel em KCl 2m, C2-2N;

C2m - Fração eluída da coluna de troca-iônica (DEAE-Sephacel) com 0,5M de NaCl, a partir da fração solúvel em KCl 2m, C2-2N;

C2u - Fração eluída da coluna de troca-iônica (DEAE-Sephacel) com 1,0M de NaCl, a partir da fração solúvel em KCl 2m, C2-2N;

C2um - Fração eluída da coluna de troca-iônica (DEAE-Sephacel) com 1,5M de NaCl, a partir da fração solúvel em KCl 2m, C2-2N;

RMN de ¹³C - Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13;

CLG - Cromatografia líquido-gasosa;

CLG-EM - Cromatografia líquido-gasosa acoplada à espectrometria de massa;

DEAE-Sephacel - Dietilaminoetil-Sephacel;

D₂O - Óxido de deutério;

DMSO - Dimetil Sulfóxido;

GPC - Cromatografia de gel permeação;

HPLC - Cromatografia líquida de alta pressão;

HPSEC-MALLS - Cromatografia de Exclusão Estérica acoplada à detector de espalhamento de luz em multi-ângulos;

ICH₃ - Iodo-Metano;

RESUMO

A alga vermelha *Cryptonemia crenulata* (Rhodophyta, Cryptonemiales) foi submetida à extração aquosa à temperatura de 25°C (1 vez), obtendo-se a fração C-1, e à 80°C (3 vezes), as duas primeiras originando a fração C-2 e a terceira originando a fração C-3. As frações C-1e C-2 foram submetidas a tratamento com KCl 2M, onde foi obtido, quase na sua totalidade, polissacarídeos solúveis em KCl 2M, denominados de C1-2N e C2-2N (93,8 e 97,5 % de rendimento, respectivamente). A fração C2-2N foi fracionada em coluna de troca-iônica (DEAE-Sephacel), onde foi utilizado como eluente: água, e soluções de NaCl nas concentrações de 0,5; 1,0 e 1,5 M, as frações de maior rendimento foram obtidas das eluições com 0,5 M e 1 M de NaCl, denominadas de C2m e C2u, respectivamente. Estas frações apresentaram um teor de sulfato de 25,1 e 28,3 %, respectivamente. A fração C2u homogênea por HPSEC-MALLS, apresentou Mw de 236.200, sendo constituída por: galactose (68,0%), 3,6-anidrogactose (15,7%), 2-O-metil-3,6-anidrogactose (8,5%), 2-O-metil-gactose (4,5 %), 6-O-metil-gactose (0,6%) e xilose (2,7%). Nesta gactana, 78% das unidades "A" (β -gactose-3-O-substituída), se apresentam como gactose-2-sulfato (comprovado por metilação e análise de RMN de ^{13}C da fração nativa e das modificadas quimicamente por tratamento alcalino (C2uT) e por solvólise (C2ud). O espectro de RMN de ^{13}C da fração C2u, demonstra a presença de acetal de ácido pirúvico [4,6-O-(1-carboxietilideno)], caracterizado pelos sinais em 25,0 ppm (CH_3 -), e em 175,7 ppm ($-\text{C}=\text{O}$), que também foram quantificadas fotocolorimetricamente (2,8%). Estas unidades piruvatadas apresentam grupo sulfato em carbono-2 (devido a presença de gactose nas análises de metilação de C2uT e C2u, e o desaparecimento deste derivado em C2ud, com o aumento proporcional de 8,1% de 2-O-metil-gactose). Em pequenas proporções aparecem unidades de gactose não substituídas e gactose-2,4-dissulfato. As unidades "B" (α -gactose-4-O-substituída), pelos resultados de metilação e espectroscópicos, apresentam grande diversidade: gactose-6-sulfato (12,6%), 3,6-anidrogactose-2-sulfato (9,5%), 2-O-metil-3,6-anidrogactose (8,5%), 3,6-anidrogactose sem substituição em carbono-2 (6,8%), além de gactose (7,8%) e baixas porcentagens de gactose-2,6-dissulfato (1,1%). Com relação à configuração enantiomérica destas unidades, o espectro de RMN de ^{13}C da fração C2ud (98,3 e 97,8 ppm) confirmam a presença de 2-O-metil-3,6-anidro- α -L-gactose e 3,6-anidro- α -L-gactose. A presença de 3,6-anidro- α -D-gactose (4,7 moles%) e 3,6-anidro- α -L-gactose (11 moles%), foi confirmada pela quantificação destes no polímero nativo. Após tratamento alcalino da fração C2u, o espectro de RMN de ^{13}C da gactana C2uT mostra a presença do sinal em 95,3 ppm (relativo ao carbono-1 das unidades de 3,6-anidro- α -D-gactose), demonstrando a presença de α -D-gactose-6-sulfato no polímero original. Deste modo a fração C2u de *C. crenulata* é uma gactana piruvatada constituída por unidades de β -D-gactose-3-O-substituídas, estas se apresentam principalmente sulfatadas em carbono-2, e por unidades de α -gactose-4-O-substituídas. Estas últimas apresentam-se tanto na forma estereoquímica D- como L-, caracterizando esta gactana piruvatada como uma gactana do tipo híbrida-D/L.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 ALGAS VERMELHAS

As algas vermelhas (Rhodophyta), são as principais macrófitas marinhas, sendo encontradas em alto mar, ou ainda sob substratos rochosos ou calcáreos (PAINTER, 1983; USOV, 1992). Esta divisão de plantas inferiores difere muito, na composição polissacarídica em relação a outras plantas, e contêm usualmente galactanas sulfatadas como o principal constituinte estrutural da parede celular na matriz intercelular (PAINTER, 1983).

Segundo KLOAREG e QUATRANO, 1988, os polissacarídeos da matriz das algas marinhas, estão correlacionadas com a regulação osmótica ou iônica, adaptando as algas ao meio marinho. Ainda com função de osmorregulação, as algas biossintetizam carboidratos de baixo peso molecular e/ou polióis (KARSTEN *et al.*, 1993).

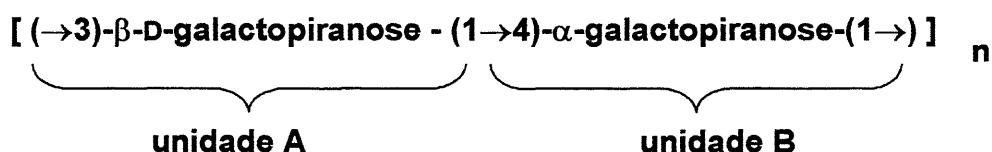
O polissacarídeo de reserva as algas vermelhas é um polímero constituído por α -D-glucose, denominado “amido das florídeas”, com ligações glicosídicas do tipo α -(1 \rightarrow 4), similar a amilopectina (PAINTER, 1983).

Algumas galactanas sulfatadas apresentam propriedades geleificantes e estabilizantes tendo, portanto larga aplicação industrial. Vários outros polissacarídeos não têm propriedades de interesse industrial, mas são muito promissores como compostos biologicamente ativos, como por exemplo, atividade antiviral (CARLUCCI *et al.*, 1999; DUARTE *et al.*, 2001) e antitumoral (FERNANDEZ, *et al.*, 1989). A determinação da composição polissacarídica, pode também ser utilizada para elucidar a posição taxonômica das algas vermelhas, suplementando os critérios clássicos, como: morfologia, anatomia e ciclo de vida das algas (USOV, 1998).

1.2 GALACTANAS: ESTRUTURA GERAL

A importância de se estudar a estrutura química das galactanas isoladas de Rhodophytas, está em se correlacionar detalhes estruturais com propriedades físico-químicas ou atividade biológica apresentadas pelas mesmas (USOV, 1998).

Estruturalmente as galactanas, consistem de cadeias lineares de unidades de β -D-galactopiranosose ligados glicosídicamente através da posição 3 (unidade A) e α -galactopiranosose ligados glicosídicamente através da posição 4 (unidade B) (PERCIVAL; McDOWELL, 1967). Deste modo formam um arranjo alternado entre as unidades A e B $(AB)_n$.



Embora apresentando uma estrutura básica repetitiva, as galactanas apresentam grande diversidade estrutural, devido aos diferentes tipos de substituintes na cadeia principal, como por exemplo:

- A unidade A, pode apresentar grupos éter metil no carbono-6; grupos éster sulfato em carbono 2, 4 ou 6, ou ainda podem apresentar substituição por acetal de ácido pirúvico.

- A unidade B pode apresentar grupos sulfato no carbono 6 e/ou 2, ou estar totalmente ciclizada na forma de 3,6-anidrogactose. Grupos éter metil no carbono-2 das unidades do anidro-açúcar e/ou unidade de galactose podem estar presentes (PAINTER, 1983).

Estes substituintes, de diferentes tipos em diferentes posições originam moléculas de estruturas complexas, as quais podem ser divididas em dois grandes grupos: carragenanas e agaranas.

1.2.1 Carragenanas

As carragenanas são constituídas de unidades (1→3)-β-D-galactopiranosose (A) e (1→4)-α-D-galactopiranosose (B), portanto a estereoquímica da unidade B, pertence à série D- (Figura-1). Geralmente as carragenanas apresentam uma alta porcentagem de grupos sulfato, além de pouca ou nenhuma presença de grupos O-metil naturais (PAINTER, 1983).

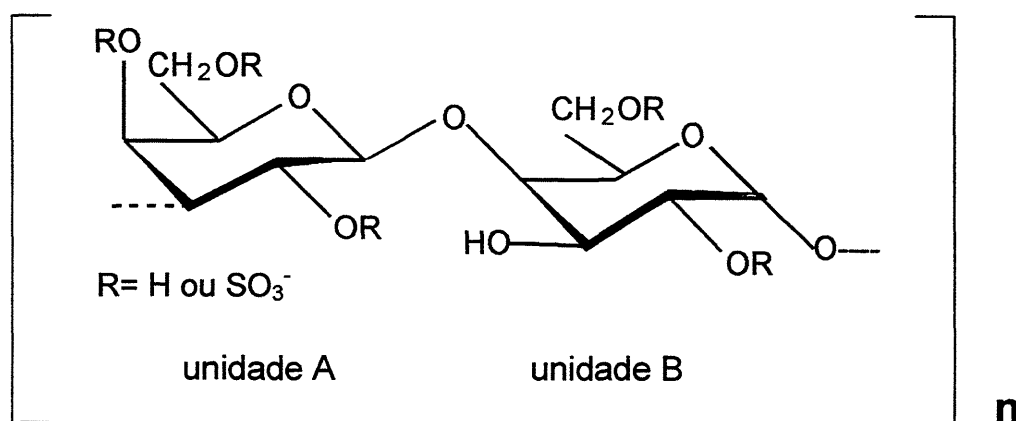


FIGURA-1 ESTRUTURA BÁSICA REPETITIVA DE CARRAGENANAS, COM UNIDADES D- ALTERNANTES.

As carragenanas são classificadas em 4 famílias, de acordo com a posição dos grupos sulfato nas unidades A e B e ciclização da unidade B (Tabela -1).

I - A família Kappa (κ), apresenta grupos sulfato no carbono-4 da unidade A [→3-β-D-Galp-4-sulfato-(1→4)-α-D-Galp-(1→)].

Em função da unidade B apresentar grupos sulfato no carbono-6 ou estar na forma de 3,6-anidrogactose, e ainda na presença ou ausência de grupos sulfato no carbono-2, família κ , compreende carragenanas com estruturas ideais denominadas: κ -, ι -, μ -, ν -carragenanas.

II - A família Lambda (λ), com grupos sulfato no carbono-2 de ambas unidades, estando ainda a unidade B sulfatada em carbono-6. [\rightarrow 3- β -D-Galp-2-sulfato-(1 \rightarrow 4)- α -D-Galp-2,6-dissulfato-(1 \rightarrow)].

Dependendo da presença de somente a unidade B estar sulfatada no carbono-2 ou a unidade A estar piruvatada, três estruturas naturais aparecem: λ -, ξ - e a π -carragenanas.

Por tratamento alcalino λ -carragenana transforma-se em θ -carragenana, onde as unidades de da α -D-galactose-2,6-dissulfato são ciclizadas na forma de 3,6-anidrogactose-2-sulfato.

III - A família Beta (β) compreendem polissacarídeos em que a unidade A não é sulfatada. Incluindo β - e α -carragenanas, e seus precursores biológicos γ - e δ -carragenanas.

IV - A família ômega (ω), compreendem galactanas que apresentam grupos sulfato no carbono 6 da unidade A, podendo também estar presentes na unidade B. Nesta família está a carragenana natural ω - e seu precursor biológico ψ -carragenana (STORTZ; CERREZO, 2000).

TABELA-1 CLASSIFICAÇÃO DAS CARRAGENANAS DE ACORDO COM ESTRUTURAS IDEAIS DAS UNIDADES A E B.

Família	Unidade A – Unidade B
KAPPA	$(\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-Galp} - (1\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-Galp} - (1\rightarrow)$
κ (kappa)	4-sulfato – 3,6-anidrogactose
ι (iota)	4-sulfato – 3,6-anidrogactose-2-sulfato
μ (mu)	4-sulfato – 6-sulfato
ν (nu)	4-sulfato – 2,6-dissulfato
LAMBDA	
λ (lambda)	2-sulfato – 2,6-dissulfato
ξ (xi)	2- sulfato – 2-sulfato
π (pi)	2-sulfato; 4,6-O-(1-carboxi-etilideno) – 2-sulfato
θ (theta)	2-sulfato – 3,6-anidrogactose-2-sulfato*
OMEGA	
ω (omega)	6-sulfato – 3,6-anidrogactose
ψ (psi)	6-sulfato – 6-sulfato
BETA	
β (beta)	não-sulfatada – 3,6-anidrogactose
α (alpha)	não sulfatada – 3,6-anidrogactose-2-sulfato
γ (gamma)	não sulfatada – 6-sulfato
δ (delta)	não sulfatada – 2,6-dissulfato

*A θ -carragenana não é biossintetizada naturalmente pelas algas, para sua obtenção é necessário o tratamento alcalino da λ -carragenana.

Tabela modificada de: KNUTSEN *et al.*, 1994 e CAUDURO, 2000.

1.2.2 Agaranas

Este tipo de galactana apresenta a cadeia principal formada por unidades de (1→3)- β -D-Galp e (1→4)- α -L-Galp, portanto diferindo das carragenanas na estereoquímica da unidade B. Esta unidade pode estar na forma de seu derivado 3,6-anidrogalactose (PAINTER, 1983) (Figura-2).

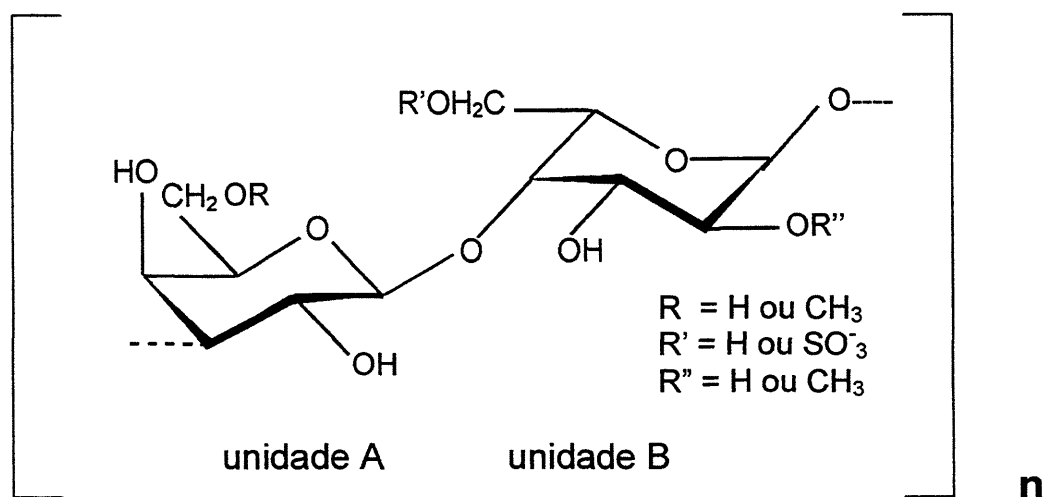


FIGURA-2 ESTRUTURA BÁSICA REPETITIVA DE AGARANAS, COM UNIDADES D- E L- ALTERNANTES.

DUCKWORTH e YAPHE, 1971, consideraram que as agaranas compreendem 3 tipos de estruturas distintas:

I - Agarose neutra, possui estrutura linear e regular constituída por unidades alternadas de D-galactose (unidade A) e 3,6-anidro- α -L-galactose (unidade B) (ARAKI; HIRASE, 1960);

II - Agarose piruvatada, apresenta baixo grau de sulfatação, e ainda possui unidades de β -D-galactose substituídas por acetal de ácido pirúvico [4,6-O-(1-carboxietilideno)].

III - Galactanas sulfatadas, apresenta aumento no grau de sulfatação da unidade B, baixa porcentagem de 3,6-anidrogalactose e de acetal de ácido pirúvico.

É comum nas galactanas do tipo agarana apresentarem grupos O-metil, principalmente em carbono-6 da unidade A e carbono-2 da unidade B.

Além das carragenanas e agaranas, algumas ordens de Rhodophyta, como por exemplo, na ordem Cryptonemiales *sensu* KYLIN, 1956, biossintetizam galactanas descritas na literatura como uma estrutura entre agarana e carragenana, onde em uma mesma molécula estão presentes estruturas típicas de carragenanas e de agaranas (KNUTSEN *et al.*, 1994). Este tipo estrutural foi denominado de híbrido-D/L por STORTZ e CEREZO, 2000, ou carrágar por CHOPIN *et al.*, 1999.

Várias famílias da ordem Gigartinales são reconhecidamente produtoras de carragenanas, e das ordens Gelidiales e Gracilariales produtoras de agaranas sendo, portanto denominadas de carragenófitas e agarófitas, respectivamente. Esta separação tem sido revista, primeiramente pelos extensivos trabalhos com algas pertencentes a outras ordens, produtoras de agarana, carragenana ou híbrido-D/L (TAKANO *et al.*, 1998). Além disso, em alguns estudos de polissacarídeos produzidos pelas algas da ordem Gigartinales, que se sabe produzem carragenanas indicam, que estas também biossintetizam pequenas quantidades de galactanas contendo L-galactose (CIANCIA, *et al.*, 1993, STORTZ *et al.*, 1997).

Provavelmente em novas pesquisas estruturais de galactanas, com um fracionamento minucioso, e determinação das unidades enantioméricas, levará ao reconhecimento de um maior número de híbridos-D/L, ou mesmo de algas produtoras de mais de um tipo de galactana. Este fato pode também ser aplicado para a reexaminação das antigas fontes de agaranas e carragenanas (STORTZ; CEREZO, 2000).

1.2 GALACTANAS DA ORDEM CRYPTONEMIALES

TABELA-2 GALACTANAS ISOLADAS DE ALGAS PERTENCENTES À ORDEM CRYPTONEMIALES.

GÊNERO/ESPÉCIE	TIPO DE GALACTANA ISOLADA	REFERÊNCIA
FAMÍLIA Endocladaceae		
<i>Endocladia muricata</i>	Híbrida-D/L	WHYTE <i>et al.</i> , 1984
Gênero <i>Gloiopeltis</i>	Agarana	PENMAN; REES, 1973
<i>G. cervicornis</i>	Agarana	PENMAN; REES, 1973
<i>G. furcata</i>	Híbrida-D/L	TAKANO <i>et al.</i> , 1998
<i>G. complanata</i>	Híbrida-D/L	TAKANO <i>et al.</i> , 1995
<i>G. coliformis</i>	Carragenana	CHOPIN <i>et al.</i> , 1999
<i>G. tenax</i>	Carragenana	CHOPIN <i>et al.</i> , 1999
FAMÍLIA Kallymeniaceae		
<i>Kallymenia reniformis</i>	Híbrida-D/L	DESLANDES <i>et al.</i> , 1990
<i>K. westii</i>	Híbrida-D/L	CHOPIN <i>et al.</i> , 1994
<i>K. berggrenii</i>	Híbrida-D/L	MILLER; FURNEAUX, 1996
<i>Velatocarpus pustulosus</i>	Agarana	USOV; KLOCHKOVA, 1992
<i>Beringia castanea</i>	Agarana	USOV; KLOCHKOVA, 1992
<i>Callophylis rhynchocarpa</i>	Carragenana	USOV; KLOCHKOVA, 1992
<i>C. cristata</i>	Híbrida-D/L	USOV; KLOCHKOVA, 1992
<i>Cirrulicarpus gmelini</i>	Híbrida-D/L	USOV; KLOCHKOVA, 1992
FAMÍLIA Halymeniaceae		
<i>Phylimena hierogyphica</i>	(Aeodana) Híbrida-D/L	PAROLIS, 1981
Gênero <i>Pachymenia</i>	complexidade estrutural	MILLER <i>et al.</i> , 1995
<i>P. lusória</i>	Híbrida-D/L	MILLER <i>et al.</i> , 1995
<i>P. carnososa</i>	Híbrida-D/L	PAROLIS, 1978
Gênero <i>Grateloupia</i>	Alta % de L-galactose	USOV; BARBAKDZE, 1978
<i>G. filicina</i>	Híbrido-D/L	ZBLACKIS; PEREZ, 1990
<i>Cryptonemia crenulata</i>	Carragenana (tipo iota)	SAITO; OLIVEIRA, 1990

As ordens Gigartinales e Cryptonemiales compreendem 60% das famílias da divisão Rhodophyta, tendo suas representantes uma maior complexidade anatômica dentre as Rhodophytas. Uma íntima relação entre alguns taxons destas ordens sempre foi notada, porém a separação em duas ordens era mantida. Um ponto de importância taxonômica que define a ordem é a posição de uma célula generativa auxiliar, que é denominada acessória para Cryptonemiales e não acessória para Gigartinales. A diferenciação da célula generativa segundo KRAFT e ROBINS,

1985, é difícil, e baseados neste problema, provisoriamente uniram a ordem Cryptonemiales a Gigartinales.

Recentemente SAUNDERS e KRAFT, 1996, sequenciaram o gene da pequena subunidade do rRNA de representantes das famílias de Dumontiaceae, Endocladaceae, Halymeniaceae, e Kallymeniaceae (ordem Cryptonemiales *sensu* KYLIN, 1956), e das famílias de Mychodeaceae, Phyllophoraceae, Schizymeniaceae, e Sebdeniaceae (ordem Gigartinales). Os autores usaram estes dados moleculares para validar a junção taxonômica da ordem Cryptonemiales à ordem Gigartinales, como proposta por KRAFT e ROBINS, com exceção das famílias Halymeniaceae e Sebdeniaceae, as quais passaram para uma nova ordem (Halymeniales). Segundo STORTZ e CERESO, 2000, esta nova ordem tem sido aceita por apenas alguns ficologistas.

Este assunto ainda permanece sem definição, e deste modo vamos adotar a nomenclatura segundo KYLIN, 1956, (ordem Cryptonemiales). A seguir serão descritas características estruturais de alguns polissacarídeos da ordem Cryptonemiales (*sensu* KYLIN, 1956), que segundo MILLER e FURNEAUX, 1996, apresentam geralmente estruturas mais complexas que agaranas ou carragenanas, as quais não foram completamente identificadas e caracterizadas, ao nível de estrutura química fina.

WHYTE *et al.*, 1984, estudando a alga *Endocladia muricata* (família Endocladaceae), identificaram um polissacarídeo, que após metanólise e análise por HPLC, era constituído principalmente por carrabiose [β -D-galactose-(1→4)-3,6-anidro- α -D-galactose], mas também com 6% de agarobiose [β -D-galactose-(1→4)-3,6-anidro- α -L-galactose], sendo caracterizada pelos autores como uma galactana híbrida-D/L.

Nesta mesma família, algas do gênero *Gloiopeltis*, têm sido classificadas como agarófitas, devido à caracterização dos seus polissacarídeos como agarana sulfatada, como por exemplo, da espécie *G. cervicornis* (PENMAN; REES, 1978).

Recentemente na espécie *G. furcata*, TAKANO *et al.*, 1997, caracterizaram um polissacarídeo com rotação óptica positiva, que por hidrólise parcial, apresentou alguns oligossacarídeos com estrutura de carragenana, e outros com estrutura de agaranas. Tal resultado levou os autores a questionarem a classificação,

mencionada anteriormente, uma vez que ambas estruturas de carragenanas e agaranas ocorrem simultaneamente.

De *G. complanata* TAKANO *et al*, 1995, isolaram um polissacarídeo com as mesmas características descritas anteriormente, sendo caracterizada pelos autores como um híbrido-D/L. Já as espécies *G. coliformis* e *G. tenax*, são produtoras de carragenanas (CHOPIN *et al*, 1999). Estes estudos demonstram a grande diversidade de tipos de galactanas sintetizadas por algas de um mesmo gênero.

De modo semelhante algas da família Kallymeniaceae, biossintetizam diferentes tipos de galactanas, como: agaranas, carragenanas e híbridos-D/L (CHOPIN *et al.*, 1999).

Em 1968, NUNN e PAROLIS utilizaram a denominação de aeodanas para designar polissacarídeos que apresentam uma estrutura semelhante a carragenanas, porém este nome aeodana foi devido ao fato, de terem sido primeiramente isoladas de algas do gênero *Aeodes*. As aeodanas apresentam uma estrutura básica de carragenana, mas pequenas quantidades de L-galactose aparecem regularmente nas unidades B, somente a unidade A apresenta grupos sulfato (principalmente em C-2, mas também em C-4), os grupos O-metil localizam-se em C-6 das unidades A, e no C-2 das unidades B, sendo que esta nunca se apresenta na forma de 3,6-anidrogalactose.

Os polissacarídeos da alga *Kallymenia reniformis* (DESLANDES *et al.*, 1990) e *K. westii* (CHOPIN *et al.*, 1994) se assemelham as aeodanas, com baixas porcentagens de 3,6-anidrogalactose e alto grau de sulfatação. A galactana de *K. berggrenii* (MILLER; FURNEAUX, 1996) apresenta na sua unidade B, D- e L-galactose em uma relação de 3:1, e relativamente altas porcentagens de 3,6-anidrogalactose e seu derivado 2-O-metilado. A *K. berggrenii* apresenta ainda, galactose, 2-O-metil-galactose, 6-O-metil-galactose, xilose e acetal de ácido pirúvico (25 ppm, no espectro de RMN de ^{13}C). O padrão de sulfatação, determinado por análise de metilação do polímero antes e após dessulfatação, demonstrou a presença de galactose 2- e 6-sulfato nas unidades A, bem como nas unidades B. Nestas últimas, parte das unidades anidrogalactosídicas apresentam sulfato no carbono-2. O padrão de sulfatação desta galactana, não foi completamente esclarecido, desde que os derivados 6-O e 2,6-di-O-metil-galactose são observados após metilação no

polímero nativo. Estes podem corresponder à galactose 2,4- e/ou 2,3- sulfato, e a galactose 4- e/ou 3- sulfato, respectivamente.

USOV e KLOCHKOVA, 1992, através de um *screening* de cinco espécies da família Kallymeniaceae, analisando os rendimentos de carrabiose e/ou agarbiose, classificaram as algas *Beringia castanea* e a *Velatocarpus pustulosus* como agarófitas, *Callophyllis rhynchocarpa* como carragenófito e *Callophyllis cristata* e a *Cirrulicarpus gmelini* como produtoras de híbridos-D/L.

Na família Dumontiaceae, foi constatado apenas polissacarídeos do tipo carragenana (CHOPIN *et al.*, 1999).

A família Halymeniaceae (antiga família Grateloupiaceae e Cryptonemiaceae), apresenta um maior número de representantes dentro da ordem Cryptonemiales. As algas pertencentes a esta família, biossintetizam galactanas semelhantes a carragenanas, porém com L-galactose em baixas porcentagens, variáveis graus de metoxilação e padrões incomuns de sulfatação (STORTZ; CEREZO, 2000). Nesta família, foram isolados polissacarídeos denominados aeodanas, obtidos pela primeira vez de algas do gênero *Aeodes* (NUNN; PAROLIS, 1968 e ALLSOBROOK *et al.*, 1971; 1974).

De acordo com PAROLIS, 1981, as aeodanas do gênero *Aeodes*, bem como as isoladas de *Phyllymenia hieroglyphica*, apresentam predominância de ligações (1→3). Uma estrutura não alternante para galactanas de algas marinhas, não foi até a presente data comprovada, desde que nenhum oligossacarídeo sem estrutura alternante foi isolado.

O gênero *Pachymenia* é representado por várias espécies, cujos polissacarídeos apresentam grande complexidade estrutural. A galactana sulfatada, isolada de *Pachymenia lusoria*, é constituída por galactose, 6-O-metil-galactose, 2-O-metil-galactose, 3,6-anidrogalactose, 2-O-metil-3,6-anidrogalactose e xilose (43; 21; 18; 10; 5 e 3 mol%, respectivamente) (MILLER *et al.*, 1995).

A configuração absoluta das unidades de galactose foi determinada na forma de (+)-2-butil-glicosídeos, seguida de análise por cromatografia líquida gasosa. Enquanto as unidades dos monossacarídeos, 6-O e 2-O-metil-galactose, pertencem exclusivamente a série D-, as unidades de D- e L-galactose estão em uma proporção de aproximadamente 4:1.

Embora, atualmente a configuração absoluta, das unidades de 3,6-anidrogactose, possa ser determinada utilizando derivado quiral (ERREA, *et al.*, 1998), os autores utilizaram hidrólise redutiva parcial, para a obtenção de oligossacarídeos contendo este anidroaçúcar. Neste tipo de hidrólise, há clivagem preferencial, das ligações glicosídicas das unidades de 3,6-anidrogactose, as quais são transformadas em 3,6-anidrogactitol. Por este método, foi isolado de *P. lusoria*, apenas agarobiitol (dissacarídeo contendo D-gactose-(1→4)-3,6-anidro-L-gactitol), e não carrabiitol (dissacarídeo contendo D-gactose-(1→4)-3,6-anidro-D-gactitol). A presença de 3,6-anidro-L-gactose, foi ainda confirmada por análise de RMN de ¹³C, pela presença do sinal 98.2 ppm, característico destas unidades em configuração do tipo L- (USOV *et al.*, 1980). Grupos sulfato estão localizados, em C-2 de todas as unidades de β-D-gactopiranoose, as quais estão parcialmente substituídas por grupos metil ou acetal de ácido pirúvico. A unidade B, deste polímero é constituída principalmente, por 2-O-metil-D-gactose (~50%), D-gactose (~25%) e L-gactose (~25%).

Posteriormente, MILLER *et al.*, 1997, analisaram a composição monossacarídica e os espectros de RMN, dos polissacarídeos de *P. lusoria*, coletada no sul e no norte da Nova Zelândia. Os polissacarídeos das algas coletadas no norte apresentam espectros de RMN, e composição monossacarídica similares, com 12-17% de 2-O-metil-gactose. O teor deste derivado nas amostras do sul foi menor (2-6%), levando os autores, a conclusão de que as amostras do sul e do norte são espécies distintas. Este estudo permitiu avaliar, que os polissacarídeos da espécie denominada de *P. laciniata*, (coletadas no norte e no sul), são idênticas as correspondentes *P. lusoria* coletadas no mesmo local. Estes resultados, de composição monossacarídica de gactanas pode auxiliar na classificação de espécies de algas marinhas, que apresentem problemas de definição taxonômica.

Espécies como *P. crassa* e *P. carosa*, que são bem definidas taxonômicamente, apresentaram composição monossacarídica diferenciada, em termo do derivado metilado, 6-O-metil-gactose (20,9 e 9,5 mol%, respectivamente, MILLER *et al.*, 1997). Enquanto os polissacarídeos, das espécies de *Pachymenia* relatadas anteriormente apresentam grupos O-metil, os de *P. himantophora* (PAROLIS, 1981), são desprovidos deste tipo de substituinte. Neste caso, a análise de composição monossacarídica é um fator importante em termos taxonômicos.

Os polissacarídeos da *Pachymenia carnosa* foram extensivamente estudados. Nos primeiros estudos desta espécie, FARRANT *et al.*, 1972, consideraram que a galactana sulfatada apresentava uma estrutura alternante. Posteriormente fundamentado nos resultados de metilação, PAROLIS, 1978, concluiu que havia um predomínio das ligações (1→3). Esta conclusão foi baseada assumindo que o derivado 2,6-di-O-metil-galactose era proveniente das unidades glicosidicamente ligadas em C-3 e sulfatadas em C-4. A análise de metilação do correspondente polímero, dessulfatado por metanólise ácida, apresentou aproximadamente iguais quantidades de 2,4,6- e 2,3,6-tri-O-metil galactose. No entanto, o autor ressalta que as unidades 3-O-substituídas, são mais susceptíveis a hidrólise por metanol-HCl, o que justificaria iguais quantidades de unidades, 3-O e 4-O-substituídas, no polímero dessulfatado.

Os polissacarídeos isolados, de algas do gênero *Grateloupia* são ricos em unidades de L-galactose, e nestes, parte das unidades B, se encontram como 3,6-anidrogalactose. Embora apresentando relativamente alta porcentagem de L-galactose, há nos polissacarídeos de algas deste gênero predominância do isômero D- (USOV; BARBAKADZE, 1978). Tal fato é explicado pelos referidos autores devido à presença de blocos de agaranas e carragenanas na mesma molécula. Ressalta-se, no entanto que nenhum oligossacarídeo de estrutura híbrida-D/L como, por exemplo, do tipo D-L-D-D, foi isolado até a presente data, muito provavelmente devido a estrutura em blocos proposta por USOV e BARBAKADZE, 1978.

A espécie *G. filicina* é utilizada como alimento, no Hawai e na Coréia. ZABLACKIS e PEREZ, 1990, utilizando algas desta espécie, coletadas no Hawai, isolaram uma galactana que apresentou 3,6-anidrogalactose (3,7%), ácido pirúvico (0,18%) e sulfato (20,4%). Através da análise do espectro de infra vermelho desta galactana, os autores concluíram que a mesma apresentava características similares a uma λ -carragenana. Estes autores ressaltam que o polissacarídeo, desta espécie estudado por PARK *et al.*, 1976, as quais foram coletadas na Coréia apresentavam 20,3% de 3,6-anidrogalactose. Tal diferença numa mesma espécie é contestada por CHOPIN *et al.*, 1994, que sugerem um estudo mais detalhado dos polissacarídeos pertencentes a esta espécie, com uma exata classificação taxonômica.

Com base, nos estudos estruturais descritos anteriormente, com diferentes espécies da ordem Cryptonemiales, *sensu* KYLIN, 1956, pode-se observar que além

de agaranas e carragenanas com distintas características estruturais, várias espécies desta ordem biossintetizam polissacarídeos do tipo híbridos-D/L, onde em uma mesma molécula são encontradas estruturas típicas de carragenanas e agaranas, o que não foi observado, pelo menos com frequência, em espécies pertencentes a outras ordens de rodófitas.

Ressalta-se ainda que muitas galactanas sulfatadas apresentam atividades antiviral (CARLUCCI *et al.*, 1999), anticoagulante (KOLENDER *et al.*, 1997) e anti-tumoral (FERNANDEZ, *et al.*, 1989). Além destas propriedades biológicas de interesse na área biomédica, muitas espécies de algas vermelhas produzem carragenanas ou agaranas com grande aplicação em diferentes setores da indústria (alimentícia, cosmética, têxtil e etc). Portanto tanto sob o aspecto de estudos de propriedades biológicas, aplicações industriais, ou mesmo de caráter taxonômico é importante o estudo da estrutura química fina dos polímeros naturalmente sulfatados isolados de algas marinhas.

1.4 *Cryptonemia crenulata*

A alga vermelha *Cryptonemia crenulata* pertence à ordem Cryptonemiales *sensu* KYLIN, 1956. Os polissacarídeos biossintetizados pelas algas vermelhas pertencentes a esta ordem apresentam grande variedade estrutural de acordo com o gênero ou mesmo em espécies de um mesmo gênero. Ressalta-se ainda que embora algumas espécies tenham sido inicialmente classificadas como apenas produtoras de agaranas, estudos posteriores demonstraram a presença de outros tipos de galactanas (como carragenanas, e/ou híbridos-D/L). Tal fato demonstra a necessidade da realização da estrutura química fina dos polissacarídeos das algas pertencentes a esta ordem.

SAITO e OLIVEIRA, 1990, preocupados com a produção de carragenanas no Brasil, uma vez que o país importa 200 toneladas de carragenanas por ano, realizaram um *screening* das algas encontradas na costa brasileira. Neste trabalho, a alga *Cryptonemia crenulata* foi classificada como produtora de iota-carragenana. Destacamos que esta conclusão foi baseada apenas em dados de espectroscopia de infra vermelho, determinação fotolorimétrica do teor de 3,6-anidrogactose e

sulfato. É importante ressaltar que este foi o único trabalho que relata a presença de uma iota-carragenana na ordem Cryptonemiales. Deste modo é importante a análise dos polissacarídeos presentes nesta espécie, a nível de estrutura química fina.

A alga vermelha *Cryptonemia crenulata*, (Figura-3), é comumente encontrada em áreas de recifes, principalmente nas regiões entre marés da costa brasileira.



FIGURA-3 FOTO DA ALGA VERMELHA *Cryptonemia crenulata*.

Posição taxonômica desta espécie:

Divisão – Rhodophyta

Classe – Rhodophyceae

Sub Classe – Florideae

Ordem – Cryptonemiales

Família - Halymeniaceae

Gênero – *Cryptonemia*

Espécie – *Cryptonemia crenulata*

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Esta tese tem como objetivo geral o estudo dos polissacarídeos solúveis em meio aquoso biossintetizados pela alga vermelha *Cryptonemia crenulata*.

2.2 Objetivos específicos

1. Extração e purificação dos polissacarídeos solúveis em meio aquoso (à temperatura ambiente e a 80°C).

2. Determinação da estrutura química fina do principal polissacarídeo purificado e homogêneo por Cromatografia de Gel Permeação (GPC - HPSEC-MALLS).

MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MÉTODOS ANALÍTICOS GERAIS

3.1.1 As dosagens de açúcares totais foram realizadas pelo método do fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS *et al.*, 1956), utilizando-se como padrão galactose na concentração de 70 µg/ml.

3.1.2 As dosagens de proteínas foram realizadas pelo método de LOWRY *et al.*, 1951, utilizando-se o reativo de Folin-Ciocalteu e solução de soro-albumina bovina cristalina como padrão na concentração de 80 µg/ml.

3.1.3 O teor de sulfato foi determinado pelo método de DODGSON, 1961, após hidrólise das amostras com HCl 1 M, 5 horas, 105°C, foi adicionado o reativo gelatina-bário (neste reativo o cloreto de bário foi solubilizado na gelatina), assim foi formado sulfato de bário que fica suspenso neste fluido. Como padrão foi utilizado solução de sulfato de sódio 360 µg de SO₄²⁻/ml, diluído em HCl 1N.

3.1.4 A determinação do teor de piruvato, após liberação deste por hidrólise com ácido oxálico 0,02M, 1 hora, 120°C, foi realizado de acordo com o método da 2,4 dinitrofenilhidrazina (KOEPEL; SHARPE, 1952), tendo como padrão ácido pirúvico 0,25 70 µM/ml.

3.1.5 A determinação da rotação óptica específica ($[\alpha]_D$) foi realizada em polarímetro RUDOLPH RESEARCH, modelo Autoplol III, a 20°C, onde a concentração das amostras foi de 0,2 g% em água.

3.2 COLETA E PROCESSAMENTO

A alga vermelha *Cryptonemia crenulata* foi coletada na Praia de Cupe, no estado de Pernambuco, pelos professores M^a Eugenia R. Duarte e Miguel Noseda, em 1999. A classificação foi realizada pelo Dr. Eurico Cordeiro (USP). Após coleta, as algas foram lavadas em água corrente, limpas manualmente, secas ao sol e moídas em moinho de faca (WILEY mill).

3.3 EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS

A alga seca e moída (27,7 g) foi submetida à extração aquosa (1,5% p/v) sob agitação mecânica, a temperatura ambiente por 4 horas e 30 minutos. O extrato obtido foi centrifugado a 10000 g por 5 minutos, ao sobrenadante foi adicionado 3 volumes de etanol e acetato de potássio, este procedimento foi executado duas vezes. Os precipitados obtidos foram reunidos e ressolubilizados em água, dialisados contra água destilada e liofilizados (C-1). À alga residual foi adicionado tampão fosfato 0,025M pH 6,5 (1,5% p/v) sob agitação mecânica, à 80°C por 6 horas. Após centrifugação (10000 g por 10 minutos) ao sobrenadante foi adicionado 3 volumes de etanol e acetato de potássio. O precipitado obtido, após centrifugação, foi ressolubilizado em água, dialisado contra solução de cloreto de sódio, água destilada e liofilizado. O processo de extração a quente foi repetido por mais duas vezes, como descrito anteriormente. Os polissacarídeos solúveis em água à 80°C obtidos na primeira e segunda extração foram reunidos obtendo-se a fração C-2, a fração C-3 é referente à terceira extração a quente .

3.4 TRATAMENTO DOS POLISSACARÍDEOS COM KCl

As frações polissacarídicas C-1 e C-2 foram solubilizadas em água (0,25% p/v) sendo adicionado KCl sólido em concentrações crescentes até a concentração de 2 M. Após repouso de 6 horas à 2°C, os extratos polissacarídicos foram centrifugados, e os respectivos sobrenadantes foram precipitados com 3 volumes de etanol, dialisados contra água destilada e liofilizados. Os polissacarídeos solúveis em

KCl 2M obtidos a partir das frações C-1 e C-2 foram denominados de C1-2N e C2-2N respectivamente.

3.5 PURIFICAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS DE *C. crenulata* POR CROMATOGRAFIA DE TROCA-IÔNICA.

A fração polissacarídica C2-2N, solúvel em KCl 2M, foi submetida a fracionamento através de cromatografia de troca-iônica em coluna contendo DEAE-Sephacel, utilizando-se eluição por gradiente salino: 1 - água, 2 - solução de NaCl de 0,5; 1,0 e 1,5 M.

A eluição foi monitorada pelo teste do fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS *et al.*, 1956). Foram obtidas as frações denominadas de C2w, C2m, C2u e C2um, as quais foram eluídas com água, 0,5 M de NaCl, 1,0 M de NaCl e 1,5 M de NaCl, respectivamente.

3.6 HIDRÓLISE ÁCIDA TOTAL DO TIPO HIDRÓLISE REDUTIVA

As frações foram hidrolisadas de acordo com o método de STEVENSON e FURNEAUX, 1991, o qual se processa em duas etapas:

- A primeira, utilizando-se ácido trifluoroacético (TFA) na concentração de 3M, e um agente redutor, complexo borano 4-metil-morfolina, o qual possui estabilidade em meio reacional ácido, à temperatura de 80°C por 15 minutos, com a finalidade de reduzir as unidades de 3,6-anidrogactopirranose, protegendo-as da degradação em meio ácido;

- A segunda etapa, a concentração do TFA é ajustada para 2M pela adição da solução do complexo borano 4-metil-morfolina, à temperatura de 120°C por 90 minutos. Nesta condição há hidrólise das ligações glicosídicas envolvendo as demais unidades constituintes do polissacarídeo, as quais por sua vez serão também reduzidas.

Os correspondentes alditóis foram acetilados (anidrido acético/TFA concentrado, a 50°C por 15 minutos) e analisados na forma de acetatos de alditóis

por cromatografia líquido-gasosa (CLG) e/ou CLG-EM (cromatografia líquido-gasosa - espectrometria de massa).

3.7 HIDRÓLISE ÁCIDA TOTAL

A fração C2u também foi submetida sequencialmente a hidrólise ácida total (ácido fórmico 45%, 100°C, 16 h), redução com NaBD₄ (12 h) e acetilação (anidrido acético 0,4 g%, 120°C, 1,5 h), seguida por análise por CLG-EM com o objetivo de diferenciação de derivados simétricos (3-O e 4-O-metil-galactose).

3.8 METILAÇÃO

O processo de metilação do polissacarídeo na forma de sal de trietilamônio foi conduzido de acordo com o método de CIUCANU e KEREK, 1984. Após solubilização em DMSO (1 ml para cada 15 mg de polissacarídeo) foi adicionado NaOH pulverizado (30 mg) e após agitação mecânica vigorosa (20 minutos), foi adicionado iodometano (0,1 ml) sob agitação mecânica vigorosa (20 minutos). Este processo (adição de NaOH e iodometano) foi repetido por mais 2 vezes completando-se assim a primeira etapa de metilação. A fração nativa C2u foi submetida a 4 etapas de metilação, a C2ud passou por 2 etapas e a C2uT por 3 etapas de metilação, entre cada etapa as frações foram dialisadas e liofilizadas para então serem novamente metiladas. Após cada etapa de metilação as frações polissacarídicas foram hidrolisadas de acordo com o método de STEVENSON e FURNEAUX, 1991, acetiladas (anidrido acético/TFA concentrado, a 50°C por 15 minutos) e analisadas por CLG e/ou CLG-EM, na forma de acetatos de alditóis parcialmente metilados.

3.9 DESSULFATAÇÃO POR TRATAMENTO SOLVOLÍTICO

3.9.1 Preparo do Sal de Piridônio

O processo de solvólise foi conduzido com os polissacarídeos na forma de sal de piridônio. Para se formar este sal, as frações foram solubilizadas em água e então foi adicionado resina catiônica DOWEX 50x8 na forma H^+ , sob agitação magnética à temperatura ambiente por 30 minutos. O pH do sobrenadante ficou entre 1-2. O filtrado (obtido por filtração à pressão reduzida) foi neutralizado (em capela) com piridina, até pH 7,0 e liofilizado (NAGASAWA *et al.*, 1979).

3.9.2 Solvólise

O polissacarídeo, na forma de sal de piridônio, foi solubilizado em uma mistura de dimetilsulfóxido, metanol e piridina, cuja proporção foi de 89:10:1, 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, a fração solvolisada foi submetida à diálise exaustiva contra água destilada e liofilizada. O polissacarídeo dessulfatado foi submetido à metilação conforme descrito no item 3.8.

3.10 TRATAMENTO ALCALINO

Desde que o tratamento solvolítico remove os grupos sulfatos, de maneira inespecífica, foi também realizada a dessulfatação seletiva dos grupos sulfato em C-6 (unidade B) por tratamento alcalino (NOSEDA; CERREZO, 1995).

As frações foram solubilizadas em água destilada (0,2 g%), reduzidas com boridreto de sódio (10% em relação à massa do polissacarídeo), e mantida em repouso por 12 horas a 4°C. Posteriormente, adicionou-se hidróxido de sódio 3 M

(concentração final 1 M) e a mistura foi mantida em banho termostatizado a 80°C por 2 horas (NOSEDA; CERREZO, 1995).

A reação foi monitorada pela determinação do teor de 3,6-anidrogactose, até alcançar valor constante, através do método do resorcinol (YAPHE, 1960).

Após resfriamento, diálise, e liofilização, a amostra foi submetida à hidrólise redutiva segundo STEVENSON e FURNEAUX, 1991, e analisadas por CLG e/ou CLG-EM na forma de acetatos de alditóis, esta amostra também foi metilada como descrito no item 3.8.

3.11 DETERMINAÇÃO DA CONFIGURAÇÃO ENANTIOMÉRICA

As determinações das configurações enantioméricas e as quantificações das unidades de D- e L-gactose (frações C-3, C1-2N e C2-2N), e de 2-O-metil-gactose (frações C-1, C-2 e C-3) foram realizadas pelo método descrito por CASES *et al.*, 1995. Nesta metodologia os polissacarídeos sofrem uma aminação redutiva, na presença do álcool quiral (S)-1-amino-2-propanol, e acetilação, formando assim seus derivados 1-deoxi(2-hidroxipropilamina) alditóis, que são separados e quantificados por CLG. Para o derivado 2-O-metilgactose o amino álcool é substituído por (S)- α -metilbenzilamina.

Para a determinação de D- e L- 3,6-anidrogactose (frações C1-2N, C2-2N, C-3, C2w, C2m, C2u e C2um), foi utilizado o método descrito por ERREA *et al.*, 1998, onde o polissacarídeo é submetido a uma hidrólise oxidativa parcial, para a obtenção dos correspondentes ácidos 3,6-anidroaldônicos, os quais são convertidos a *séc*-butil ésteres diastereoisoméricos acetilados, que são quantificados por CLG, (coluna SP-2330).

Estas derivatizações e análises foram realizadas pela Dr^a. Marina Ciancia do Departamento de Química Orgânica da Universidad de Buenos Aires (UBA), com a qual o grupo de química de carboidratos – Algas Marinhas (UFPR), mantém colaboração científica.

3.12 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

3.12.1 Cromatografia Líquido-Gasosa

As análises por cromatografia 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 (30m X 0,25 mm d.i.), revestida com DB-225 (0,25 µm), em diferentes temperaturas: análises cromatográficas para acetatos de alditóis foram realizadas à 220°C, e as amostras de acetatos de alditóis parcialmente metilados foram realizadas à 210°C.

3.12.2 Cromatografia Líquido-Gasosa acoplada à Espectrometria de Massa (CLG-EM)

As análises cromatográficas em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa foram realizadas em um cromatógrafo a gás "VARIAN", modelo 3.300, acoplado a um espectrômetro de massa de marca FINNIGAN MAT, modelo ITD 800, equipado com coluna capilar de sílica fundida (30 m X 0,25 d.i.) modelo DB-225, marca J.W. As injeções nas colunas foram feitas mantendo-se a temperatura inicial em 50°C, por minuto, seguido de aumento de acordo com a programação de temperatura em um gradiente de 40°C por minuto, até 230°C, mantendo-se constante a partir deste valor. Utilizou-se gás hélio como gás de arraste, com fluxo de 1 ml.min⁻¹. As áreas dos picos de interesse foram determinadas por integração em software. Os espectros de massa foram obtidos por impacto de elétrons a 70 meV, repetidamente a cada 1/8 de segundo, de m/e (relação carga/massa) 90 a 220. Este método foi utilizado para quantificação de acetatos de alditóis (SLONEKER, 1972), sendo identificados por meio de seus tempos de retenção e perfis característicos de fragmentação por impacto de elétrons (JANSSON *et al.*, 1976), comparado com padrões.

3.12.3 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 NaNO_3 0,1M e azida de sódio (NaN_3) 200 ppm, foram previamente filtradas em membranas millipore 0,45 μm e armazenadas em frascos viais rigorosamente limpos. As análises 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 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ e pressão de 67 psi a 20°C.

Para as análises de homogeneidade e de determinação da massa molecular ponderal média (M_w), preparou-se uma solução de 2 mg da amostra em 1 ml de nitrito de sódio (NaNO_3 0,1M) e azida de sódio (NaN_3 200 ppm) 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 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Para a determinação da massa molecular ponderal média utilizou-se o valor de dn/dc anteriormente obtido juntamente à análise de homogeneidade.

As análises de homogeneidade e de M_w 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) WYATT 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 $1\cdot 10^6$, $4\cdot 10^5$, $8\cdot 10^4$ e $5\cdot 10^3$, em série. O eluente utilizado foi uma solução de (NaNO_3 0,1M) contendo NaN_3 (200 ppm), pressão de 920 psi a 20°C.

Utilizou-se o programa ASTRA (WYATT 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 $K = (2\pi^2 n^2 / \lambda_0^4 N) / (dn/dc)^2$

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

$$R_\theta = \frac{G_\theta \cdot D}{G_0 \cdot \sigma' \cdot 1'}$$

Onde G_θ é a intensidade relativa correspondente ao feixe espalhado, G_0 a intensidade relativa correspondente ao feixe incidente, D , σ' , $1'$ são constantes do aparelho.

3.13 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, 100 K aquisições. Utilizou-se intervalo de 0,1 segundo entre os pulsos. As amostras foram dissolvidas em D_2O ($\sim 40 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$) 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 ($\delta = 30,2$).

3.14 ESPECTROSCOPIA DE INFRA VERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FT-IR)

Os espectros FT-IR foram obtidos pelo uso de espectrometro BOMMEN, modelo MB-100, incorporado a Transformada de Fourier. As amostras (2 mg) foram homogeneizadas com brometo de potássio (KBr) e analisadas sob a forma de pastilhas.

As análises de FT-IR foram realizadas no Departamento de Química da UFPR.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

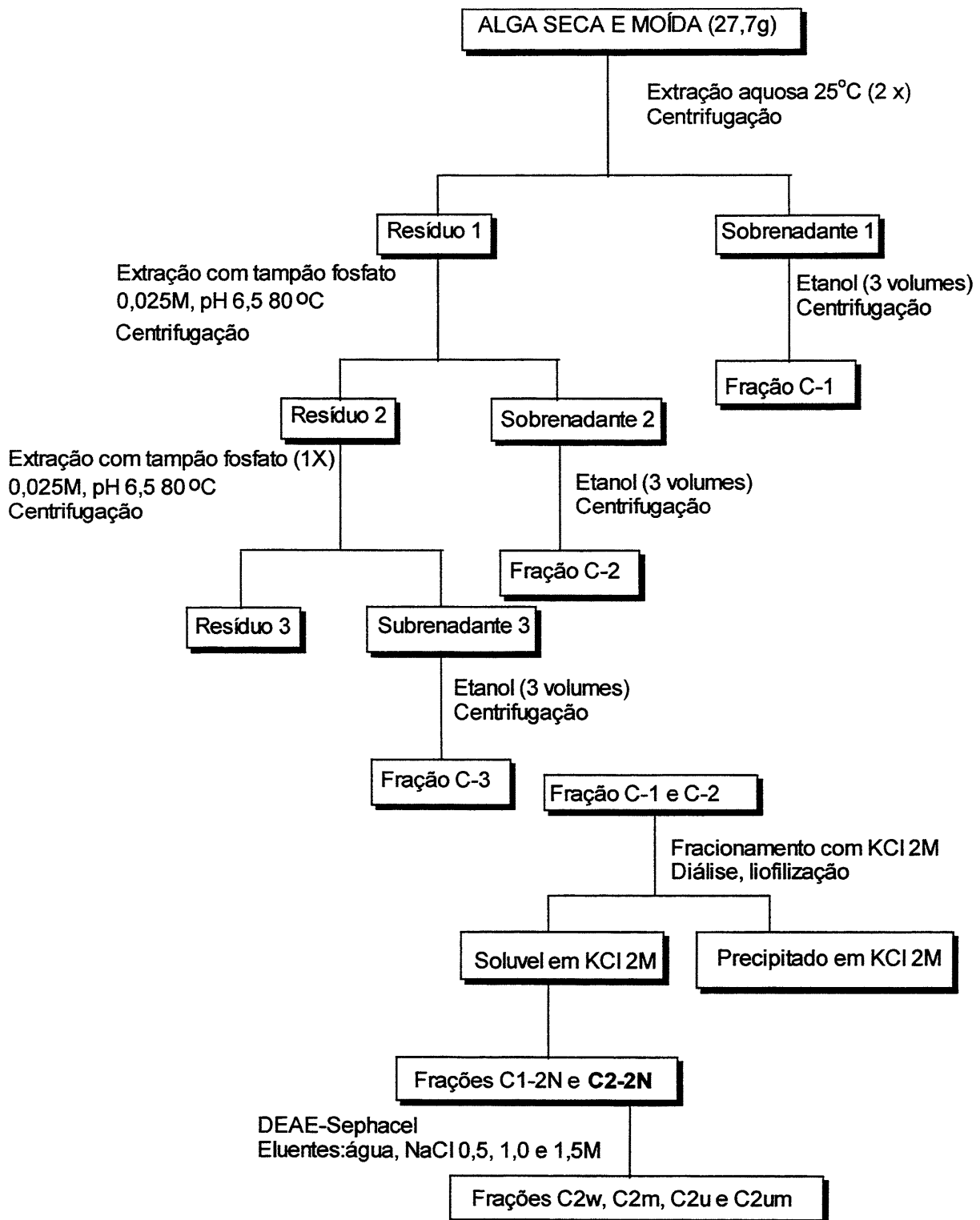
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A macroalga vermelha *Cryptonemia crenulata*, pertencente a ordem Cryptonemiales coletada na Praia de Cupe - PE, foi submetida a extração aquosa a temperatura ambiente (25°C) (duas vezes). Após centrifugação os sobrenadantes aquosos foram reunidos, e tratados com etanol (3 volumes), precipitando assim os polissacarídeos solúveis em água à temperatura ambiente. Após diálise e liofilização esta fração foi denominada de C-1, representando 4% do material inicial (Esquema-1, Tabela-3).

Seqüencialmente a alga residual (Resíduo-1, Esquema-1) foi submetida à extração aquosa à temperatura de 80°C (3 vezes), utilizando como solvente tampão fosfato 0,025M pH 6,5. A utilização deste tipo de tampão também tem sido utilizada por MILLER *et al.*, 1995, para extração a quente de polissacarídeos de algas da ordem Cryptonemiales, com a finalidade de se evitar o processo de autohidrólise. Este processo pode ocorrer com polissacarídeos ácidos, (contendo ácido urônico, grupos sulfato ou fosfato), que em solução aquosa apresentam pH entre 1,5 a 3,0. Para que a autohidrólise aconteça, o polissacarídeo deve apresentar uma ligação glicosídica lábil entre outras mais estáveis. Estas condições são reunidas nas galactanas que apresentam um alto grau de substituição por grupos sulfato assim como ligações 3,6-anidrogalactosídicas (lábeis em meio ácido), alternadas com ligações galactosídicas mais estáveis em meio ácido (NOSEDA, 1994).

Cada um dos extratos obtidos a 80°C foi centrifugado, concentrado parcialmente à pressão reduzida e tratado com etanol (3 volumes). Os precipitados da 1ª e 2ª extração a quente, foi denominado de C-2 (6,8% de rendimento), enquanto a obtida da 3ª extração a quente de C-3 (1,1% de rendimento) (Tabela-3). O rendimento total em polissacarídeos solúveis em meio aquoso de *C. crenulata* foi de aproximadamente 12,0%, valor este compatível com o obtido para outras algas da ordem Cryptonemiales (CHOPIN *et al.*, 1994). O teor de grupos sulfato nas frações brutas C-1 a C-3 foi de 22-42% (Tabela-3). O grau de substituição por grupos sulfato em outras galactanas de algas da ordem Cryptonemiales esta na média de 25%, sendo que em *Kallymenia reniformis* e *Pachymenia carnososa* são observados as maiores porcentagens (37 e 32,5%, respectivamente) (CHOPIN *et al.*, 1994).

ESQUEMA-1 EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS OBTIDOS DA ALGA VERMELHA *Cryptonemia crenulata*.



Estes mesmos autores (CHOPIN *et al.*, 1994), comparam o valor de rotação óptica específica de galactanas de várias espécies de Cryptonemiales, quase a totalidade, destes polissacarídeos investigados, apresentam valores de rotação óptica específica positiva (+32 a +118°), com exceção de duas espécies de *Gloiopeltis*, cujos valores foram negativos (-30 e -20,6°). Como pode ser observado os valores obtidos para as frações C-1 a C-3 de *C. crenulata* foram positivos (Tabela-3), indicando a presença de monossacarídeos da série D-.

TABELA-3 RENDIMENTO E ANÁLISE QUÍMICA DAS FRAÇÕES DE *C. crenulata*, APÓS EXTRAÇÃO AQUOSA À TEMPERATURA DE 25°C E 80°C.

Fração	Peso (g)	Rendimento (%)	Carboidrato (%) ^c	Sulfato NaSO ₃ (%) ^d	Proteína (%) ^e	[α] _D ^f
C-1 ^a	1,1	4,0	44,6	22,0	8,4	+71,5
C-2 ^b	1,9	6,8	59,3	34,3	4,8	+42,5
C-3 ^b	0,3	1,1	49,2	42,0	0,9	+32,0

a= C-1 fração obtida da extração aquosa à temperatura ambiente;

b= C-2 e C-3 são frações obtidas a partir de extrações à temperatura de 80°C;

c, d, e= determinado pelos métodos: fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS *et al.*, 1956), DODGSON (1961) e LOWRY *et al.*, 1951, respectivamente.

f= rotação óptica específica foi determinada em água com as frações polissacarídicas na concentração de 0,2 g% à temperatura de 20°C.

A análise de composição monossacarídica das galactanas de *C. crenulata* foram realizadas pelo processo de hidrólise reductiva, como descrito por STEVENSON e FURNEAUX, 1991. Devido a maior labilidade das ligações glicosídicas das unidades de 3,6-anidrogactose, este processo se desenvolve em duas etapas:

a) a primeira etapa de hidrólise se realiza em condições relativamente brandas (80°C, TFA na concentração de 3M, 15 minutos), na presença do agente redutor (complexo borano 4-metil-morfolina). Desta maneira as ligações glicosídicas das unidades de 3,6-anidrogactose que são mais lábeis a meio ácido são

hidrolisadas havendo concomitantemente a redução destas unidades à 3,6-anidrogactitol (estável em meio ácido).

b) na segunda etapa hidrolítica, a temperatura e o tempo são elevados (120°C, TFA 2M, 90 minutos), com a finalidade de rompimento das ligações glicosídicas envolvendo outros tipos de monossacarídeos, os quais são também reduzidos aos seus correspondentes alditóis, pela adição de outra alíquota do complexo borano 4-metil-morfolina.

Deste modo podem ser quantificadas conjuntamente por análise de CLG, as unidades de anidrogactose (3,6-anidrogactose e 2-O-metil-3,6-anidrogactose) e as outras unidades monossacarídicas.

Utilizando o processo de hidrólise redutiva, as análises de composição monossacarídica (Tabela-4) demonstraram que as frações sulfatadas (Tabela-3) C-1, C-2 e C-3, são constituídas principalmente por gactose (62,2 - 69,4 moles%) e 3,6-anidrogactose (6,8 - 10,6 moles%), 2-O-metil-3,6-anidrogactose (5,5 – 8,2 moles%) e 2-O-metil-gactose (5,9 – 8,8 moles%). Outros monossacarídeos monometilados (6-O-metil-gactose, 3-O- e/ou 4-O-metil-gactose) e xilose são observados em baixas porcentagens. Manose e gucose são provenientes de contaminação por mananas e glucanas (florideanas das algas vermelhas).

As gactanas de algas vermelhas possuem quantidades variáveis de 3,6-anidrogactose, e que pode chegar até um máximo de 50%, como na agarose (DUCKWORTH; YAPHE, 1971). Na ordem Cryptonemiales o maior conteúdo deste anidroaçúcar foi encontrado na espécie *Tichocarpus crinitus* que apresentou 27,3% (USOV; ARKIPOVA, 1981). Nas outras espécies já estudadas ocorre uma variação de (0,1 – 15,0%) (CHOPIN *et al.*, 1994). Portanto os valores obtidos para as frações da espécie *C. crenulata*, C-1 a C-3 (12,3-18,8 moles %) estão na média das obtidas com polissacarídeos de outras Cryptonemiales.

O derivado 2-O-metil-gactose, tem sido encontrado em várias espécies de algas pertencentes à ordem Cryptonemiales. Como a gactana isolada de *Pachymenia lusoria* (MILLER *et al.*, 1995), que apresenta aproximadamente 50% da unidade B constituída por 2-O-metil-gactose, sendo que este derivado se encontra em iguais proporções de -D e -L.

TABELA-4 ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES C-1, C-2 E C-3 DA ALGA *C. crenulata*.

Fração ^b	Monossacarídeos (mol%) ^a								
	2AG ^c	AG	Xil	2MeGal D - L	3/4MeGal	6MeGal	Gal	Man	Glc
C-1	5,5	6,8	2,9	7,5-1,3	1,0	-	69,4	0,8	4,8
C-2	7,4	9,5	3,0	4,6-1,4	1,1	1,3	64,1	0,5	7,3
C-3	8,2	10,6	3,0	4,5-1,4	0,6	2,4	62,2	0,2	6,9

a= Monossacarídeos quantificados em moles%, na forma de acetato de alditóis, por C.G.-E.M. (STEVENSON; FURNEAUX, 1991);

b= C-1, fração obtida a 25°C, C-2 e C-3 obtidas à 80°C;

c= abreviatura dos monossacarídeos (2AG= 2-O-metil-3,6-anidrogalactose; AG= 3,6-anidrogalactose; Xil= Xilose; 2MeGal= 2-O-metil-galactose; 3/4MeGal= 3-O- e/ou 4-O-metil-galactose; 6MeGal= 6-O-metil-galactose; Gal= galactose; Man= manose; Glc= glucose).

Este monossacarídeo (2-O-metil-galactose) se mostrou muito importante, na análise da composição monossacarídica dos polissacarídeos de *Pachymenia lusoria* coletada no sul e no norte da Nova Zelândia (MILLER *et al.*, 1997). As algas coletadas no norte apresentaram um teor elevado de 2-O-metil-galactose (12-17%), em comparação as espécies coletadas no sul (2-6%). Esta diferença levou os autores a concluir que se tratava de duas espécies distintas.

Os polissacarídeos de *P. crassa* e de *P. carmosa* (MILLER *et al.*, 1997), que apresentaram 18,5 e 18,6% de 2-O-metil-galactose, foram diferenciadas pelo conteúdo de outro derivado monometilado (6-O-metil-galactose).

A galactana da alga *Kallymenia berggrenii* (MILLER; FURNEAUX, 1996), apresentou na unidade B, D- e L-galactose na proporção (3:1), além de 1 mol% de 2-O-metil-galactose, 6-O-metil-galactose (5 moles%), e 3,6-anidrogalactose (25 moles %). A presença dos derivados monometilados (2-O e 6-O-metil-galactose) é importante, para distinguir a galactana desta espécie com a da alga *K. westii* (CHOPIN *et al.*, 1994). Esta última não apresenta derivados monometilados na sua composição monossacarídica.

O teor de 2-O-metil-galactose encontrado para as galactanas brutas de *C. crenulata* poderá ter valor taxonômico, a partir da investigação de polissacarídeos de outras espécies de um mesmo gênero.

Para uma análise mais detalhada do valor taxonômico de unidades de 2-O-metil-galactose em Cryptonemiales, também deve ser levado em consideração se este monossacarídeo, que é pertencente a unidade B, é da série D- e/ou L-. As frações brutas C-1 a C-3 de *C. crenulata* apresentam os dois tipos de isômeros (Tabela-4). O polissacarídeo de *Pachymenia lusoria*, obtido de maneira semelhante, (extração com tampão fosfato), aos extratos C-2 e C-3, apresentam apenas o isômero D- (MILLER *et al.*, 1995), enquanto que em *Grateloupia elliptica* as unidades de de 2-O-metil-galactose pertencem a série L- (CHOPIN *et al.*, 1994).

Com a finalidade de purificar as galactanas brutas de *C. crenulata*, foi realizado um tratamento com solução de cloreto de potássio.

As frações C-1 e C-2, foram solubilizadas em água destilada na concentração de 0,25 g% e tratadas com KCl, com um aumento gradual do sal, até a concentração de 2M. Esta metodologia de fracionamento foi primeiramente descrita por CERZO, 1967, que realizou o fracionamento de um sistema de galactanas da alga *Gigartina skottsbergii* (Gigartinales), deste modo foram isoladas diversas frações que precipitavam em diferentes concentrações de KCl. Para as galactanas C-1 e C-2 quase a totalidade dos polissacarídeos permaneceram solúveis em KCl 2M, frações C1-2N e C2-2N, respectivamente. Estas frações correspondem a 93,8 e 97,5% do material submetido ao fracionamento com KCl (Tabela-5). As respectivas frações insolúveis não foram investigadas no presente trabalho.

A fração C2-2N apresentou 5,3% de ácido pirúvico dosado pelo método da 2,4-dinitrofenilhidrazina (KOEPSELL; SHARPE, 1952). A presença do acetal de ácido pirúvico, nas duas frações, foi confirmado por análise de RMN de ^{13}C , como descrito a seguir (Figuras 5 e 6).

TABELA-5 RENDIMENTO E ANÁLISE QUÍMICA DAS FRAÇÕES DE *C. crenulata*, SOLÚVEIS EM KCl 2M APARTIR DE C-1 E C-2.

Fração	Rendimento (%) ^a	Carboidrato (%) ^b	Sulfato NaSO ₃ (%) ^c	Proteína (%) ^d	Ac. Pirúvico (%) ^e	[α] _D ^f
C1-2N	93,8	63,8	26,0	4,5	n.d.	n.d.
C2-2N	97,5	63,0	27,7	1,5	5,3	+27,0

a= rendimento calculado em relação aos extratos brutos (C-1 e C-2), submetidos ao tratamento com KCl, na concentração de 0,25 g%;

b, c, d, e= determinado pelos métodos: fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS *et al.*, 1956), DODGSON (1961), LOWRY *et al.*, 1951 e 2,4-dinitrofenilhidrazina (KOESELL; SHARPE, 1952) respectivamente.

f= rotação óptica específica foi determinada em água com as frações polissacarídicas na concentração de 0,2 g%.

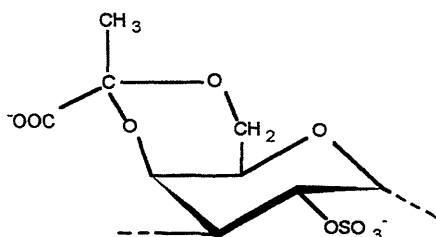
n.d= não determinado.

O ácido pirúvico ligado como acetal cíclico a um resíduo glicosil, é comum em polissacarídeos extracelulares de bactérias. Frequentemente se encontra ligado ao carbono-4 e carbono-6 de unidades de D-glucopiranosose, D-manopiranosose ou D-galactopiranosose. Estes resíduos podem ser terminais ou estarem no meio da cadeia. Os polissacarídeos extracelulares de bactérias são frequentemente ativos imunologicamente, portanto o acetal de ácido pirúvico pode ter uma função importante na região imunodominante (GAREGG *et al.*, 1980).

Este substituinte (acetal de ácido pirúvico), tem sido também encontrado em polissacarídeos de origem animal (GORIN *et al.*, 1982), bem como em polissacarídeos de algas vermelhas (CHIOVITTI *et al.*, 1997; CHIOVITTI *et al.*, 1998; NOSEDA *et al.*, 2000b).

Embora este substituinte seja mais freqüente em agaranas, algumas carragenanas como as obtidas do gênero *Callophycus* (CHIOVITTI *et al.*, 1997) são altamente piruvatados (8-10%), bem como a de *Sarconema filiforme* (~6%) (CHIOVITTI *et al.*, 1998), o qual esta presente como 4,6-O-(1-carboxietilideno)-β-D-galactopiranosose (unidade A) (Figura-4).

FIGURA-4 ESTRUTURA DE UMA UNIDADE DE β -D-GALACTOPIRANOSE ESTERIFICADA EM SEUS CARBONOS 4 E 6 POR ACETAL DE ÁCIDO PIRÚVICO.



Na galactana isolada de *Stenogramme interrupta* (MILLER, 1998), o acetal de ácido pirúvico, determinado por RMN de ^{13}C foi utilizado como critério quimiotaxonômico para a classificação de algas da família Phylophoraceae.

TABELA-6 ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES DE *C. crenulata* SOLÚVEIS EM KCl 2M.

Fração	Monossacarídeos (mol%) ^a								
	2AG ^b	AG D - L	Xil	2MeGal	3/4MeGal	6MeGal	Gal D - L	Man	Glc
C1-2N	5,0	6,4-1,2	3,4	8,1	2,5	1,5	58-9,9	-	3,8
C2-2N	6,2	2,0-7,1	2,9	5,8	1,7	1,4	57,7-9,8	-	5,4

a= Monossacarídeos quantificados em moles%, na forma de acetato de alditóis, por C.G.-E.M. (STEVENSON; FURNEAUX, 1991);

b= abreviatura dos monossacarídeos (2AG = 2-O-metil-3,6-anidrogalactose; AG = 3,6-anidrogalactose; Xil = Xilose; 2MeGal = 2-O-metil-galactose; 3/4MeGal = 3 e/ou 4-O-metil-galactose; 6MeGal = 6-O-metil-galactose; Gal = galactose; Man = manose; Glc = glucose).

Como pode ser observado pelos resultados comparativos, após o tratamento com KCl houve uma diminuição do teor de proteínas (Tabelas 3 e 5) e de glicose (Tabelas 4 e 6).

As análises de composição monossacarídicas demonstram que as frações solúveis em KCl 2M, C1-2N e C2-2N, são constituídas principalmente de galactose (67,9 e 67,5 moles%) e 3,6-anidrogactose juntamente com o seu derivado 2-O-metilado (12,6-15,3 moles%), como também apresentou as frações que lhe deram origem C-1 e C-2.

A presença de glicose é freqüente nas galactanas obtidas a partir das algas vermelhas, em função da contaminação pelo amido das Rodophytas (USOV, 1992). Pode-se reduzir este contaminante, se tratar o extrato com enzima aminoglicosidase (MILLER; FURNEAUX, 1997). Como os polissacarídeos de *Cryptonemia crenulata* não apresentam quantidades significativas de glicose, este tratamento não foi realizado.

As figuras 5 e 6, mostram os espectros de RMN de ^{13}C das frações obtidas após tratamento de KCl 2M (C1-2N e C2-2N).

É possível observar a grande heterogeneidade química destas frações em função do grande número de sinais, e em alguns casos seu alargamento.

Na região anomérica (90-110 ppm) dos espectros das frações C1-2N e C2-2N, percebe-se que existe um mesmo grupo de sinais (96,0-103,0 ppm), decorrentes da semelhança de composição monossacarídica das frações (Tabela-6). Para o sinal em 107,9 ppm (no espectro de C1-2N), não foi feita uma atribuição, podendo, no entanto, ser resultante da presença de unidades furanosídicas, ou ser proveniente da substituição por acetal de ácido pirúvico esterificando os carbonos 3 e 4 de unidades de galactose, o que será investigado posteriormente.

Embora a dosagem de ácido pirúvico tenha sido realizada apenas na fração C2-2N (Tabela-5), pode-se observar que nos espectros de RMN de ^{13}C , tanto desta como da fração C1-2N, os sinais em 25,0 ppm, e em 175,4 ppm, referente ao grupo metil (CH_3 -) e ao grupo carbonila ($-\text{C}=\text{O}$), de acetal de ácido pirúvico, respectivamente, (GAREGG *et al.*, 1979; CHIOVITTI *et al.*, 1997).

FIGURA-5 ESPECTRO DE RMN[#] de ¹³C DO EXTRATO C1-2N DE *C. crenulata*.

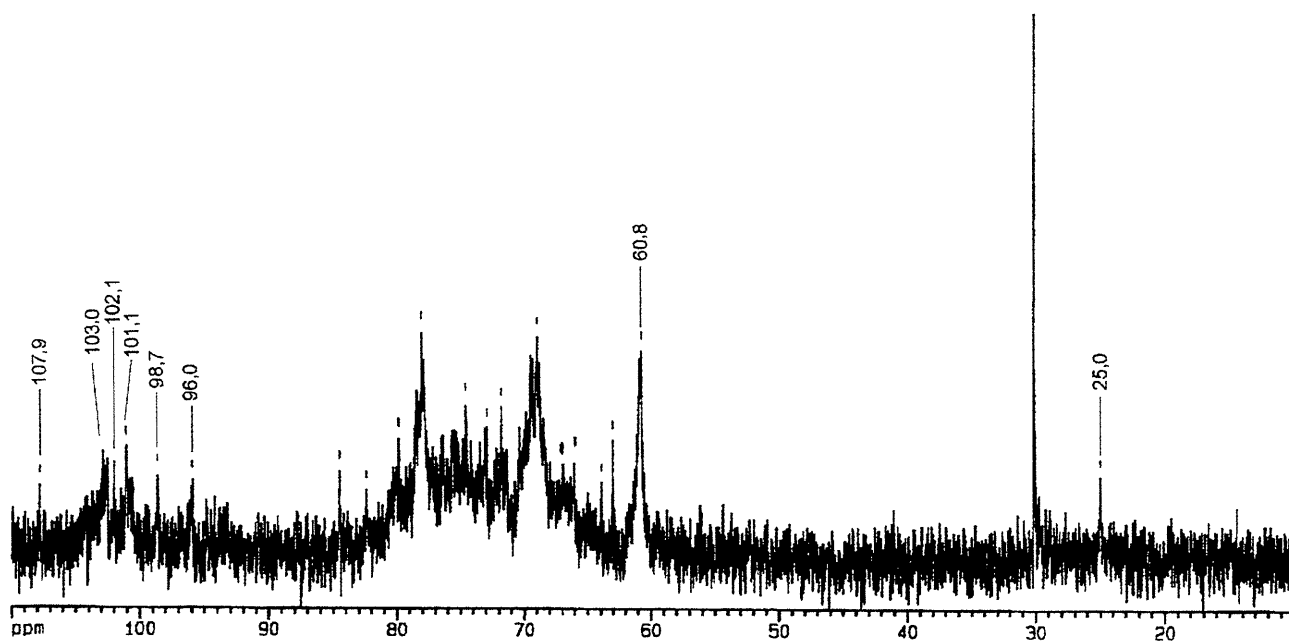
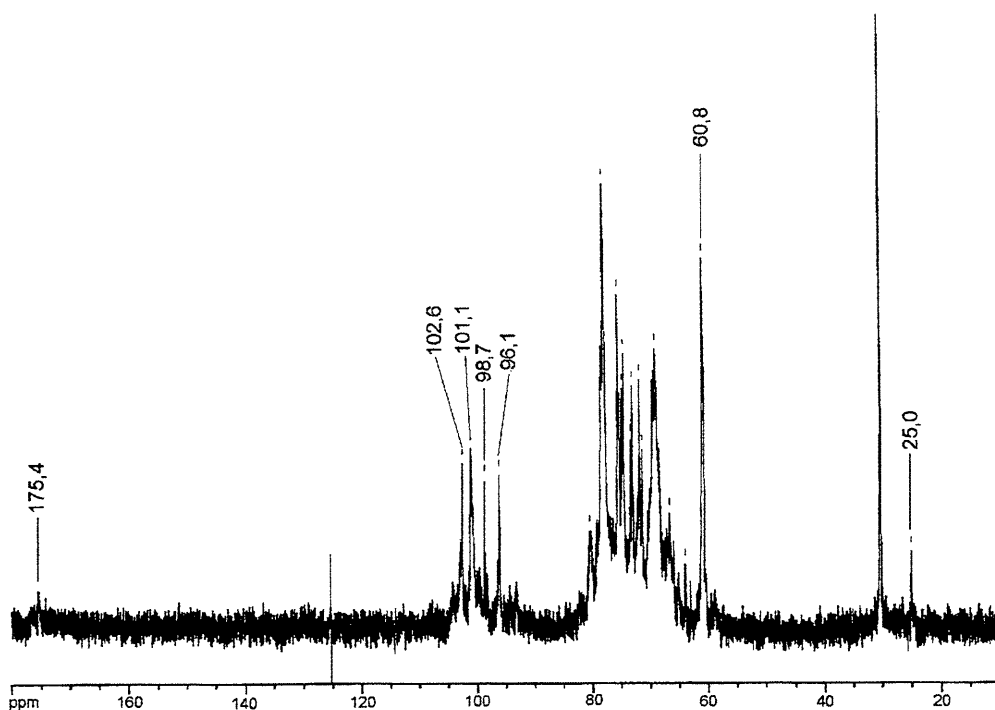


FIGURA-6 ESPECTRO DE ¹³C-RMN[#] DO EXTRATO C2-2N DE *C. crenulata*.



#Análises realizadas à 60°C em D₂O, calibração com acetona como padrão interno (30,2 ppm). Concentração das amostras 40 mg.ml⁻¹.

A fração C2-2N foi selecionada para o prosseguimento deste trabalho. Devido ao seu caráter heterogêneo, a fração C2-2N foi submetida à cromatografia de troca-iônica em DEAE-Sephacel. Foram utilizados como eluentes: água e soluções de NaCl (0,5, 1,0 e 1,5M) (Tabela-7).

TABELA-7 RENDIMENTO E ANÁLISE DOS POLISSACARÍDEOS OBTIDOS POR CROMATOLOGRAFIA DE TROCA-IÔNICA DE C2-2N DE *C. crenulata*.

Subfração*	Eluente	Rend (%) ^a	Carboidrato (%) ^b	Sulfato NaSO ₃ (%) ^c	Proteína (%) ^d	Ác.Pirúvico (%) ^e	[α] _D ^f
C2w	H ₂ O	3,2	67,3	20,1	4,8	n.d.	+11,0
C2m	NaCl 0,5M	24,0	69,2	25,1	1,9	3,3	+6,5
C2u	NaCl 1,0M	54,2	61,0	28,3	0,5	2,8	+23,5
C2um	NaCl 1,5M	3,3	69,3	17,5	2,1	n.d.	+4,0

a= rendimento calculado em relação à quantidade de C2-2N, recuperada após o fracionamento em DEAE-Sephacel (1,200g);

b, c, d, e= determinado pelos métodos: fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS *et al.*, 1956), DODGSON (1961), LOWRY *et al.*, 1951 e 2,4-dinitrofenilhidrazina (KOEPESELL; SHARPE, 1952), respectivamente.

f= rotação óptica específica foi determinada em água com as frações polissacarídicas na concentração de 0,2 g%.

Em relação ao fracionamento do extrato C2-2N por cromatografia, observa-se que as frações eluídas com 0,5M de NaCl (C2m) e com 1,0M de NaCl (C2u) apresentaram maior rendimento (24,0 e 54,2%, respectivamente) em relação as outras frações.

O valor de rotação óptica específica de carragenanas está em torno de +70°, devido a presença de isômeros D-, enquanto que para agaranas valores entre -70 e -40 são observados (NOSEDA *et al.*, 1999). As frações C2m e C2u apresentaram rotações ópticas de (+6,5 e +23,5, respectivamente), estes valores positivos, mais no entanto baixo, indicam que nestas galactanas há um predomínio de unidades D-, mais também a presença do isômero L-.

Analisando a composição monossacarídicas das subfrações de C2-2N, observa-se a presença de galactose (68,5-76,8 moles%), 3,6-anidrogactose (7,2-8,6 moles%), seu derivado 2-O-metilado (4,3-5,8 moles%), além dos derivados metilados da galactose, 2-O-metil-galactose (7,1-4,5 moles%) e 6-O-metil-galactose (1,8-2,5 moles%), xilose (2,5-5,9 moles%) e glucose (0,9-1,9 moles%) Tabela-8.

Na tabela 8, os números entre parênteses correspondem a hidrólise redutiva na presença de mais agente redutor (complexo borano 4-metil-morfolina), sendo a primeira etapa de hidrólise redutiva realizada a 90°C (FALSHAW; FURNEAUX, 1994). Como pode ser observado, o teor de 3,6-anidrogactose e de 2-O-metil-3,6-anidrogactose, são mais elevados nesta condição de hidrólise redutiva. O aumento das porcentagens de unidades anidrogactosídicas, após a adição de mais agente redutor, foi observado em outras galactanas como, por exemplo, de *Gigartina decipiens* (FALSHAW; FURNEAUX, 1994), a qual apresenta β -D-galactose-2-sulfato. A presença de sulfato, em carbono-2 desta unidade, dificulta a liberação de 3,6-anidrogactose ou de seu derivado 2-O-metilado.

Esta metodologia não foi realizada, no presente trabalho, com as outras frações polissacarídicas de *Cryptonemia crenulata*, apenas na hidrólise redutiva da fração C2u nativa, e nas modificadas quimicamente por tratamento solvolítico ou alcalino, bem como nestas frações parcialmente metiladas.

TABELA-8 ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES DE *C. crenulata* PROVENIENTES DE C2-2N SUBMETIDA A COLUNA DE TROCA-IÔNICA (DEAE-Sephacel).

Fração	Monossacarídeos (mol%) ^a							
	2AG ^b	AG D-L	Xil	2MeGal	3/4MeGal	6MeGal	Gal	Glc
C2w	5,8	7,7-0,9	4,5	7,1	1,1	2,5	68,5	1,9
C2m	7,2	4,5-2,7	5,9	4,5	2,0	1,8	69,2	1,9
C2u	4,3	2,4-5,7	2,5	5,8	-	2,1	76,3	0,9
	(8,5) ^c	(4,7-11,0)	(2,7)	(4,5)	(-)	(0,6)	(68,0)	(-)
C2um	4,5	5,0-3,4	3,1	5,9	-	-	76,8	1,3

a=Monossacarídeos quantificados em moles%, na forma de acetato de alditóis, por C.G.-E.M. (STEVENSON; FURNEAUX, 1991);

b= abreviatura dos monossacarídeos (2AG=2-O-metil-3,6-anidrogactose; AG= 3,6-anidrogactose; Xil= Xilose; 2Me-Gal= 2-O-metil-gactose; 3/4Me-Gal= 3 e/ou 4-O-metil-gactose; 6MeGal= 6-O-metil-gactose; Gal= gactose; Glc= glucose).

c= os valores entre parênteses correspondem à hidrólise redutiva na presença de mais agente redutor, como descrito por FALSHAW e FURNEAUX, 1994.

ANÁLISE DE HOMOGENEIDADE E DETERMINAÇÃO DE MASSA MOLECULAR.

As frações C2m e C2u, obtidas a partir de C2-2N, após purificação por coluna de DEAE-Sephacel, foram submetidas à cromatografia de exclusão estérica, acoplada a detectores de espalhamento de luz e de índice de refração, com a finalidade de comprovação da homogeneidade e determinação da massa molecular (Figuras 7 e 8). Nestes cromatogramas pode-se evidenciar a homogeneidade da fração C2u, já a fração C2m apresenta um caráter heterogêneo e, portanto polidisperso. A massa molecular da fração C2u foi determinada baseando-se na variação dos índices de refração ($dn/dc = 0,077$) da fração analisada e, portanto a massa molecular média (m_w) da C2u foi 236.200.

FIGURA-7 ANÁLISE DE HOMOGENEIDADE DA FRAÇÃO C2m.

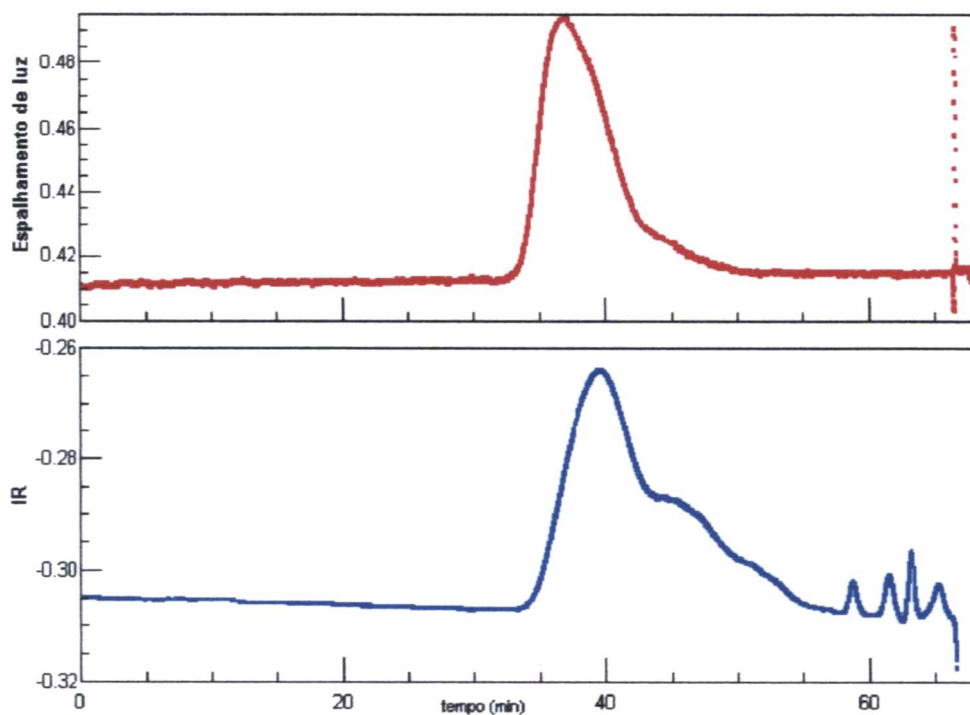
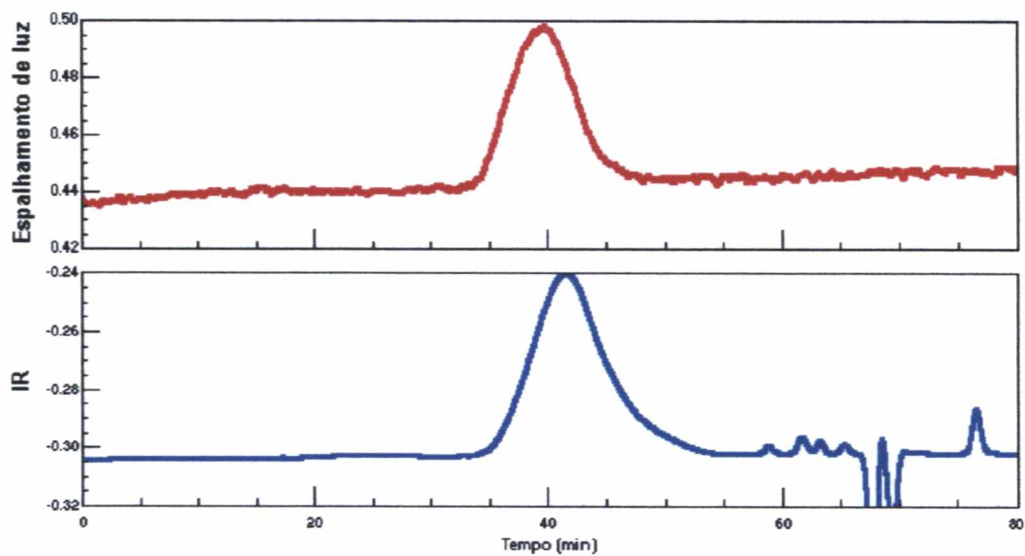


FIGURA-8 ANÁLISE DE HOMOGENEIDADE DA FRACÇÃO C2u.



ESPECTROSCOPIA DE INFRA VERMELHO

Através da espectroscopia de infra vermelho, podemos correlacionar bandas específicas de absorção com a posição do grupo sulfato (CHOPIN *et al.*, 1999).

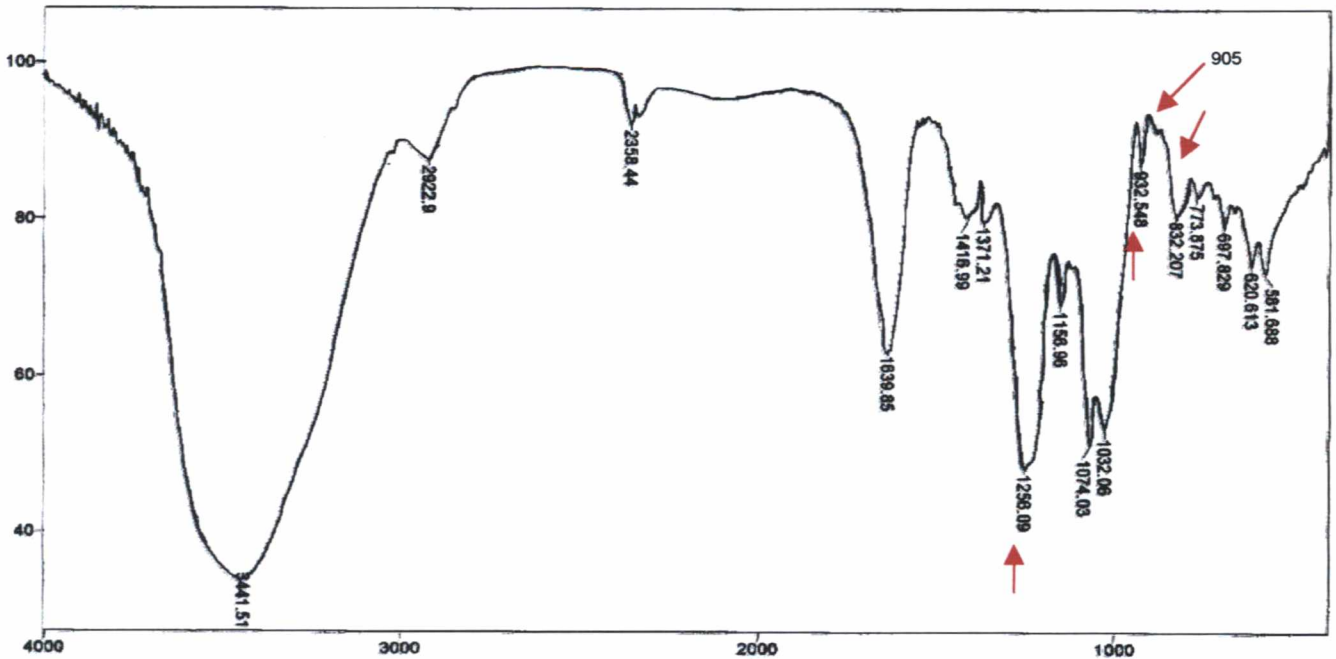
O espectro de infra vermelho da fração C2u (Figura-9), apresenta banda de absorção em $1256,1\text{ cm}^{-1}$ correspondente a tensão da ligação S=O de éster sulfato. Segundo CHOPIN *et al.*, 1999, a intensidade desta absorção é uma boa indicação do conteúdo total de sulfato, o que está de acordo com a determinação fotocolorimétrica do teor de sulfato (28,3%).

As bandas em $932,5\text{ cm}^{-1}$ e em 905 cm^{-1} indicam a presença de 3,6-anidrogalactose.

No espectro de infravermelho de C2u pode-se ainda observar uma banda larga em $800\text{-}850\text{ cm}^{-1}$, que corresponde a presença de grupos sulfato em carbono 2 de unidades de 3,6-anidrogalactose (805 cm^{-1}), carbono primário (820 cm^{-1} , galactose-6-sulfato), carbono secundário equatorial (830 cm^{-1} , galactose-2-sulfato) e secundário axial (845 cm^{-1} , galactose-4-sulfato).

Como será discutido posteriormente o posicionamento dos grupos sulfato em diferentes unidades da galactana C2u foi confirmada pelas análises de metilação e espectroscopia de carbono-13.

FIGURA-9 ESPECTRO DE INFRA VERMELHO DA FRAÇÃO C2u DE *C. crenulata*.



→ 1256,1 cm^{-1} (ligação S=O), 932,5 e 905 cm^{-1} (3,6-anidrogactose), banda de 800 a 850 cm^{-1} (805 cm^{-1} corresponde a presença de grupos sulfato em carbono 2 de unidades de 3,6-anidrogactose, 820 cm^{-1} galactose-6-sulfato, 830 cm^{-1} galactose-2-sulfato, 845 cm^{-1} galactose-4-sulfato).

DESSULFATAÇÃO SOLVOLÍTICA (SOLVÓLISE)

As unidades monossacarídicas sulfatadas quando são submetidas a hidrólise redutiva, perdem este tipo de substituinte, que são hidrolisados e estas unidades são analisadas na forma de galactose.

Para a determinação do posicionamento dos grupos sulfato em galactanas isoladas de algas vermelhas, torna-se necessário proceder à remoção destes grupos. As análises comparativas de metilação e de RMN de ^{13}C , do polímero nativo e do dessulfatado permitem identificar a localização dos grupos sulfato na galactana original, o que é de fundamental importância para a determinação da estrutura química fina.

Para a remoção dos grupos sulfato, a galactana C2u foi submetida (na forma de sal de piridônio) a tratamento com uma mistura reativa (DMSO: Metanol: Piridina) e aquecimento (100°C) como descrito em materiais e métodos.

Segundo NAGASAWA *et al.*, 1979, o grupamento sulfato é removido na forma de SO₃ aonde irá complexar-se com o metanol, “catalisador” da reação, presente na mistura reativa na proporção de 10%.

A fração C2u (28,3% de NaSO₃) foi submetida ao tratamento solvolítico apresentando após o tratamento 7,1% de NaSO₃, esta fração foi denominada C2ud, portanto pode se afirmar que a dessulfatação foi de 75%.

Como podemos observar na tabela 9, o tratamento solvolítico não modificou significativamente a composição monossacarídica da fração.

TABELA-9 COMPARAÇÃO DA COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DA FRAÇÃO C2U ANTES E APÓS TRATAMENTO SOLVOLÍTICO.

Fração	Monossacarídeos (mol%) ^a					
	2AG ^b	AG	Xil	2MeGal	6MeGal	Gal
C2u	8,5 ^c	15,7	2,7	4,5	0,6	68,0
C2ud	5,8	12,4	1,9	4,8	0,7	74,4

a=Monossacarídeos quantificados em moles%, na forma de acetato de alditóis, por C.G.-E.M. (STEVENSON; FURNEAUX, 1991);

b=Abreviatura dos monossacarídeos (2AG= 2-O-metil-3,6-anidrogalactose; AG= 3,6-anidrogalactose; Xil= Xilose; 2MeGal= 2-O-metil-galactose; 6MeGal= 6-O- metil-galactose; Gal= galactose).

c= estes valores indicam que a hidrólise redutiva foi realizada na presença de mais agente redutor, como descrito por FALSHAW e FURNEAUX, 1994.

ESPECTROSCOPIA DE RMN DE ¹³C DAS FRAÇÕES C2u, C2ud E C2m.

O espectro de ¹³C-RMN demonstra que a dessulfatação modificou alguns sinais quando comparado ao espectro da fração original (Figura-10). O sinal em

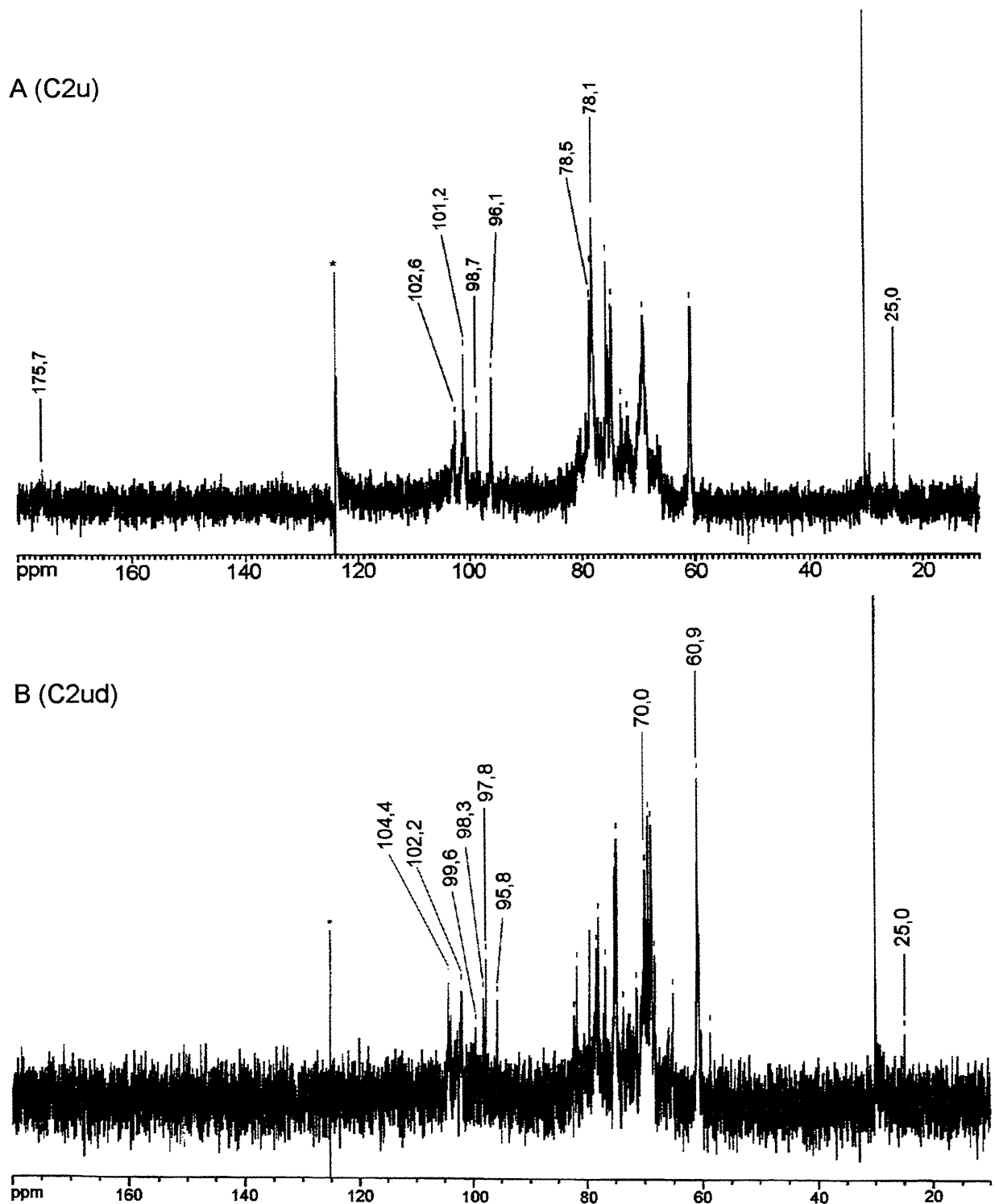
101,2 ppm, correspondente ao carbono-1 de β -D-galactose-2-sulfato ligada a α -D-galactose (96,1 ppm), presente na galactana C2u, desapareceu no polímero dessulfatado. Neste aparece o sinal em 104,4 ppm, correspondente ao carbono-1 de β -D-galactose ligada a α -D-galactose. Estes assinalamentos estão de acordo com os obtidos por FALSHAW e FURNEAUX, 1994, para a λ -carragenana de *Gigartina decipiens*, bem como com a galactana dessulfatada (metanólise) de *Grateloupia divaricata* (USOV *et al.*, 1980) (Tabela-13).

Como pode ser observado, no espectro de RMN de ^{13}C da galactana nativa C2u há um grupo de sinais na faixa de 78,5 – 78,1 ppm, correspondente ao carbono-2 das unidades de β -D-galactose-2-sulfato. A remoção de grupos sulfato em carbono-2 de unidades de β -D-galactose-2-sulfato ocasiona um deslocamento de -8,5 a -8,1 ppm, o que está de acordo com o aumento significativo do sinal em 70,0 ppm na galactana dessulfatada (C2ud) (carbono-2 de β -D-galactose).

Além da remoção de grupos sulfato em carbono-2 das unidades de β -D-galactose, o tratamento solvolítico removeu grupos sulfato em carbono-2 das unidades de 3,6-anidrogalactose-2-sulfato. No espectro de C2ud (Figura-10 B), os sinais correspondentes a 2-O-metil-3,6-anidro- α -L-galactose e de 3,6-anidro- α -L-galactose são claramente diferenciados (em 98,3 e 97,8 ppm, respectivamente). Em C2u apenas o sinal em 98,7 ppm é observado, demonstrando a superposição de sinais de 2-O-metil-3,6-anidro- α -L-galactose e de 3,6-anidro- α -L-galactose-2-sulfato.

Na figura-11, é apresentado o espectro de RMN de ^{13}C da fração C2m (eluída da coluna DEAE-Sephacel com 0,5M de NaCl). Este espectro apresenta-se semelhante ao de C2u, mas com um sinal em 107,9 ppm. Como esta fração não se apresentou homogênea por HPSEC-MALLS, não foi investigada no presente trabalho.

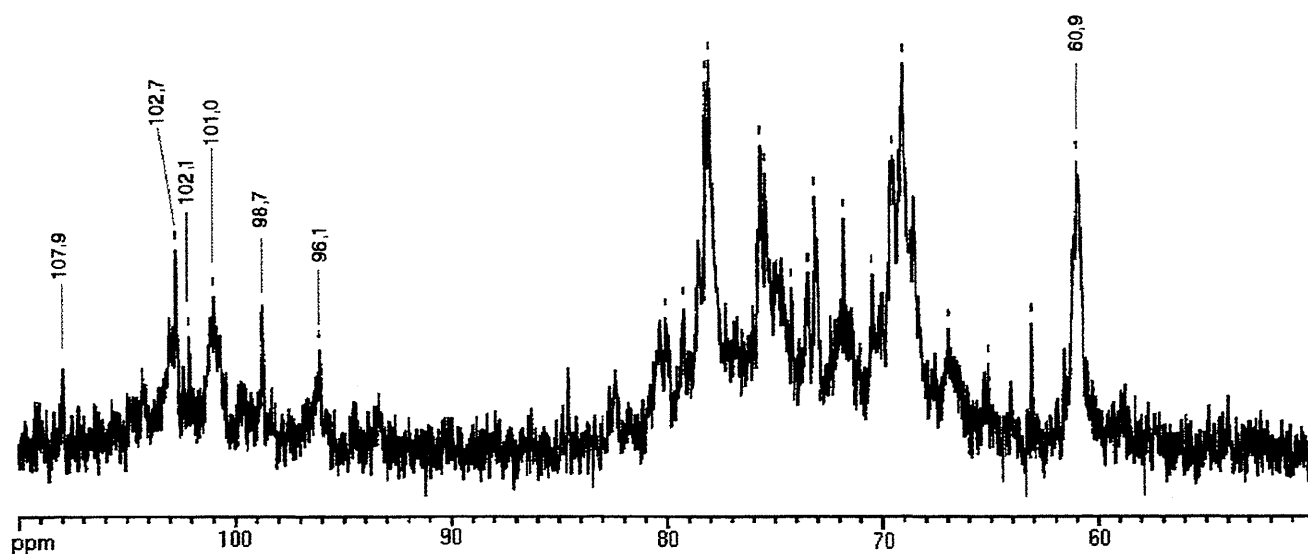
FIGURA-10 ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DAS FRAÇÕES C2u E C2ud DE *C. crenulata*.



#Análise realizada à 70°C em D2O, calibração com acetona como padrão interno (30,2 ppm). Concentração da amostra 30mg/ml.

*Corresponde a artefato obtido na realização do RMN da amostra.

FIGURA-11 ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C # DA FRAÇÃO C2m DE *C. crenulata*.



#Análise realizada a 70°C em D_2O , calibração com acetona como padrão interno (30,2 ppm). Concentração da amostra 40 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$.

TRATAMENTO ALCALINO DA GALACTANA C2u

A fração C2u foi submetida ao tratamento alcalino. Em meio alcalino (NaOH 1M) as unidades de galactose-6-sulfato, contendo grupos hidroxila livres no carbono-3, são convertidas em 3,6-anidrogactose (Figura-12), promovendo assim uma dessulfatação seletiva (NOSEDA; CERZO, 1995).

O tratamento alcalino da fração C2u foi conduzido, a 80°C e após 2 horas o teor de 3,6-anidrogactose permaneceu constante (pelo método do Resorcinol, YAPHE, 1960).

FIGURA-12 REAÇÃO DE CICLIZAÇÃO EM GALACTANAS DO TIPO AGARANAS.

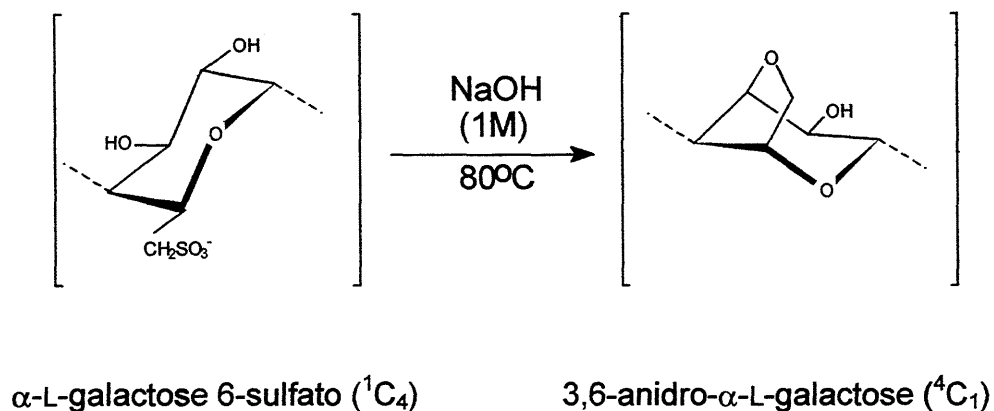


TABELA-10 COMPARAÇÃO DA COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DA FRAÇÃO C2u E C2uT DA ALGA *C. crenulata*.

Fração	Monossacarídeos (mol%) ^a					
	2AG ^b	AG	Xil	2MeGal	6MeGal	Gal
C2u	8,5 ^c	15,7	2,7	4,5	0,6	68,0
C2uT	10,7 ^c	23,6	3,0	4,6	0,7	59,0

a=Monossacarídeos quantificados em moles%, na forma de acetato de alditóis, por C.G.-E.M. (STEVENSON; FURNEAUX, 1991);

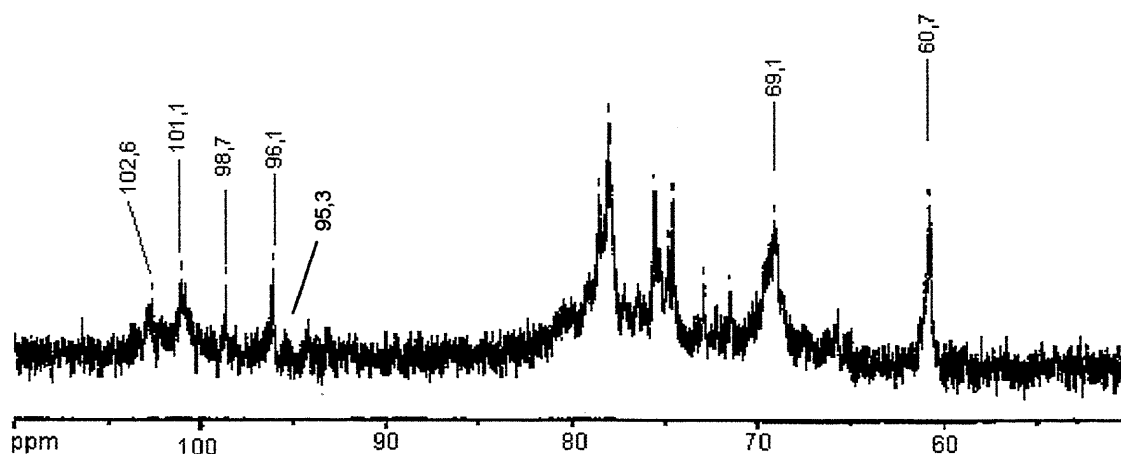
b= Abreviatura dos monossacarídeos (2AG= 2-O-metil-3,6-anidrogalactose; AG= 3,6-anidrogalactose; Xil= Xilose; 2Me-Gal= 2-O-metil-galactose; 6Me-Gal= 6-O-metil-galactose; Gal= galactose; Glc= glucose).

c= estes valores indicam que a hidrólise reductiva foi realizada na presença de mais agente reductor, como descrito por FALSHAW e FURNEAUX, 1994.

A hidrólise reductiva do polissacarídeo submetido a tratamento alcalino foi executada também, na presença de mais complexo borano 4-metil-morfolina, uma vez que deste polímero saiu apenas o sulfato do carbono-6 das unidades α -, permanecendo os grupos sulfato no carbono-2 das unidades de β -D-galactose.

Como pode ser observado (Tabela-10), utilizando as mesmas condições de hidrólise reductiva houve um aumento do teor de 3,6-anidrogactose no polímero tratado. Tal fato comprova a presença de aproximadamente 8% de α -galactose-6-sulfato, na fração original.

FIGURA-13 ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C # DA FRAÇÃO C2uT de *C. crenulata*.



#Análise realizada à 70°C em D₂O, calibração com acetona como padrão interno (30,2 ppm). Concentração da amostra 30mg.ml⁻¹.

O espectro de RMN de ^{13}C de C2uT foi complexo e semelhante ao da fração original. Tal fato pode ser explicado pela baixa porcentagem de galactose-6-sulfato, cuja ciclização não ocasiona modificações significativas no espectro de RMN. Porém um novo sinal em 95,3 ppm pode ser observado, este indica a presença de 3,6-anidro-D-galactose, portanto uma parte das unidades de α -galactose-6-sulfato pertencem a série D-.

TABELA-11 DESLOCAMENTOS QUÍMICOS REFERENTES AOS CARBONOS ANOMÉRICOS DAS UNIDADES MONOSSACARÍDICAS PRESENTES NAS GALACTANAS C2u, C2ud E C2uT.

Deslocamento químico (ppm)	Atribuição
C2u	
101,2	β -D-galactose-2-sulfato
96,1	α -D-galactose (6-sulfato)
102,6	β -D-galactose
98,7	2-O-metil-3,6-anidro- α -L-galactose 3,6-anidro- α -L-galactose-2-sulfato
C2ud	
104,4	β -D-galactose
95,8	α -D-galactose
102,2	β -D-galactose
98,3	2-O-metil-3,6-anidro- α -L-galactose
97,8	3,6-anidro- α -L-galactose
99,6	não atribuído
C2uT	
101,2	β -D-galactose-2-sulfato
96,1	α -D-galactose
102,6	β -D-galactose
98,6	2-O-metil-3,6-anidro- α -L-galactose; 3,6-anidro- α -L-galactose-2-sulfato
103,0	β -D-galactose
95,3	3,6-anidro- α -D-galactose

ANÁLISE DE METILAÇÃO E DE RMN DE ^{13}C DA GALACTANA C2u NATIVA E MODIFICADA QUIMICAMENTE (TRATAMENTO ALCALINO E SOLVÓLISE)

A análise de metilação da galactana C2u foi conduzida no polímero nativo (C2u), parcialmente dessulfatado (C2ud), e após tratamento alcalino (C2uT), utilizando o método de CIUCANU e KEREK, 1984. Previamente ao processo de metilação as respectivas frações foram tratadas com trietilamina 5% (como descrito em materiais e métodos), com a finalidade de se obter os polissacarídeos na forma de sal de trietilamônio, os quais são então solúveis em DMSO (utilizado na metilação).

Os polissacarídeos metilados foram hidrolisados utilizando o método de hidrólise redutiva descrito por STEVENSON e FURNEAUX, 1991, com a modificação de FALSHAW e FURNEAUX, 1994. Como descrito anteriormente nesta modificação é adicionado uma maior quantidade do agente redutor, o que proporciona uma maior recuperação das unidades anidrogalactosídicas, quando o polissacarídeo apresenta grupos sulfato em carbono-2 das unidades de β -galactose, presença de acetal de ácido pirúvico ou outro grupo substituinte que interfira, no processo hidrolítico.

Os resultados de análise por CG-EM obtidos após hidrólise redutiva e acetilação dos polímeros parcialmente metilados, estão apresentados na Tabela-12.

Os resultados de análise de metilação serão discutidos conjuntamente, desde que, o posicionamento dos grupos sulfato no polímero original é obtida com a análise comparativa, do polissacarídeo nativo e após dessulfatação solvolítica.

TABELA-12 RESULTADOS DAS ANÁLISES DE METILAÇÃO DAS FRAÇÕES C2u, C2ud e C2uT.

Derivado Metilado *	C2u (mol%)	C2ud (mol%)	C2uT (mol%)
Unidade A			
246-MeGal	3,5	42,5	3,5
24-MeGal	-	5,0	0,7
46-MeGal	33,2	-	38,0
2-MeGal	0,6	8,1	2,5
4-MeGal	4,3	0,2	3,8
Gal	3,0	-	7,0
Unidade B			
236-MeGal	7,8	19,0	4,1
2AG	15,3	13,4	20,6
AG	9,5	2,2	12,3
23-MeGal	12,6	-	3,0
3-MeGal	1,1	-	-
Unidades A e/ou B			
26-MeGal	1,4	7,6	0,7
6-MeGal	3,3	-	1,4
Unidades terminais			
2346-MeGal	2,1	0,7	1,2
234-MeXil	3,2	1,3	1,2

*246-MeGal= 2,4,6-tri-O-metil-galactose; 24-MeGal= 2,4-di-O-metil-galactose; 46-MeGal= 4,6-di-O-metil-galactose; 2-MeGal= 2-O-metil-galactose, 4-MeGal= 4-O-metil-galactose; 236-MeGal= 2,3,6-tri-O-metil-galactose; 2AG=2-O-metil-3,6 -anidrogalactose; AG= 3,6-anidrogalactose; 23-MeGal= 2,3-di-O-metil-galactose; 3-MeGal= 3-O-metil-galactose; 26-MeGal= 2,6-di-O-metil-galactose; 6-MeGal= 6-O-metil-galactose; 236-MeGal= 2,3,6,4-tetra-O-metil-galactose; 234-MeXil= 2,3,4-tri-O-metil-xilose, Gal= galactose.

Como pode ser observado na tabela-12, C2u apresenta alta porcentagem do derivado 4,6-di-O-metilgalactose (33,2 moles%), que corresponde a unidades de β -D-galactose-2-sulfato. A presença de grupos sulfato em carbono-2 é comprovada pela análise de metilação da fração C2ud, onde a totalidade deste grupo é removida após o tratamento solvolítico, originando o derivado 2,4,6-tri-O-metilgalactose. Este somado a porcentagem deste derivado, já existente em C2u (3,5%), totaliza um valor próximo a 37%. Deste modo a galactana C2u apresenta pelo menos 33,5 moles% de β -D-galactose-2-sulfato, ou seja, ~67% das unidades A estão sulfatadas em carbono-2. A presença desta unidade sulfatada é ainda confirmada pela análise de RMN de ^{13}C (Figuras-10 A e B), onde o sinal em 101,2 ppm no espectro de C2u, corresponde ao carbono-1 de β -D-galactose-2-sulfato, o qual não está presente após dessulfatação (Figura-10 B). Ressalta-se que neste espectro há o aparecimento do sinal em 104,4 ppm (correspondente ao carbono-1 de unidades de β -D-galactose). Estes resultados espectroscópicos estão de acordo com os de metilação discutidos anteriormente.

Embora a unidade A, no polissacarídeo C2u esteja predominantemente na forma de galactose-2-sulfato, a presença de acetal de ácido pirúvico é comprovada pela determinação fotocolorimétrica (2,8%), e resultados de metilação.

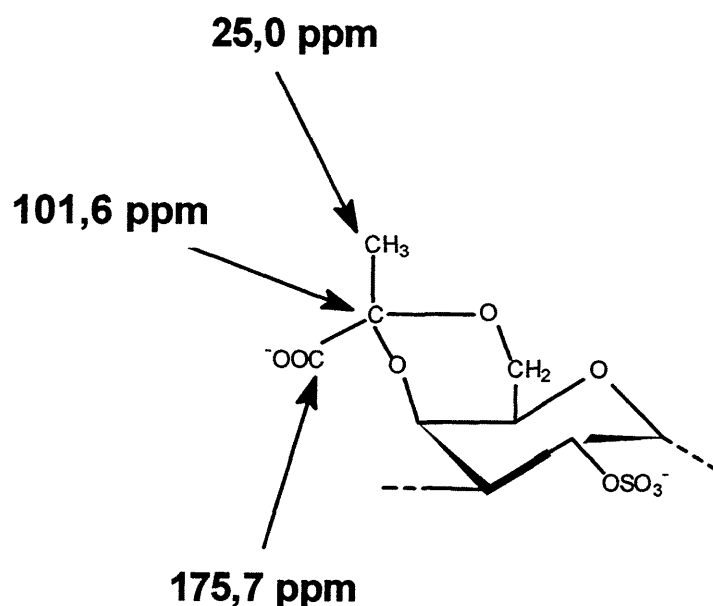
A metilação de C2uT, mesmo após 3 etapas de metilação, apresentou unidades de galactose (7,0%), enquanto que em C2ud observa-se o desaparecimento deste derivado e o aparecimento proporcional de 2-O-metilgalactose (8,1%). Estes resultados são compatíveis com a presença de β -D-galactose piruvatada e sulfatada em carbono-2. Pode ser notado que na metilação da galactana original, altamente sulfatada (C2u), há apenas 3 % de galactose.

Deve ser ressaltado que o acetal de ácido pirúvico (~8%, pelos resultados de metilação), na galactana C2u de *C. crenulata*, foi pacível de detecção por RMN de ^{13}C , mesmo na amostra não fracionada (C2-2N, Figura-6). Geralmente a ressonância do carbono acetálico de ácido pirúvico, não é observada no espectro de RMN de ^{13}C , de amostras de galactanas de algas vermelhas não fracionadas (LAHAYE *et al.*, 1989), seja por sua baixa concentração e/ou alta viscosidade da amostra, o que ocasiona um aumento da linha base e conseqüente perda da resolução do espectro.

De acordo com GORIN *et al.*, 1982, o tempo de relaxamento (T1) do carbono acetálico pode impedir sua detecção por espectroscopia de RMN ^{13}C , mesmo quando este substituinte está presente em uma quantidade significativa. Deste modo, a determinação fotocolorimétrica do teor de ácido pirúvico em galactanas de algas vermelhas deve ser interpretado como um resultado semiquantitativo, sendo a quantificação deste realizada pela análise de metilação e confirmada, como no caso da galactana C2u de *C. crenulata*, por RMN de ^{13}C .

No espectro de RMN de ^{13}C de C2u (Figura-10 A) podem ser observados os sinais em 25,0 ppm, correspondente ao carbono metílico, e em 175,7 ppm assinalado ao carbono carboxílico do acetal de ácido pirúvico. Como pode ser observado, também neste espectro, apresenta um sinal largo, centrado em 101,2 ppm. Deste modo o sinal em 101,6 ppm, relativo ao carbono acetálico do acetal de ácido pirúvico, não está definido, desde que esta galactana apresenta alta porcentagem de β -D-galactose-2-sulfato, cujo sinal (101,2 ppm) se sobrepõe ao do carbono acetálico.

FIGURA-14 ESTRUTURA APRESENTADA PELO GRUPO ACETAL DE ÁCIDO PIRÚVICO ESTERIFICANDO UMA UNIDADE DE β -D-GALACTOSE-2-SULFATO E SEUS RESPECTIVOS DESLOCAMENTOS QUÍMICOS POR RMN DE ^{13}C .



Os assinalamentos para o acetal de ácido pirúvico foram feitos por comparação com os assinalamentos de oligossacarídeos piruvatados, obtidos de agarose e de compostos modelos (Figura-14) (LAHAYE *et al.*, 1989, GORIN *et al.*, 1982).

Em conclusão, a unidade A da galactana C2u apresenta-se principalmente na forma de β -D-galactose-2-sulfato, β -D-galactose piruvatada com sulfato em carbono-2, ocorrendo como 4,6-O-(1-carboxietilideno)-galactose-2-sulfato, e baixas porcentagens de β -D-galactose não substituída (3,5 %), e de β -D-galactose-2,6-dissulfato (derivado 4-O-metilgalactose, aproximadamente 4,0% em C2u).

A metilação da fração C2u demonstrou a presença do derivado 2,3-di-O-metilgalactose que corresponde a unidades de α -galactose-6-sulfato. Esta unidade é precursora tanto *in vivo* como após tratamento alcalino do anidroaçúcar 3,6-anidrogalactose. No primeiro caso, a reação de ciclização ocorre pela ação de sulfidrolases, que removem o grupo sulfato em carbono-6 levando à ciclização das unidades de α -galactose-6-sulfato (3,6-anidrogalactose) (ZINOUN *et al.*, 1997). Este processo também pode ocorrer quando o polímero contendo as unidades precursoras é tratado com NaOH, na presença de NaBH₄ com temperatura (REES, 1961, NOSEDA; CERZO, 1995, NOSEDA *et al.*, 2000a).

O tratamento alcalino da fração C2u foi conduzido a 80°C, como já citado anteriormente, após 2 horas o teor de 3,6-anidrogalactose permaneceu constante, indicando que as unidades de galactose-6-sulfato foram ciclizadas.

Como pode ser observado na fração C2uT (Tabela-12), o teor de 2,3-di-O-metilgalactose decresce consideravelmente, (de 12,6% em C2u para 3% em C2uT), havendo um aumento proporcional na porcentagem do derivado 2-O-metil-3,6-anidrogalactose, (20,6 moles% em C2uT). Este valor, portanto corresponde ao somatório da: (a) porcentagem de 3,6-anidrogalactose presente no polímero nativo (C2u, 6,8 moles%), (b) de 2,3-di-O-metilgalactose (C2u, 12,6 moles% menos 3,0 moles%, que não ciclizou), ou seja, 9,6 moles %, (c) e a porcentagem de 2-O-metil-3,6-anidrogalactose presente no polímero nativo (8,5 moles% - Tabela-8). O valor de 9,6 moles% está de acordo com o obtido pela análise da composição monossacarídica de C2uT (8% de galactose-6-sulfato, Tabela-10). Em C2uT, observa-se a presença de 12,3 moles% do derivado 3,6-anidrogalactose. Este valor corresponde a quantidade de 3,6-anidrogalactose-2-sulfato (9,5%, presente no

polímero nativo), e de galactose-2,6-dissulfato (1,1 mol%), que foi ciclizada durante o tratamento alcalino, originando 3,6-anidrogactose-2-sulfato.

A presença de grupos sulfato, em carbono-6 das unidades de α -galactose, pode ainda ser comprovada pelos resultados de metilação de C2ud. Para esta fração observa-se um aumento da porcentagem do derivado 2,3,6-tri-O-metilgalactose (19%), relativo ao de C2u (7,8%). Este aumento deve-se a remoção de grupos sulfato em carbono-6 das unidades de α -galactose.

Os resultados de metilação de C2u, também demonstram a presença de 2-O-metil-3,6-anidrogactose (15,3%) (Tabela-12). Considerando que a porcentagem deste anidroaçúcar é de 8,5% (análise da composição monossacarídica de C2u, Tabela-8), pode-se deduzir que 6,8 moles% no polissacarídeo original correspondem a unidades de 3,6-anidrogactose (sem substituição em carbono-2). A presença de 9,5 moles% de 3,6-anidrogactose (Tabela-12), indica que esta unidade está substituída em carbono-2.

Ainda em relação às unidades 3,6-anidrogactosídicas, a metilação de C2uT, também comprova a presença de 3,6-anidrogactose-2-sulfato (9,5%), como observado em C2u além de galactose 2,6-dissulfato (1,1%). A porcentagem (12,3%) de 3,6-anidrogactose (correspondente a unidades de 3,6-anidrogactose sulfatada em carbono-2) semelhante a obtida para C2u (10,6%).

A metilação de C2uT, comprova ainda que parte das unidades B, da galactana C2u de *C. crenulata* está na forma de galactose-6-sulfato. A presença de 20,6 moles% de 2-O-metil-3,6-anidrogactose, na metilação da fração C2uT, corresponde ao somatório: (a) das porcentagens de galactose-6-sulfato que ciclizou durante o tratamento alcalino, (b) mais a de 2-O-metil e 3,6-anidrogactose originalmente presente no polímero nativo, (c) e de 3,6-anidrogactose presentes no polímero original. A porcentagem obtida para esta somatória está próxima a esperada (24,9 moles%), considerando que o polímero nativo apresente aproximadamente 7% de 3,6-anidrogactose (sem substituinte em carbono-2).

Portanto pelos resultados de metilação a unidade B da galactana C2u de *C. crenulata*, apresenta grande diversidade de unidades monossacarídicas: galactose-6-sulfato (12,6%); 3,6-anidrogactose sulfatada em carbono-2 (9,5%), metilada em carbono-2 (8,5%), ou sem substituinte em carbono-2 (6,8% ou menos); além de galactose (7,8%) e baixas porcentagens de galactose 2,6-dissulfato (1,1%).

TABELA-13 ASSINALAMENTOS QUÍMICOS DE RMN DE ¹³C OBSERVADOS NAS FRAÇÕES C2u, C2ud E C2uT DE *Cryptonemia crenulata* E EM OUTRAS GALACTANAS.

POLISACARÍDEO UNIDADE A – UNIDADE B	C-1 (unidade A) (ppm)	C-1 (unidade B) (ppm)
<i>C2u de Cryptonemia crenulata</i>		
β -D-Gal-2-sulfato – α -D-Gal ¹	101,2	96,1
<i>C2ud de Cryptonemia crenulata</i>		
β -D-Gal – α -D-Gal ²	104,4	95,8
β -D-Gal – 2-O-metil-3,6-anidro- α -L-Gal ²	102,2	98,3
β -D-Gal – 3,6-anidro- α -L-Gal ²	102,2	97,8
<i>C2uT de Cryptonemia crenulata</i>		
β -D-Gal – 3,6-anidro- α -D-Gal ³	103,0	95,3
<i>Gigartina decipiens</i>		
β -D-Gal – α -D-Gal ⁴	104,7	96,2
β -D-Gal-2-sulfato–3,6-anidro- α -D-Gal-2-sulfato	100,3	95,6
<i>Gigartina skottsbergii</i>		
β -D-Gal-2-sulfato –3,6-anidro- α -D-Gal-2-sulfato ⁵	100,1	94,9
<i>Callophyllis variegata</i>		
β -D-Gal – α -D-Gal ⁶	105,2	96,6
β -D-Gal – 3,6-anidro- α -D-Gal ⁶	103,0	95,3
β -D-Gal – α -L-Gal ⁶	103,7	101,1
<i>Grateloupia divaricata</i>		
β -D-Gal – α -D-Gal ⁷	104,8	96,1
β -D-Gal – α -L-Gal ⁷	103,7	100,9
<i>Curdea angustata</i>		
β -D-Gal-6-O-metil–2-O-metil-3,6-anidro- α -L-Gal ⁸	102,3	98,7
β -D-Gal-6-O-metil – 3,6-anidro- α -L-Gal ⁸	102,3	98,2
<i>Curdea coriacea</i>		
β -D-Gal-6-O-metil–2-O-metil-3,6-anidro- α -L-Gal ⁹	102,6	98,6

1 C2u de *Cryptonemia crenulata* estudada no presente trabalho; 2 Fração C2ud de *C. crenulata*; 3 Fração C2uT de *C. crenulata*, estudado no presente trabalho; 4 Corresponde a λ -carragenana de *Gigartina decipiens*, após tratamento alcalino (FALSHAW, FURNEAUX, 1994); 5 Tratamento alcalino da galactana de *Gigartina skottsbergii* (NOSEDA, 1994); 6 Corresponde ao polissacarídeo isolado de *Callophyllis variegata* (MERINO *et al.*, 2001); 7 Galactana dessulfatada de *Grateloupia divaricata* (USOV *et al.*, 1980); 8 polissacarídeo após tratamento alcalino da alga *Curdea angustata* (FALSHAW *et al.*, 1998); 9 Corresponde a galactana modificada por tratamento alcalino isolado de *Curdea coriacea* (FALSHAW *et al.*, 1998).

Os resultados de metilação da galactana C2u foram confirmadas pelas análises de RMN de ^{13}C . A presença dos sinais no espectro de C2ud em 98,3 ppm (2-O-metil-3,6-anidrogactose e 3,6-anidrogactose-2-sulfato) e 97,8 ppm (3,6-anidrogactose) confirmam a presença de unidades anidrogactosídicas na configuração L-.

Ressalta-se que os sinais de L- e D- 3,6-anidrogactose são configuração dependente, 3,6-anidro-D-gactose apresenta sinal em 95,2 ppm e 3,6-anidro-L-gactose em 98,2 ppm (USOV *et al.*, 1980), havendo um deslocamento de aproximadamente +0,5 ppm quando estas unidades estão substituídas por grupos O-metil em carbono-2.

A presença do isômero L- de 3,6-anidrogactose, foi ainda confirmada pela quantificação de D- e L- 3,6-anidrogactose no polímero nativo (4,7% e 11% de D- e L- 3,6-anidrogactose, respectivamente). Esta quantificação foi realizada pelo método de ERREA *et al.*, 1998, pela Dr^a. Marina Ciancia, da Universidade de Buenos Aires (Argentina).

No espectro de RMN de ^{13}C da galactana dessulfatada C2ud, observa-se ainda o sinal em 95,8 ppm correspondente ao carbono-1 de unidades de α -D-gactose as quais estão ligadas a unidades de β -D-gactose (104,4 ppm) (Tabela-11). Estes assinalamentos estão de acordo com os obtidos com os obtidos por FALSHAW e FURNEAUX, 1994 (Tabela-13) para a carragenana de *Gigartina decipiens*. Esta galactana é constituída principalmente por unidades alternadas de β -D-gactose-2-sulfato (3-O-substituída) e α -D-gactose-2,6-dissulfato (4-O-substituída). As análises de RMN de ^{13}C desta carragenana dessulfatada e após modificação por tratamento alcalino apresentaram dois sinais na região anomérica. No espectro do polímero dessulfatado, em 104,7 ppm (β -D-gactose) e 96,2 ppm (α -D-gactose), enquanto que para o polímero modificado em 100,3 ppm (β -D-gactose-2-sulfato) e em 95,6 ppm (α -D-3,6-anidrogactose-2-sulfato). A análise de RMN de ^{13}C da lambda-carragenana isolada de *Gigartina skottsbergii* (NOSEDA, 1994), confirma estes resultados (Tabela-13).

Tanto em C2u como em C2uT, o sinal relativo ao carbono-1 de unidades de α -D-gactose aparece em 96,1 ppm, devido a presença de unidades de β -D-gactose-2-sulfato. Deve ser ressaltado que este espectro (C2uT), apresenta ainda um sinal em 95,3 ppm, correspondente ao carbono-1 das unidades de 3,6-anidro-D-

galactose. O aparecimento deste sinal indica que parte das unidades de galactose-6-sulfato presentes na galactana nativa C2u, são da série estereoquímica D-.

É observado ainda na metilação da galactana C2u a presença dos derivados 2,6-di-O-metil-galactose e 6-O-metil-galactose, os quais podem ser originados tanto da unidade A (β -galactose-4-sulfato e β -galactose-2,4-dissulfato), como da B unidades (α -galactose-3-sulfato e α -galactose-2,3-dissulfato) (MILLER *et al.*, 1995). A presença do derivado 6-O-metil-galactose, na metilação da galactana *Gloiopeltis furcata*, foi interpretada por TAKANO *et al.*, 1998, como unidade A, ou seja β -galactose-2,4-dissulfato, desde que no espectro de infra vermelho havia absorção em 850 cm^{-1} (correspondente a sulfato em carbono-4 axial). Esta banda de absorção também foi observada no espectro de FT-IR da galactana C2u de *C. crenulata* (Figura-9). Deste modo, pelo menos parte do derivado 6-O-metil-galactose pode ser correspondente à presença de β -galactose-2,4-dissulfato na galactana em estudo.

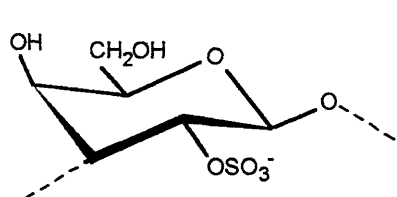
Unidades terminais em baixas porcentagens (2,3,4,6-tetra-O-metil-galactose e 2,3,4-tri-O-metil-xilose), também estão presentes, nos produtos de metilação de C2u. O posicionamento destes substituintes não pode ser determinado devido a sua baixa porcentagem, bem como pelo grande número de derivados metilados obtidos.

Traços de xilose são encontrados, frequentemente em galactanas de algas pertencentes a ordem Cryptonemiales (CHOPIN *et al.*, 1994), e em outras Rhodophyceae (USOV *et al.*, 1983; CHOPIN *et al.*, 1990). Este açúcar amplamente distribuído entre as algas vermelhas, não parece ter uma importância taxonômica. De acordo com USOV e BARBAKADZE, 1978, a xilose esta ligada a cadeia principal das galactanas, como unidades terminais.

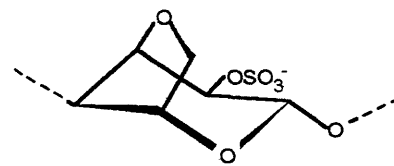
Deve ser ressaltado que embora nenhum oligossacarídeo de estrutura híbrida (como por exemplo, um tetrassacarídeo D-L-D-D) tenha sido isolado até a presente data, várias galactanas obtidas de algas da ordem Cryptonemiales apresentam unidades α , tanto na forma D- como L-. A dificuldade de obtenção deste tipo de oligossacarídeo deve-se provavelmente, ao fato de que as galactanas híbridas-D/L apresentam, o que se denomina de estrutura em blocos, (blocos de agaranas e de carragenanas). Deste modo a probabilidade de hidrólise em uma região que leve ao isolamento de um oligossacarídeo híbrido-D/L é muito reduzida.

Outra maneira de se comprovar a presença de galactanas híbridas-D/L, é a utilização de métodos químicos para a determinação da enantiomericidade dos monossacarídeos constituintes, desde que estas galactanas apresentem-se homogêneas como, por exemplo, por HPSEC-MALLS. Com relação a determinação da enantiomericidade das unidades de 3,6-anidrogactose, além de métodos químicos pode ser utilizado RMN de C-13, uma vez que os sinais de carbono-1 destas unidades são configuração dependente. Os resultados da determinação da estrutura química fina, da galactana homogênea C2u, por métodos químicos e espectroscópicos, obtidos no presente trabalho permitem concluir que a alga vermelha *Cryptonemia crenulata* pertencente a ordem Cryptonemiales, biossintetiza uma galactana sulfatada e piruvatada do tipo híbrida-D/L.

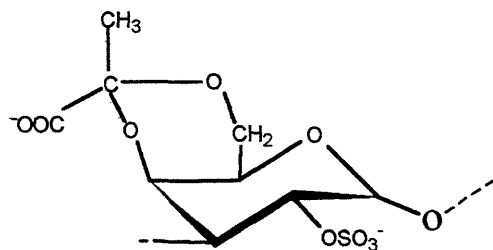
FIGURA-15 PRINCIPAIS UNIDADES MONOSSACARÍDICAS PRESENTES NA GALACTANA C2u DE *C. crenulata*.



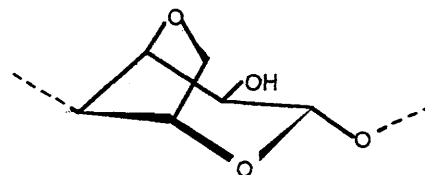
β -D-galactose-2-sulfato



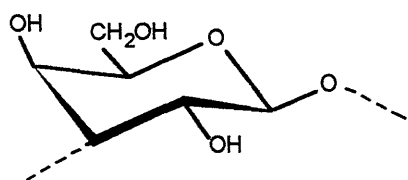
3,6-anidro- α -L-galactose-2-sulfato



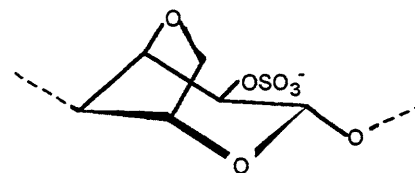
4,6-O-(1-carboxietilideno)- β -D-Gal-2-sulfato



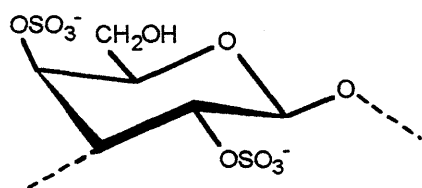
3,6-anidro- α -L-galactose



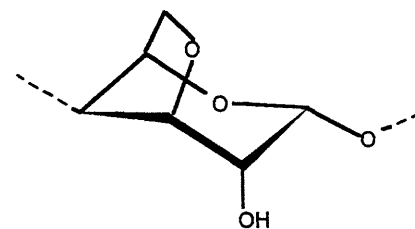
β -D-galactose



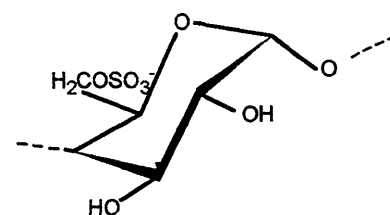
2-O-metil-3,6-anidro- α -L-galactose



β -D-galactose-2,6-dissulfato



3,6-anidro- α -D-galactose



α -D-galactose-6-sulfato*

* α -L-galactose-6-sulfato também foi observada.

CONCLUSÃO

5. CONCLUSÃO

A galactana homogênea C2u ($M_w = 236.200$), isolada de *Cryptonemia crenulata*, é constituída principalmente por β -D-galactose-2-sulfato e 4,6-O-(1-carboxietilideno)- β -D-galactose-2-sulfato (unidade A). 2-O-metil-3,6-anidro- α -L-galactose, 3,6-anidro- α -L-galactose-2-sulfato, 3,6-anidro- α -D-galactose, 3,6-anidro- α -L-galactose, α -L-galactose, além de α -galactose-6-sulfato (D- e L-), constituem as unidades B de C2u. A presença de isômeros D- e L- na unidade B desta galactana, permite concluir que a galactana sulfatada e piruvatada C2u é do tipo híbrida-D/L.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLSOBROOK, A.J.R.; NUNN, J.R.; PAROLIS, H. Sulphated polysaccharides of the Grateloupiaceae family. Part V. A polysaccharide from *Aeodes ulvoidea*. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 16, p. 71-78, 1971.

ALLSOBROOK, A.J.R.; NUNN, J.R.; PAROLIS, H. The linkage of 4-O-methyl-L-galactose in the sulphated polysaccharide of *Aeodes ulvoidea*. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 36, p. 139-145, 1974.

ARAKI, C.; HIRASE, S. Studies on the chemical constitution of agar-agar. XXI. Re-investigation of methylated agarose of *Gelidium amansii*. **Bull. Chem. Soc. Of Japan**, [S.I.], v. 33, p. 291-295, 1960.

CARLUCCI, M. J.; CIANCIA, M.; MATULEWICZ, M. C.; CEREZO, A. S.; DAMONTE, E. B. Antiherpetic activity and mode of action of natural carrageenans of diverse structural types. **Antivir. Res.**, v. 43, p. 93-102, 1999.

CASES, M.R.; CEREZO, A.S.; STORTZ, C.A. Separation and quantitation of enantiomeric galactoses and their mono-O-methylethers as their diastereomeric acetylated 1-deoxy-1-(2-hydroxypropylamino) alditols. **Carbohydr. Res.**, v. 269, p. 333-341, 1994.

CEREZO, A.S. The carrageenan system of *Gigartina skottsbergii* S. et G. Part I. Studies on a fraction of kappa-carrageenan. **J. Chem. Soc.**, (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*. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 299, p. 229-243, 1997.

CHIOVITTI, A.; BACIC, A.; CRAIK, D.J.; KRAFT, G.T.; LIAO; FALSHAW, R.; FURNEAUX, R.H. A pyruvated carrageenan from Australian specimens of the red algae *Sarconema filiforme*. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 310, p. 77-83, 1998.

CHOPIN, T.; HANISAK, M.D.; KOEHN, F.E; MOLLION, J.; MOREAU, S. Studies on carrageenans and the effects of seawater phosphorus concentration on carrageenan content and growth of *Agardhiella subulata* (C. Agardh) Kraft and Wynne (Rhodophyceae, Solieriaceae) **J. Appl. Phycol.**, v. 2, p. 3-16, 1990.

CHOPIN, T.; HANISAK, M.D.; CRAIGIE, J.S. Carrageenans from *Kallymenia westii* (Rhodophyceae) with a review of the phycocolloids produced by Cryptonemiales. **Bot. Mar.**, 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. **Phycol. Res.**, v. 47, no.3, p. 167-188, 1999.

CIANCIA, M.; NOSEDA, M.D.; MATULEWICZ, M.C.; CEREZO, A.S. Alkali modification of carrageenans: mechanism and kinetics in the kappa/iota-, mu/nu- and lambda-series. **Carbohydr. Polym.**, Essex, v. 20, p. 95-98, 1993.

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

DESLANDES, E.; POTIN, P.; ZINOUN, M., FLOCH, J.Y. Contribution on the content and nature of the phycocolloid from *Kallymenia reniformes* (Cryptonemiales, Rhodophyta), **Hydrobiol.**, Bucharest, v. 204, p. 603-608, 1990.

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

DUARTE, M.E.R.; NOSEDA, M.D.; TULIO, S.; PUJOL, C.A.P.; DAMONTE, E.B. Inhibitory effect of sulfated galactans from the marine alga *Bostrychia mantagnei* on herpes simplex virus replication in vitro. **Phytomedicine**, v. 8 (1), p. 53-58, 2001.

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

DUCKWORTH, M.; YAPHE, W. The structure of agar. Part I. Fractionation of a complex mixture of polysaccharides. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 16, p. 189-197, 1971.

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. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 311, p. 235-238, 1998.

FALSHAW, R.; FURNEAUX, R.H.; STEVENSON, D.E. Agars from nine species of red seaweed in the genus *Curdiea* (Gracilariaceae, Rhodophyta). **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 308 (1-2), p. 107-115, 1998.

FALSHAW, R.; FURNEAUX, R.H.; WONG, H.; LIAO, M-L.; BACIC, A.; CHANDRKRACHANG, S. Structural analysis of carrageenans from Burnese and Thai samples of *Catenella nipae* Zanardini. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 285, p. 81-98, 1996.

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

FARRANT, A.J.; NUNN, J.R. and PAROLIS, H. Sulphated polysaccharide of the Grateloupiaceae family. Part VII. Investigation of the acetolysis products of a partially desulphated sample of the polysaccharide of *Pachymenia carnosa*. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 25, p. 283-292, 1972.

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

FURNEAUX, R.H.; STEVENSON, T.T. The xilogalactan sulfate from *Chondria macrocarpa* (Ceramiales, Rhodophyta). **Hydrobiol.**, Bucharest, v. 204/205, p. 615-620, 1990.

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. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 77, p. 71-78, 1979

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

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

JANSON, P.; KENNE, L.; LIEDRGREN, H.; LINDBERG, B.; LONNGREN, J. A practical guide to the methylation analysis of carbohydrates. **Chem. Commun.**; London, v. 8, p. 1-71, 1976.

KARSTEN, U.; BARROW, K.D.; KING, R.J. Floridoside, L-isofloridoside and D-isofloridoside in the red algae *Porphyra columbina* – Seasonal and osmotic effects. **Plant Physiol.**, Rockville, v. 103, p. 185-191, 1993.

KLOAREG, B.; QUATRANO, R.S. Structure of the cell walls of marine algae and ecophysiological functions of matrix polysaccharides. **Ocenogr. Mar. Biol. Annu. Rev.**, Winchester, v. 26, p. 259-315, 1988.

KOEPSSELL, H.J.; SHARPE, E.S. Microdetermination of pyruvic and α-ketoglutaric Acids. **Arch. Biochem. Biophys.**, Orlando, v. 38, p. 443-449, 1952.

KOLENDER, A.; PUJOL, C. A.; DAMONTE, E.; MATULEWICZ, M.; CEREZO, A. The system of sulfated α-(1→3)-linked D-mannans from the red seaweed *Notogenia fastigiata*: structures, antihyperthermic and anticoagulant properties. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 304, p. 53-60, 1997.

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

KRAFT, G.T.; ROBINS, P.A. Is the order Cryptonemiales (Rhodophyta) defensible? **Phycol.**, v. 24, p. 67-77, 1985.

KYLIN, H. Die Gattungen der Rhodophyceen. **Gleerups**, Lund, p. 669, 1956.

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

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

MERINO, E.R.; CEREZO, S.A.; MATULEWICZ, M. Polysaccharides from *Callophyllis variegata*. XVIIth International seaweed symposium, Cape Town, South Africa, p. 130, 2001.

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

MILLER, I.J.; FURNEAUX, R.H. A structural analysis of the polysaccharide from *Kallymenia berggrenii* J. Ag. **Bot. Mar.**, Berlin, v. 39, p. 141-147, 1996.

MILLER, I.J.; FURNEAUX, R.H. The structural determination of the agaroid polysaccharides from four seaweed from New Zealand in the order Ceramiales by means of ^{13}C -NMR spectroscopy. **Bot. Mar.**, Berlin, v. 40, p. 333-339, 1997.

MILLER, I.J.; FALSHAW, R.; FURNEAUX, R.H.; HEMMINGSON, J. A variation constituent sugars of the polysaccharides from New Zealand species of *Pachymenia* (Halymeniaceae). **Bot. Mar.**, Berlin, v. 40, p. 119-127, 1997.

MILLER, I.J. The structure of pyruvylated carrageenan extracted from *Stenogramme interrupta* as determined by ^{13}C -NMR spectroscopy. **Bot. Mar.**, Berlin, v. 41, p. 305-315, 1998.

NAGASAWA, K.; INOUE, Y. and TOKUYASU, T. An improved method for the preparation of the chondroitin by solvolytic desulfation of chondroitin sulfates. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 86, p. 1323-1327, 1979.

NOSEDA, M.D.; TULIO, S.; DUARTE, M.E.R.; Polysaccharides from the red seaweed *Bostrychia montagne*: chemical characterization. **J. Applied Phycol.**, v. 11, p. 35-40, 1999.

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 β -D-galactose units. **Carbohydr. Polym.**, Essex, v. 26, p. 1-3, 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.**, Essex, v. 42, p. 301-305, 2000(a).

NOSEDA, M.D., CAUDURO, J.P.; DUCATTI, D.R.B.; DUARTE, M.E.R. Chemical structure of the sulfated polysaccharides extracted from the red seaweed *Acanthophora spicifera*. **Proceed. of Third Int. Symp. Nat. Polym.** p. 176-180, 2000(b).

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

NUNN, J.R.; PAROLIS, H. Sulphated polysaccharides of the *Grateloupiaceae* family. Methylation analysis of Phyllymenan and desulphated Phyllymenan. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 14, p. 145-150, 1970.

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

PARK, Y.H; PYEUN, H.K.; KANG, Y.J. Utilization of unexploited algae for food or other industrial uses. Part 2. Carrageenan content and its chemical characteristics in several species of Rhodophyceae. **Bull. Korean Fish. Soc.**, v. 9(3), p. 163-168, 1976.

PAROLIS, H. The structure of polysaccharide of *Pacchyminia carnosa*. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 62, p. 313-320, 1978.

PAROLIS, H. The polysaccharides of *Phyllymenia hieroglyphica* (*P. belangeri*) and *Pacchyminia hymantophora*. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 93, p. 261-267, 1981.

PENMAN, A.; REES, D.A. Carrageenans. Part IX. Methylation analysis of galactan sulphates from *Furcellaria fastigata*, *Gigartina caniculata*, *G. chamissoi*, *Pachymenia hymantophora*, and *Gloiopeltis cervicornis*. Structure of ξ -carrageenan. **J. Chem. Soc. Perkin Trans.**, v. 1, p. 2182-2187, 1973.

PERCIVAL, E.; McDOWELL, R.H. **Chemistry and enzymology of marine algal polysaccharides**. Academic Press Inc., London. p. 73-98, 127-156, 1967.

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

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. **Can. J. Bot.**, Ottawa, v. 74, p. 694-707, 1996.

SLONEKER, J.H. Gas-liquid chromatography of alditol acetates. **Methods Carbohydr. Chem.**, San Diego, v. 6, p. 20-24, 1972.

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

STORTZ, C.A.; CASES, M.R.; CEREZO, A.S. The system of agaroids and carrageenans from the soluble fraction of the tetrasporic stage of the red seaweed *Iridaea undulosa*. **Carbohydr. Polym.**, Essex, v. 34 (1-2), p. 61-65, 1997.

STORTZ, C.A.; CEREZO, A.S. Novel findings in carrageenans, agaroids and "hybrid" red seaweed galactans. 2000, *in press*.

TAKANO, R.; IWANE-SAKATA, H.; HAYASHI, K.; HARA, S.; HIRASE, S. Concurrence of agaroid and carrageenan chains in funoran from the red seaweed *Gloiopeltis furcata* Post. Et. Ruprecht. (Cryptonemiales, Rhodophyta). **Carbohydr. Polym.**, 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. **Carbohydr. Polym.**, Essex, v. 27, p. 305-311, 1995.

USOV, A.I.; BARBAKADZE, V.V. Polysaccharides of algae. XXVII. Partial acetolysis of the sulphated galactan from the red seaweed *Grateloupia divaricata*. **Bioorgan. Khim.**, v. 4, p. 1107-1115, 1978.

USOV, A.I.; IVANOVA, E.G.; SHASHKOV, A.S. Polysaccharides of algae. 33. Isolation and ¹³C-NMR spectral study of some new gel-forming polysaccharides from Japan Sea red seaweeds. **Bot. Mar.**, Berlin, v. 26, p. 285-294, 1983.

USOV, A.I.; ARKHIPOVA, V.S. Polysaccharides of algae XXX. Methylation of polysaccharides of de κ-carrageenan type from the red algae *Tichocarpus crinitus* (Gmel.), *Furcellaria fastigiata* and *Phyllophora nervosa*. **Bioorg. Khim.**, v. 7, p. 385-390, 1981.

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. **Bot. Mar.**, Berlin, v. 35, p. 371-378, 1992.

USOV, A.I.; YAROTSKII, S.V.; SHASHKOV, A.S. ¹³C-NMR spectroscopy of red algal galactans. **Biopolymers**, New York, v. 19, p. 977, 1980.

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

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

WHYTE, J.N.C.; FOREMAN, R.E.; WREEDE, R.E. Phycocolloid screening of British Columbia red algae. **Hydrobiol.**, Bucharest, v. 116/117, p. 537-541, 1984.

YAPHE, W. Colorimetric determination of 3,6-anhydrogalactose and galactose in marine algae polysaccharides. **Anal. Chem.**, v. 32, p. 1327-1330, 1960.

ZABLACKIS, E., PEREZ, J. A partially pyruvated carrageenan from Hawaiian *Grateloupia fillicina*. **Bot. Mar.**, Berlin, v. 33, p. 273-276, 1990.