

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LAURI ALVES JUNIOR

MODIFICAÇÕES QUÍMICAS DE POLISSACARÍDEOS SULFATADOS DE *Ulva fasciata*,
U. laetevirens e *Gayralia brasiliensis*: FOSFORILAÇÃO, METACRILAÇÃO, ATIVIDADE
ANTICOAGULANTE, PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS E
MACROMOLECULARES

CURITIBA

2023

LAURI ALVES JUNIOR

MODIFICAÇÕES QUÍMICAS DE POLISSACARÍDEOS SULFATADOS DE *Ulva fasciata*,
U. laetevirens e *Gayralia brasiliensis*: FOSFORILAÇÃO, METACRILAÇÃO, ATIVIDADE
ANTICOAGULANTE, PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS E
MACROMOLECULARES

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciências (Bioquímica), Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências (Bioquímica).

Orientadora: Profa. Dra. Maria E. Duarte Nosedá.

Coorientador: Prof. Dr. Miguel Daniel Nosedá

CURITIBA

2023

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Alves Junior, Lauri

Modificações químicas de polissacarídeos sulfatados de *Ulva Fasciata*, *U. laetevirens* e *Gayralia brasiliensis*: fosforilação, metacrililação, atividade anticoagulante, propriedade físico-químicas e macromoleculares / Lauri alves Junior. – Curitiba, 2023.

1 recurso on-line : PDF.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências (Bioquímica).

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria E. Duarte Nosedá.

Coorientadora: Prof. Dr. Miguel Daniel Nosedá.

1. Macroalgas verdes. 2. Ulvanas. 3. Fosforilação. I. Nosedá, Maria E. Duarte, 1955. II. Nosedá, Miguel Daniel, 1962. III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências (Bioquímica). IV. Título.

Bibliotecária: Camila de Souza Dorneles. CRB-9/2056



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS
(BIOQUÍMICA) - 40001016003P2

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação CIÊNCIAS (BIOQUÍMICA) da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **LAURI ALVES JUNIOR** intitulada: **Modificações químicas de polissacarídeos sulfatados de *Ulva fasciata*, *U. laetevirens* e *Gayralia brasiliensis*: fosforilação, metacrililação, atividade anticoagulante, propriedades físico-químicas e macromoleculares**, sob orientação da Profa. Dra. MARIA EUGÊNIA DUARTE NOSEDA, que após terem inquirido o aluno e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 26 de Setembro de 2023.

Assinatura Eletrônica

04/10/2023 14:53:50.0

MARIA EUGÊNIA DUARTE NOSEDA

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

30/09/2023 15:18:54.0

ADRIANO GONÇALVES VIANA

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA)

Assinatura Eletrônica

30/09/2023 18:05:14.0

JAQUELINE CARNEIRO

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

02/10/2023 09:03:50.0

DIOGO RICARDO BAZAN DUCATTI

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

AGRADECIMENTOS

Bom foram 4 anos de muitas descobertas, foram quase 3 anos em meio a uma pandemia, tentarei não esquecer de ninguém, o que não será uma tarefa fácil, bom antes de tudo tenho de agradecer a minha mãe por ter aguentado esses 4 anos longe e por tudo até aqui.

À minha orientadora, Profª. Dra. Maria Eugênia Duarte Nosedá, pela dedicada orientação, que em meio a todo caos desse período esteve ao apoiando e me incentivando, pela imensa paciência e antes de tudo empatia nos momentos difíceis e não menos importante pelos ensinamentos transmitidos.

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Miguel D. Nosedá, que nesse período deu sugestões muito proveitosas que acrescentou muito ao meu trabalho, por todos os equipamentos que consertamos nesse período, pela compreensão nos momentos difíceis, e pelas trocas de informações trocadas e todos os ensinamentos ao longo do desenvolvimento deste projeto.

Aos professores da banca Prof. Dr. Diogo R.B. Ducatti, Profª. Dra. Jaqueline Carneiro e Prof. Dr. Adriano Gonçalves Viana e ainda aos suplentes Profª. Dra. Joana Lea Meira Silveira e Prof. Dr. Alexandre Orsato que aceitaram o desafio de compor a banca.

Ao Prof. Dr. Diogo. Ducatti que esteve sempre junto na bancada, esteve presente nos momentos bons e ruins e principalmente pelas trocas e conselhos durante todo esse período por toda ajuda e pelas sugestões.

Ao Prof. Dr. Alan Guilherme Gonçalves pelas correções dos relatórios por compor a banca do projeto e da qualificação desta tese e por todas as sugestões.

À Profª. Dra. Jaqueline Carneiro que esteve presente como pós doc no início dessa jornada e agora contribuindo de forma mais direta na conclusão dessa etapa.

À Dra. Joana Lea Meira Silveira por todos os ensinamentos passados nas disciplinas da pós-graduação, que foram 3 até aqui, por todo carinho e paciência, por me mostrar esse mundo incrível e ainda desconhecido da físico-química dos carboidratos.

À técnica Keilla pelas análises de HPSEC-RI-MALLS por toda ajuda, pela paciência na entrega das amostras em cima da hora e por ser uma excelente profissional.

À técnica Flávia pelas análises de Dicroísmo Circular, por fazer os dias das análises mais leves e ser sempre solícita aos agendamentos.

Ao Centro de RMN- UFPR em especial ao Leo e ao Arquimedes pelas análises de RMN e pelas sugestões de análises

Aos colegas de laboratório E3 e 248 por toda ajuda, troca de ideias e amizade: Nelson, Luísa, Marcos, Manoela e todos os demais colegas que passaram por estes laboratórios ao longo do Doutorado;

À Genilza pela ajuda na atividade anticoagulante, pela troca de conhecimentos, por compartilhar as enzimas e por toda colaboração.

À Deborah e a Camila do 266 que ajudaram meus dias a serem mais leves com boas conversas, e compartilharam um pouco do seu conhecimento.

À Danielly Caetano pela companhia no 269 e pela troca de ideias e conhecimentos ao longo desse período de pós pandemia, por deixar os meus dias mais leves, pelos cafés e bolo de Santo Antônio, sem os quais eu não teria chegado até aqui.

À Dra. Mariana M. de Carvalho por ter ajudado nas coletas, e principalmente por me apresentar as Ulvanas, por me mostrar um mundo novo repleto de desafios e oportunidades, pelos ensinamentos por todo seu trabalho de pesquisa com as Ulvanas.

Ao CNPQ pela concessão de bolsa. Às demais agências de fomento e projetos que financiaram este trabalho: Fundação Araucária e Projeto Universal.

Aos meus pais e meus padrinhos pelo incentivo. Aos demais familiares e amigos.

A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu,
mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que
todo mundo vê. (Arthur Schopenhauer)

RESUMO

Macroalgas verdes pertencentes ao gênero *Ulva* constituem uma fonte renovável para a obtenção de compostos bioativos. Dentre esses compostos, merecem destaque os polissacarídeos sulfatados conhecidos como ulvanas. Ulvanas F. UF e ULT caracterizadas no presente trabalho apresentaram como principal componente o um dissacarídeo composto por unidades de ulvanobiose constituída de unidades de α -L-ramnosep 3-sulfato e β -D-xilosep respectivamente. O enfoque central deste estudo está na produção de produtos fosforilados com diferentes massas molares, a partir das ulvanas de *Ulva fasciata*, por meio de reações de fosforilação química. Os produtos resultantes, antes e depois da fosforilação química, foram submetidos a análises químicas e espectroscópicas, bem como avaliados em relação às suas atividades anticoagulantes, propriedades físico-químicas e macromoleculares. Foi possível obter ulvanas com diversos níveis de fosfatação, alcançando um teor máximo de fósforo de 1,3% através da fosforilação em meio aquoso. Já para a fosforilação em meio orgânico, o teor máximo de fósforo obtido foi de 2,6%. Adicionalmente, realizou-se a reação de metacrilção, onde as frações UFM e GBM apresentaram graus de substituição de 0,3 e 0,5, respectivamente. Atividade anticoagulante das ulvanas e seus derivados quimicamente modificados foi examinada *in vitro*, por meio de análises do tempo de tromboplastina parcial ativada (APTT) e do tempo de protrombina (PT). Ulvanas fosforiladas em meio aquoso exibiram uma atividade anticoagulante superior em comparação com as ulvanas nativas, e essa atividade foi mais pronunciada do que a observada para ulvanas fosforiladas em meio orgânico. As características macromoleculares das ulvanas e de seus produtos fosforilados em solução foram investigadas utilizando técnicas como cromatografia de exclusão de tamanho (HPSEC) e dicróismo circular (CD). Os produtos fosforilados e metacrilados demonstraram alterações macromoleculares e conformacionais no polissacarídeo, decorrentes das modificações químicas aplicadas. Tanto as ulvanas nativas quanto seus derivados fosforilados e metacrilados representaram uma classe inédita de moléculas com potencial aplicação em diferentes áreas biotecnológicas.

Palavras-chave: Macroalgas verdes. Ulvanas. Fosforilação. Metacrilção. Atividade anticoagulante. Propriedades macromoleculares. Propriedades físico-químicas.

ABSTRACT

Green macroalgae belonging to the *Ulva* genus constitute a renewable source for obtaining bioactive compounds. Among these compounds, sulfated polysaccharides known as ulvanas stand out. Ulvanas F, UF and ULT characterized in this work presented as the main component a disaccharide composed of ulvanobiose units consisting of units of α -L-rhamnose 3-sulfate and β -D-xylose respectively. The central focus of this study lies in the production of phosphorylated products with different molecular weights from *Ulva fasciata* ulvanas through chemical phosphorylation reactions. The resulting products, before and after chemical phosphorylation, underwent chemical and spectroscopic analyses and were evaluated for their anticoagulant activities, physicochemical properties, and macromolecular characteristics. Ulvanas with varying degrees of phosphorylation were obtained, reaching a maximum phosphate content of 1.3% through aqueous phosphorylation. In contrast, the maximum phosphate content achieved through organic phosphorylation was 2.6%. Additionally, a methacrylation reaction was conducted, with UFM and GBM fractions having substitution degrees of 0.3 and 0.5, respectively. The anticoagulant activity of ulvanas and their chemically modified derivatives was examined in vitro through activated partial thromboplastin time (APTT) and prothrombin time (PT) analyses. Aqueously phosphorylated ulvanas exhibited higher anticoagulant activity compared to native ulvanas, and this activity was more pronounced than that observed for organically phosphorylated ulvanas. The macromolecular characteristics of ulvanas and their phosphorylated products in solution were investigated using techniques such as size-exclusion chromatography (HPSEC) and circular dichroism (CD). The phosphorylated and methacrylated products showed macromolecular and conformational changes in the polysaccharide resulting from the applied chemical modifications. Both native ulvanas and their phosphorylated and methacrylated derivatives represent a novel class of molecules with potential applications in various biotechnological fields.

Keywords: Green macroalgae. Ulvanas. Phosphorylation. Methacrylation. Anticoagulant activity. Macromolecular properties. Physicochemical properties.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - <i>Ulva fasciata</i>	19
FIGURA 2 - <i>Ulva laetevirens</i>	20
FIGURA 3 - <i>Gayralia brasiliensis</i>	21
FIGURA 4 - FLUXOGRAMA DE EXTRAÇÃO AQUOSA DOS POLISSACARÍDEOS DE <i>Ulva fasciata</i>	22
FIGURA 5 - FLUXOGRAMA DE EXTRAÇÃO AQUOSA DOS POLISSACARÍDEOS DE <i>Gayralia Brasiliensis</i>	23
FIGURA 6 - MODIFICAÇÕES QUÍMICAS DE ULVANAS DE <i>Ulva fasciata</i> REALIZADAS NO PRESENTE TRABALHO.....	24
FIGURA 7 - DÍADES PRESENTES EM ULVANAS.....	31
FIGURA 10 - MECANISMO DE FOSFORILAÇÃO STPP-STMP.....	37
FIGURA 11 - MECANISMO DE FOSFORILAÇÃO H ₃ PO ₄ - UREIA.....	40
FIGURA 12 - ESQUEMA DE METACRILAÇÃO QUÍMICA DE ULVANAS UTILIZANDO COMO MODELO A DÍADE A _{3S}	42
FIGURA 13 - MODELO CLÁSSICO DE COAGULAÇÃO <i>in vitro</i>	44
FIGURA 14 - MODELO DE COAGULAÇÃO <i>in vivo</i>	45
FIGURA 15 - ESPECTRO FT-IR DA FRAÇÃO UF (A) FRAÇÃO F (B) E FRAÇÃO ULT (C) - REGIÃO DE 650 – 4000 CM ⁻¹	51
FIGURA 16 - ESPECTRO DE HSQC DA FRAÇÃO F REGIÃO DE 88-110 ppm (A) DE 65- 88 PPM (B) DE 23-13 PPM (C).....	53
FIGURA 17 - ESPECTRO DE HSQC DA FRAÇÃO UF REGIÃO DE 88-110 ppm (A) DE 65-88 PPM (B) DE 23-13 PPM (C)	54
FIGURA 18 - ESPECTRO DE HSQC DA FRAÇÃO ULT REGIÃO DE 88-110 ppm (A) DE 65-88 PPM (B) DE 23-13 PPM (C)	55
FIGURA 19 - ESPECTRO FT-IR DA FRAÇÕES 1R E 2R (A) 3R E 4R (B), 5R E 6R (C) OBTIDOS APÓS FOSFORILAÇÃO QUÍMICA - REGIÃO DE 650 – 4000 CM ⁻¹	60
FIGURA 20 - ESPECTRO DE RMN DE ³¹ P DA FRAÇÃO 6R.	61
FIGURA 21 - ESPECTROS DE RMN DE ³¹ P(¹ H) DAS ALÍQUOTAS DA REAÇÃO DE FOSFORILAÇÃO DA ULVANA UF	63
FIGURA 22 - ESPECTRO DE RMN DE ³¹ P DA FRAÇÃO 9R.....	64

FIGURA 23 - ESPECTRO DE HMBC DE $^3\text{P}/^1\text{H}$ DA FRAÇÃO 9R REGIÃO DE 5 - 25 PPM	65
FIGURA 24 - ESPECTRO DE HSQC DA FRAÇÃO 9R - REGIÃO DE 88-110 PPM (A) DE 65-88 PPM (B) DE 23-13 PPM (C)	66
FIGURA 25 - ESPECTRO DE ^1H DA FRAÇÃO 9R - REGIÃO DE 4,50 - 3,20 PPM.....	67
FIGURA 26 – UNIDADE DE GLUCOSE 6-FOSFATO.....	68
FIGURA 27 - ESPECTRO FT-IR DA FRAÇÃO XP1 (A), XP2 (B), XP3 (C) E XP4 (D) OBTIDOS APÓS FOSFORILAÇÃO QUÍMICA - REGIÃO DE 650 – 4000 CM^{-1}	70
FIGURA 28 - ESPECTRO FT-IR DA FRAÇÃO UF-P (A), UF-P1 (B), UF-P2 (C) E UF-P3 (D) OBTIDOS APÓS FOSFORILAÇÃO QUÍMICA - REGIÃO DE 650 – 4000 CM^{-1}	71
FIGURA 29 – ESPECTRO DE RMN DE ^3P DAS FRAÇÕES UF-P (A), UF-P1 (B), UF-P2 (C) E UF-P3 (D) – REGIÃO 2 A -22 PPM.....	73
FIGURA 30 – ESPECTRO DE RMN DE ^3P DAS FRAÇÕES XP1 (A), XP2 (B), XP3 (C) E XP4 (D) – REGIÃO 2 A -23 PPM	74
FIGURA 31 - ESPECTRO FT-IR DA FRAÇÃO UF (A), UFM (B), GB (C) E GBM (D) OBTIDOS APÓS METACRILAÇÃO QUÍMICA – REGIÃO DE 650 A 4000 CM^{-1}	75
FIGURA 32 – ESPECTRO DE RMN DE ^1H DA FRAÇÃO UFM – REGIÃO DE 7,00 – 1,00 PPM.....	76
FIGURA 33 – ESPECTRO DE RMN DE ^1H DA FRAÇÃO GBM – REGIÃO DE 7,00 – 1,00 PPM.....	77
FIGURA 34 - PERFIL DE ELUIÇÃO DE HPSEC DA ULVANAS UF, F E ULT	78
FIGURA 35 - PERFIL DE ELUIÇÃO DE HPSEC COM DETECTOR DE ÍNDICE DE DERIVADOS FOSFORILADOS EM MEIO AQUOSO.....	79
FIGURA 36 - PERFIL DE ELUIÇÃO DE HPSEC DA FRAÇÕES OBTIDAS APÓS A FOSFORILAÇÃO QUÍMICA EM MEIO ORGÂNICO	80
FIGURA 37 - PERFIL DE ELUIÇÃO DE HPSEC DA FRAÇÕES GB e GBM (A) UF e UFM (B).....	80
FIGURA 38 - ESPECTRO DE VARREDURA DE DICROISMO CIRCULAR (197 A 250 NM) DA FRAÇÃO UF (A) E F (B).....	81

FIGURA 39 - ESPECTRO DE VARREDURA DE DICROISMO CIRCULAR (197 A 250 NM) DA FRAÇÃO 6R (A) E 9R (B), OBTIDAS APÓS FOSFORILAÇÃO	82
FIGURA 40 - ESPECTRO DE VARREDURA DE DICROISMO CIRCULAR (197 A 250 NM) DA FRAÇÃO XP1 (A), XP2 (B), XP3 (C) E XP4 (D), OBTIDAS APÓS FOSFORILAÇÃO	83
FIGURA 41 - ESPECTRO DE VARREDURA DE DICROISMO CIRCULAR (197 A 250 NM) DA FRAÇÃO UF-P (A), UF-P1 (B), UF-P2 (C) E UF-P3 (D), OBTIDAS APÓS FOSFORILAÇÃO	84
FIGURA 42 - ESPECTRO DE VARREDURA DE DICROISMO CIRCULAR (197 A 250 NM) DA FRAÇÃO GB (A), GBM (B), OBTIDAS APÓS MODIFICAÇÃO QUÍMICA	85
FIGURA 43 - ESPECTRO DE VARREDURA DE DICROISMO CIRCULAR (197 A 250 NM) DA FRAÇÃO UF (A), UFM (B), OBTIDAS APÓS MODIFICAÇÃO QUÍMICA	85
FIGURA 44 - GRÁFICO DE APTT EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ULVANAS UF, F E ULT E SEUS PRODUTOS MODICADOS	87
FIGURA 45 - GRÁFICO DE CN2APTT DE ULVANAS UF, F E ULT E SEUS PRODUTOS MODIFICADOS	90
FIGURA 46 - GRÁFICO DE PT EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ULVANAS UF, F E ULT E SEUS PRODUTOS MODIFICADOS	92
FIGURA 47 - GRÁFICO DE CN2PT PARA ULVANAS UF, F E ULT E SEUS PRODUTOS MODIFICADOS	94

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - FOSFORILAÇÃO QUÍMICA EM MEIO AQUOSO.....	25
TABELA 2 - FOSFORILAÇÃO QUÍMICA EM MEIO ORGÂNICO.....	25
TABELA 3 - RENDIMENTO E ANÁLISES QUÍMICAS FRAÇÕES F, UF E ULT	50
TABELA 4 - DESLOCAMENTOS QUÍMICOS (PPM) NOS ESPECTROS DA FRAÇÃO F	56
TABELA 5 - DESLOCAMENTOS QUÍMICOS (PPM) NOS ESPECTROS DA FRAÇÃO UF.....	56
TABELA 6 - DESLOCAMENTOS QUÍMICOS (PPM) DOS ESPECTROS DA FRAÇÃO ULT	57
TABELA 7 - CONDIÇÕES DE FOSFORILAÇÃO QUÍMICA	58
TABELA 8 - ANÁLISES QUÍMICAS DA FRAÇÃO UF E DE SEUS DERIVADOS APÓS FOSFORILAÇÃO.....	58
TABELA 9 - CONTROLE DE TEMPERATURA E PH NA OBTENÇÃO DA FRAÇÃO 9R	61
TABELA 10 - FOSFORILAÇÃO QUÍMICA EM MEIO ORGÂNICO	69
TABELA 11 - ANÁLISES QUÍMICAS DA FRAÇÃO UF E DE SEUS DERIVADOS APÓS FOSFORILAÇÃO.....	72
TABELA 12 - TESTE DE APTT DE ULVANAS UF, F E ULT E SEUS PRODUTOS MODIFICADOS.....	87
TABELA 13 - EQUAÇÃO DA RETA, CN ₂ APTT E $\Delta T.MG^{-1}$ DE ULVANAS UF, F E ULT E SEUS PRODUTOS MODIFICADOS.....	88
TABELA 14 - TESTE DE PT DAS ULVANAS UF, F E ULT E SEUS PRODUTOS MODIFICADOS.....	91
TABELA 15 - EQUAÇÃO DA RETA, CN ₂ APTT E $\Delta T.MG^{-1}$ DE ULVANAS UF, F E ULT E SEUS PRODUTOS MODIFICADOS.....	93

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ΔT – Variação de tempo

APTT – Tempo de tromboplastina parcial ativada

CN2APTT – concentração necessária para dobrar o valor normal do APTT

DS - Grau de substituição

FTIR – Infravermelho com transformada de Fourier

HCII – Cofactor II da heparina

HMBC – Heteronuclear multiple bond correlation spectroscopy

HMWK – Cininogênio de alta massa molar

HSQC – Heteronuclear single quantum correlation spectroscopy

HPSEC – High Pressure Size Exclusion chromatography

LMWH – Heparina de baixa massa molar

MALLS – Multi-angle laser light scattering

PT – Tempo de protrombina

RI – Índice de refração

RMN – Ressonância magnética nuclear

RMN 1H – Ressonância magnética nuclear de hidrogênio

RMN ^{13}C – Ressonância magnética nuclear de carbono treze

RMN ^{31}P – Ressonância magnética nuclear de fosforo

STMP – Trimetafosfato de sódio

STPP – Tripolifosfato de sódio

TFA – Ácido trifluoracético

TFPI – Inibidor da via do fator tissular

UFH – Heparina não fracionada

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 JUSTIFICATIVA	17
1.2 OBJETIVOS.....	18
1.2.1 Objetivo geral	18
1.2.2 Objetivos específicos	18
2 METODOLOGIA	19
2.1 POSICIONAMENTO SISTEMÁTICO DAS ESPÉCIES ESTUDADAS	19
2.1.1 <i>Ulva fasciata</i>	19
2.1.2 <i>Ulva laetevirens</i>	20
2.1.3 <i>Gayralia brasiliensis</i>	21
2.2 COLETA E PROCESSAMENTO.....	21
2.3 EXTRAÇÃO	22
2.4 MODIFICAÇÕES QUÍMICAS DE ULVANAS.....	24
2.5 MÉTODOS DE FOSFORILAÇÃO QUÍMICA	24
2.5.1 Método de fosforilação química em meio aquoso.....	24
2.5.2 Método de fosforilação química em meio orgânico.....	25
2.6 METACRILAÇÃO QUÍMICA DE ULVANAS	26
2.7 MÉTODOS ANALÍTICOS GERAIS	26
2.7.1 Determinação do teor de carboidratos.....	26
2.7.2 Determinação do teor de proteínas.....	26
2.7.3 Determinação de grupos sulfato	26
2.7.4 Determinação de ácidos urônicos.....	27
2.7.5 Determinação de teores de fósforo.....	27
2.8 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS.....	27
2.9 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN).....	28
2.10 INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FT-IR)	28
2.11 ENSAIO DE ATIVIDADE ANTICOAGULANTE <i>IN VITRO</i>	29
2.12 ANÁLISES DE DICROISMO CIRCULAR	29
3 REVISÃO DE LITERATURA	30
3.1 POLISSACARÍDEOS BIOSINTETIZADOS POR MACROALGAS VERDES DA ORDEM ULVALES	30
3.1.1 Estrutura química de ulvanas.....	30

3.1.2 Atividades biológicas de ulvanas	32
3.2 MODIFICAÇÃO QUÍMICA DE POLISSACARÍDEOS	35
3.2.1 Fosforilação química de polissacarídeos	36
3.2.2 Metacilação de polissacarídeos	42
3.3 HEMOSTASIA E COAGULAÇÃO	44
3.4 DICROISMO CIRCULAR DE CARBOIDRATOS	47
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
4.1 EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DE ULVANAS	50
4.2 FOSFORILAÇÃO QUÍMICA DE ULVANAS EM MEIO AQUOSO.....	58
4.3 FOSFORILAÇÃO QUÍMICA EM MEIO ORGÂNICO	69
4.4 METACRILAÇÃO QUÍMICA DE POLISSACARÍDEOS.....	75
4.5 PROPRIEDADES MACROMOLECULARES DAS ULVANAS NATIVAS E DE SEUS PRODUTOS OBTIDOS APÓS A MODIFICAÇÃO QUÍMICA.....	78
4.5.1 Cromatografia de Exclusão por Tamanho de Alto Desempenho (HPSEC)	78
4.6 DICROISMO CIRCULAR.....	81
4.7 ATIVIDADE ANTICOAGULANTE DE ULVANAS E SEUS PRODUTOS MODIFICADOS QUIMICAMENTE	86
4.7.1 Teste de tempo de tromboplastina parcial ativada (aPTT).....	86
4.7.2 Teste de tempo de trombina (PT).....	91
4.8 CONCLUSÕES	95
REFERÊNCIAS.....	98

1 INTRODUÇÃO

A modificação química de polissacarídeos vem despertando grande interesse na área da química e da bioquímica, pois a introdução de grupos fosfato em suas estruturas pode desencadear uma série de efeitos significativos em suas propriedades físicas e biológicas. A fosforilação, que consiste na incorporação de grupos fosfato em polissacarídeos, tem se mostrado uma estratégia promissora para aprimorar as funcionalidades dessas biomoléculas, tomando-as mais solúveis em água e alterando sua massa molar e conformação.

Diversos polissacarídeos, como celulose, quitosana, amido e dextrana, têm sido alvo de fosforilação química, resultando em moléculas renováveis e com potenciais aplicações biotecnológicas. Essa modificação química pode conferir aos polissacarídeos propriedades bioativas, incluindo atividades antitumorais, antivirais, antioxidantes e anticoagulantes, tomando-os candidatos promissores para o desenvolvimento de novos fármacos e biomateriais.

Entretanto, as vias de fosforilação química em polissacarídeos são desafiadoras, especialmente considerando que muitos desses compostos são insolúveis em água ou solventes orgânicos. A escolha cuidadosa do solvente é essencial para garantir o sucesso da reação de fosforilação, e diversas metodologias têm sido empregadas para superar esse obstáculo.

Neste contexto, este trabalho busca explorar as diferentes metodologias para a introdução de grupos fosfato em polissacarídeos, destacando os agentes fosforilantes mais utilizados, como ácido fosfórico e seu anidrido, oxicloreto de fósforo, fosfato e pentóxido de fósforo. Será também abordada a importância do conhecimento prévio da estrutura química do polissacarídeo para a definição das condições adequadas de fosforilação.

Ao compreender os mecanismos de fosforilação química e suas implicações nas propriedades biológicas dos polissacarídeos, este trabalho contribui para o desenvolvimento de novas aplicações e avanços na área da química de biomoléculas, oferecendo uma base para futuras investigações nesse campo promissor.

1.1 JUSTIFICATIVA

Ulvanas biosintetizadas por macroalgas verdes são uma fonte para obtenção de compostos bioativos de baixo custo com potencial aplicação biomédica, como a atividade anticoagulante. Apesar ulvanas possuírem grupos sulfato e carboxila, conferindo-lhes um caráter iônico, quando comparadas a outros polissacarídeos iônicos apresentam um efeito menor no tempo de coagulação sanguínea. Para a obtenção de derivados com diferentes propriedades biológicas atividade anticoagulante, se faz necessário substituir grupos químicos através de modificações químicas.

Estratégia de modificação química proposta neste trabalho consiste na adição de grupos funcionais fosfato ocasionando o aumento da carga negativa, promovendo assim uma maior afinidade por proteínas coagulantes. Os derivados obtidos por fosforilação podem potencializar a atividade anticoagulante, bem como alterar as propriedades físico-químicas e macromoleculares (massa molar, viscosidade intrínseca e conformação).

Os derivados fosforilados foram avaliados quanto a sua possível ação na cascata de coagulação sanguínea. Destaca-se que a presença de grupos sulfato e fosfato em uma molécula podem aumentar a afinidade com o cálcio, cátion associado com fatores da cascata de coagulação, além de um possível sinergismo entre esses grupos funcionais o que torna estes derivados potenciais agentes anticoagulantes. Para tanto, o composto poderá apresentar o máximo de atividade anticoagulante e baixo risco hemorrágico e de efeitos colaterais.

É necessário buscar novas moléculas com propriedades anticoagulantes, já que a heparina, um polissacarídeo amplamente utilizado na prática médica, tem seu uso limitado devido aos efeitos colaterais que pode causar em pacientes, além do risco potencial de contaminação viral associado à sua origem animal. Portanto, o objetivo deste trabalho é obter ulvanas e seus derivados fosforilados e avaliar como essas moléculas se comparam às ulvanas nativas em termos de suas propriedades físico-químicas, macromoleculares e biológicas.

Adicionalmente ulvanas e heteroramnanas foram submetidas metacrilção que de maneira semelhante a fosforilação pode ser usada para modificar suas propriedades físico-químicas do polissacarídeo. Por exemplo, pode-se alterar a solubilidade, a resistência mecânica, a biodegradabilidade, entre outras propriedades dos polissacarídeos. Isso pode ser particularmente útil na área de biomateriais, onde os polissacarídeos modificados podem ser usados para uma variedade de aplicações, como a liberação controlada de medicamentos, engenharia de tecidos, entre outros.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo geral

Fosforilar e Metacrililar quimicamente heteropolissacarídeos sulfatados obtidos de macroalgas verdes e analisar a atividade anticoagulante *in vitro*, propriedades físico-químicas e macromoleculares dos polissacarídeos nativos e de seus produtos modificados.

1.2.2 Objetivos específicos

- 1) Extrair, purificar e caracterizar as ulvanas da macroalga verde *Ulva fasciata* e *Ulva laetevirens*;
- 2) Fosforilar ulvanas de *Ulva fasciata*;
- 3) Metacrililar ulvanas de *Ulva fasciata* e heteroramnanas de *Gayralia brasiliensis*;
- 4) Caracterizar quimicamente e espectroscopicamente ulvanas nativas e de seus produtos modificados quimicamente após fosforilação ou metacrililação;
- 5) Determinar a homogeneidade por análise de HPSEC de ulvanas nativas e de seus produtos modificados quimicamente após fosforilação ou metacrililação;
- 6) Determinar conformação secundária por dicroísmo circular de ulvanas nativas e de seus produtos modificados quimicamente após fosforilação ou metacrililação;
- 7) Avaliar a ação anticoagulante *in vitro* de ulvanas nativas e de seus produtos modificados quimicamente após fosforilação ou metacrililação.

2 METODOLOGIA

2.1 POSICIONAMENTO SISTEMÁTICO DAS ESPÉCIES ESTUDADAS

2.1.1 *Ulva fasciata*

Super-Reino: Eucariota

Reino: Plantae

Sub-reino: Viridaeplantae

Filo: Chlorophyta

Sub-filo: Chlorophytina

Classe: Ulvophyceae

Ordem: Ulvales

Família: Ulvaceae

Gênero: *Ulva*

Espécie: *Ulva fasciata* Delile

FIGURA 1 - *Ulva fasciata*



Fonte: *Ulva fasciata* Delile : AlgaeBase [s.d.]

2.1.2 *Ulva laetevirens*

Super-Reino: Eucariota

Reino: Plantae

Sub-reino: Viridaeplantae

Filo: Chlorophyta

Sub-filo: Chlorophytina

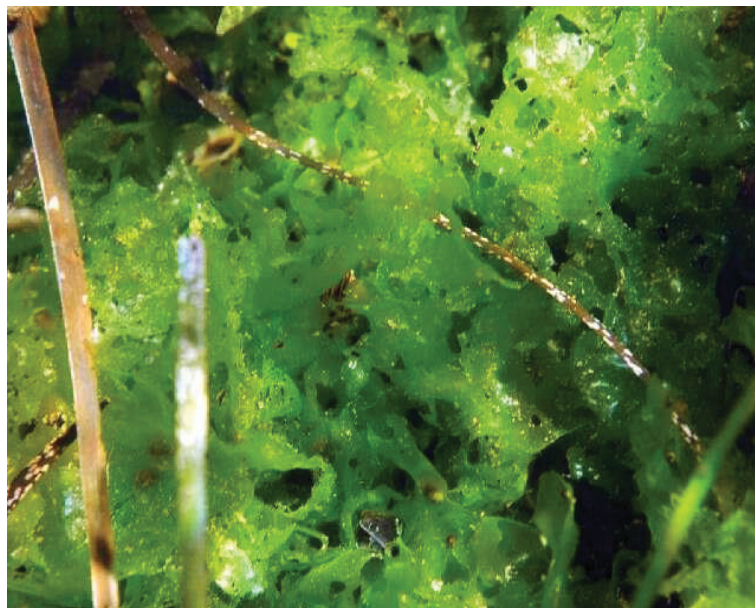
Classe: Ulvophyceae

Ordem: Ulvales

Família: Ulvaceae

Gênero: *Ulva laetevirens* J. E. Areschoug

FIGURA 2 - *Ulva laetevirens*



Fonte: University of New Brunswick. Gary W. Saunders, 2010.

2.1.3 *Gayralia brasiliensis*

Super-Reino: Eucariota

Reino: Plantae

Sub-reino: Viridaeplantae

Filo: Chlorophyta

Sub-filo: Chlorophytina

Classe: Ulvophyceae

Ordem: Ulotrichales

Família: Gayraliaceae

Gênero: *Gayralia brasiliensis* Pellizzari, M.C.Oliveira & N.S.Yokoya

FIGURA 3 - *Gayralia brasiliensis*



Fonte: YOKOYA et al., 2023

2.2 COLETA E PROCESSAMENTO

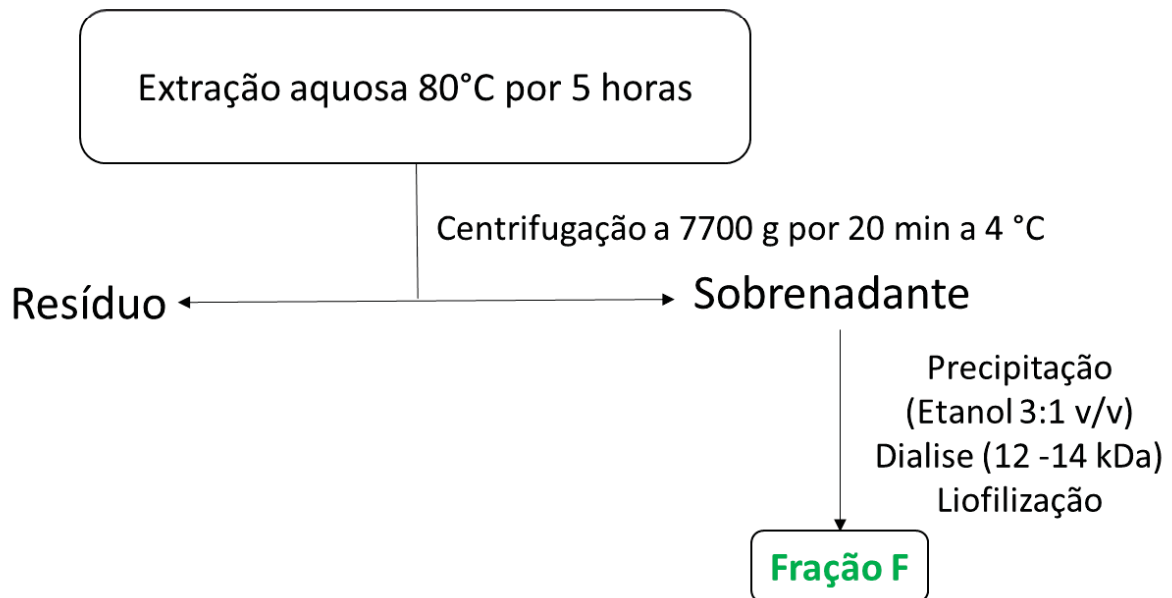
Os exemplares da alga verde *Ulva fasciata* (Chlorophyta) (fig. 1) foram coletados em Matinhos-PR em novembro de 2019 e identificados pela bióloga Vanessa Sayuri Osaki mestranda no Programa de Pós-graduação em Botânica do Instituto de Biociências (USP).

Os exemplares de *Gayralia brasiliensis* (fig. 3) foram coletados em seu ambiente natural na baía de Paranaguá, no município de Paranaguá-PR, identificadas e cedidas pela Dra. Franciane Maria Pellizzari (Departamento de Ciências Biológicas – Universidade Estadual do Paraná – Campus de Paranaguá)

2.3 EXTRAÇÃO

Os exemplares da macroalga verde *Ulva fasciata* foram secos em estufa de circulação forçada de ar a 60 °C por 24 horas, moídos em liquidificador e então submetidos à extração aquosa (5% m/v) a 80 °C sob agitação mecânica por 5 horas. Os extratos foram centrifugados a 7700 g por 20 minutos a 4 °C. Após centrifugação o sobrenadante foi concentrado à pressão reduzida em rotaevaporador, adicionados etanol (3:1 v/v) e acetato de potássio. O precipitado etanólico foi ressolubilizado em água, dialisado sequencialmente (membrana de 12-14 kDa) contra NaCl 1,0 mol.L⁻¹ (16 h), contra água destilada e água ultrapura, acompanhada por condutivímetro, até que a água da diálise apresentasse condutividade igual à da água ultrapura. Após diálise, a amostra foi congelada, liofilizada e armazenada em dessecador, dando origem a fração F (fig. 4) (CARVALHO et al., 2018; COLODI et al., 2021).

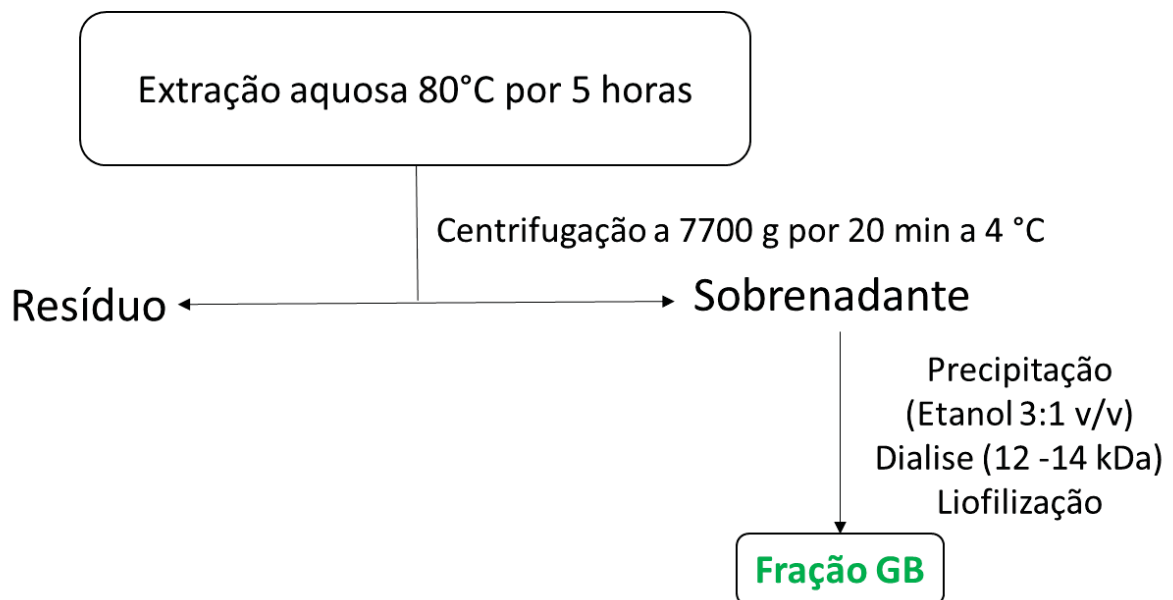
FIGURA 4 - FLUXOGRAMA DE EXTRAÇÃO AQUOSA DOS POLISSACARÍDEOS DE *Ulva fasciata*



Fonte: O autor, 2023

Os exemplares da macroalga *Gayralia brasiliensis* secos e moídos foram submetidos a extrações aquosas por. A extração foi realizada na concentração 3% (m/v), a 80°C, sob agitação mecânica por 5 h. Na sequência os extratos foram tratados com etanol (3:1 v/v) e acetato de potássio (CH₃COOK) para precipitação dos polissacarídeos. Após a precipitação o material obtido foi centrifugado (7700 x g, 20 minutos, 5°C). Os polissacarídeos foram ressolubilizados em água destilada em sequência os polissacarídeos foram dialisados sequencialmente (membrana de 12 a 14 kDa) contra água destilada, NaCl 1,0 mol.L⁻¹ e água destilada e posteriormente liofilizados (figura 5).

FIGURA 5 - FLUXOGRAMA DE EXTRAÇÃO AQUOSA DOS POLISSACARÍDEOS DE *Gayralia Brasiliensis*

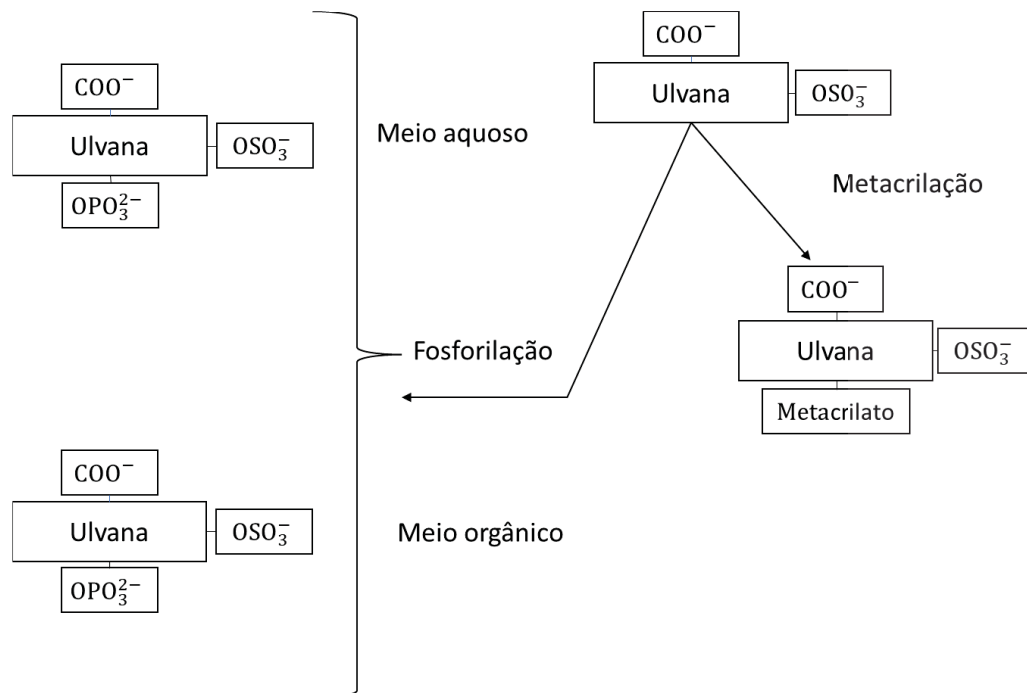


Fonte: o autor, 2023.

2.4 MODIFICAÇÕES QUÍMICAS DE ULVANAS

O fluxograma com as modificações químicas realizadas no presente trabalho, bem como a denominação das frações obtidas após estas reações, estão apresentados na figura 6.

FIGURA 6 - MODIFICAÇÕES QUÍMICAS DE ULVANAS DE *Ulva fasciata* REALIZADAS NO PRESENTE TRABALHO



Fonte: O autor, 2023

2.5 MÉTODOS DE FOSFORILAÇÃO QUÍMICA

2.5.1 Método de fosforilação química em meio aquoso

Ulvanas de *Ulva fasciata* foram fosforiladas pelo método (STMP-STPP), as frações foram dissolvidas em água destilada na concentração de 10 mg.mL⁻¹ então adicionados os agentes fosforilantes trimetafosfato de sódio (STMP) e tripolifosfato de sódio (STPP) em diferentes concentrações, correspondendo a igual concentração do polissacarídeo.

A reação teve início em diferentes temperaturas (30 – 100 °C) com 5 a 24 horas de duração (FENG et al., 2017; JIANG et al., 2020) pH 7 – 10. Ao término da reação foi realizada a precipitação com etanol (reações 1R a 6R) (3 volumes) e posterior dialise em membrana de 6 - 8 kDa e liofilização. A fração 9R foi dialisada em membrana de 6 - 8 kDa sem a precipitação em etanol 3 volumes e posterior liofilização.

TABELA 1 - FOSFORILAÇÃO QUÍMICA EM MEIO AQUOSO

Fração	Agente fosforilante	Condições	Referências
1R	1:2 - STMP-STPP	H ₂ O – 30 °C - pH 7 - 24 horas	O autor, 2023
2R	1:2 - STMP-STPP	H ₂ O – 30 °C - pH 10 - 24 horas	O autor, 2023
3R	1:2 - STMP-STPP	H ₂ O – 30 °C - pH 7 - 5 horas	O autor, 2023
4R	1:2 - STMP-STPP	H ₂ O – 60 °C - pH 7 - 5 horas	(FENG et al., 2017)
5R	1:2 - STMP-STPP	H ₂ O – 80 °C - pH 7 - 5 horas	O autor, 2023
6R	1:6 - STMP-STPP	H ₂ O – 100 °C - pH 9 - 7 horas	(JIANG et al., 2020)
9R	1:6 - STMP-STPP	H ₂ O – 30 °C - pH 7 - 6 horas	O autor, 2023

2.5.2 Método de fosforilação química em meio orgânico

Ulvanas de *Ulva fasciata* foram fosforiladas em meio orgânico por de diferentes métodos de fosforilação (tabela 2) usando dimetilformamida (anidra) (DMF(a)) como solvente orgânico. Ao término das reações com ácido fosfórico foi realizada a neutralização com solução saturada de bicarbonato de sódio, e posteriormente foi realizada a precipitação com etanol (3 volumes) e posterior dialise em membrana de 6 - 8 kDa e liofilização.

Adicionalmente s foi usado 3,5 g de ureia e 3,0 equivalentes de tributilamina para cada mmol de ácido fosfórico, a adição de moléculas nitrogenadas tem como principal função neutralizar os ácidos formados no decorrer da reação, evitando a degradação do polissacarídeo ocasionado por hidrólise ou pelo processo de fosforólise.

TABELA 2 - FOSFORILAÇÃO QUÍMICA EM MEIO ORGÂNICO

Fração	Agente fosforilante	Condições	Referências
XP1	STPP (3,5 mmol.L ⁻¹) ^(a)	DMF(a) – 120 °C - 6 horas	(WHISTLER; TOWLE, 1969) ^(b)
XP2	STMP (3,5 mmol.L ⁻¹) ^(a)	DMF(a) – 120 °C - 6 horas	(WHISTLER; TOWLE, 1969) ^(b)
XP3	STPP (3,5 mmol.L ⁻¹) ^(a)	DMF(a) – 30 °C - 24 horas	(INOUE et al., 1983) ^(b)
XP4	STMP (3,5 mmol.L ⁻¹) ^(a)	DMF(a) – 30 °C – 24 horas	(INOUE et al., 1983) ^(b)
UF-P	Ácido Fosfórico (20,0 mmol.L ⁻¹) ^(c)	DMF(a) – 30 °C - 6 horas	(COLEMAN et al., 2011) ^(b)
UF-P1	Acido Fosfórico (10,0 mmol.L ⁻¹) ^(c)	DMF(a) – 30 °C - 6 horas	(COLEMAN et al., 2011) ^(b)
UF-P2	Acido Fosfórico (15,0 mmol.L ⁻¹) ^(c)	DMF(a) – 30 °C - 6 horas	(COLEMAN et al., 2011) ^(b)
UF-P3	Acido Fosfórico (5,0 mmol.L ⁻¹) ^(c)	DMF(a) – 30 °C - 6 horas	(COLEMAN et al., 2011) ^(b)

^(a)3,0 eq. de tributilamina. ^(b) adaptado . ^(c) 3,5 g de ureia.

2.6 METACRILAÇÃO QUÍMICA

Ulvanas de *Ulva fasciata* e heteroramnanas de *Gayralia brasilienses* foram funcionalizadas pela adição de grupos metacrilato usando anidrido metacrílico (MA) de acordo com um protocolo de Morelli et al. 2012. Uma solução contendo ulvanas ou heteroramnanas (1g, 0,0025 mol de díades repetitivas de ulvanas) em água deionizada (20 mL), anidrido metacrílico (26,9 mL, 0,181 mol) foi adicionado lentamente para evitar mudanças abruptas de pH e temperatura meio reacional. Uma solução aquosa de NaOH 5,0 mol.L⁻¹ (razão molar de 1,12 em relação a MA) foi então adicionada gota a gota ao meio reacional para manter o pH entre 7,5 e 8,0. O meio reacional foi deixado sob agitação por 2 h à temperatura ambiente e mais 24 h a 4 °C. O produto foi recuperado após precipitação em etanol 3V e posterior diálise contra água e posterior liofilização.

2.7 MÉTODOS ANALÍTICOS GERAIS

2.7.1 Determinação do teor de carboidratos

A determinação do teor de carboidratos totais foi realizada através do método fenol-ácido sulfúrico Dubois et al., 1956 utilizando como padrão uma solução de ramnose (70%) e ácido glucurônico (30%). Essa metodologia apresenta uma linearidade entre 10 – 40 µg de carboidratos e leitura da absorbância no 480 nm.

2.7.2 Determinação do teor de proteínas

A determinação do teor de proteínas foi realizada pelo método de Lowry et al., 1951 utilizando como reagente Folin-Ciocalteu. Essa metodologia apresenta uma linearidade de 5 – 100 µg de proteína. Como solução padrão foi utilizada uma solução de albumina de soro bovino (BSA) 1,0 mg.mL⁻¹ como solução padrão e leitura da absorbância em 660 nm.

2.7.3 Determinação de grupos sulfato

Para a determinação dos teores de grupos sulfato presentes nos polissacarídeos, foi utilizado o método de acordo com Dodgson e Price, 1962, usando como reagente a mistura gelatina-bário. Inicialmente foi realizada a hidrólise total dos polissacarídeos utilizando HCl

1N, por 5 horas a 105°C, para liberação dos grupos sulfato. Foi utilizado uma solução de sulfato de sódio diluído em HCl (100 µg/100 µL) como padrão. Essa metodologia apresenta linearidade entre 20 – 200 µg de grupos sulfato com leitura da absorbância em 360 nm

2.7.4 Determinação de ácidos urônicos

As dosagens de ácidos urônicos foram realizadas pelo método de determinação em microplaca de 96 poços com *m*-hidroxidifenil. (HOOGEN et al., 1998). Uma diluição seriada do padrão (ácido glucurônico e das amostras (50 µL, 1 mg.mL⁻¹) foi colocada em uma placa de 96 poços. Posteriormente, 200 µL de tetraborato de sódio 25 mM em H₂SO₄ solução foi adicionada. Em seguida, a placa foi aquecida a 80 °C por 60 min em estufa, adicionou-se 50 µL de *m*-hidroxidifenil em DMSO foi cuidadosamente adicionado. Foi realizada a leitura antes e após a adição *m*-hidroxidifenil, a leitura da absorbância foi realizada em 540 nm.

2.7.5 Determinação de teores de fósforo

As dosagens de fosfatos foram realizadas pelo método de molibdato de amônio/ácido ascórbico método baseia-se na liberação do fósforo como ortofosfato em solução de HCl 0,4 mol.L⁻¹ e posterior análise colorimétrica. Os ortofosfatos liberados reagem com o molibdato formando um complexo fosfomolibdico. Este complexo é reduzido pelo ácido ascórbico formando um complexo intensamente azulado. A cor desenvolvida é proporcional à concentração de fósforo e lida em espectrofotômetro. Foi utilizado uma solução padrão fosfato de sódio 1,0 mol.L⁻¹ diluído (100 µg/100 µL) como padrão Essa metodologia apresenta linearidade entre 10 – 2000 µg, a leitura absorbância realizada em 650 nm (GREENFIELD; KALBER, 1954).

2.8 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

Para as análises de HPSEC-MALLS-IR-VIS, as amostras foram solubilizadas na concentração de 1,0 mg.mL⁻¹ em solução de NaNO₃ 0,1 mol.L⁻¹ contendo azida de sódio (200 ppm) e filtradas em membranas Millipore (acetato de celulose) de 0,22 µm. As análises foram realizadas em cromatógrafo de exclusão estérica de alta pressão (HPSEC) WATERS, equipado com um detector de índice de refração (IR) diferencial WATERS modelo 2410 e com detector de espalhamento de luz em multiângulos (MALLS) WAYTT TECHNOLOGY, modelo DAWN

DSP, com 18 detectores dispostos ao redor da fotocélula em diferentes ângulos. Sendo utilizadas quatro colunas de gel permeação WATERS, com limites de exclusão de 7×10^6 , 4×10^5 , 8×10^4 e 5×10^3 g.mol⁻¹ (Colunas Ultrahydrogeltm 2000, 500, 250 e 120, respectivamente) em série e utilizado como eluente uma solução de nitrito de sódio (NaNO₂ 0,1 mol.L⁻¹) contendo azida de sódio (200 ppm), pressão de 920 psi a 20 °C.

Para a análises da composição de monossacarídeos, os polissacarídeos foram hidrolisados (1,0 mol.L⁻¹ TFA, 100 °C, 4h) reduzidos (NaBH₄, 16h, 25°C), acetilados (anidrido acético 0,5 mL e acetato de sódio como catalisador, 1h, 100 °C) e analisado por GC em cromatógrafo Varian 3800. A coluna capilar (30m×0,25mm) foi revestida com DB-225MS (Durabond). O cromatógrafo foi programado para funcionar a 50°C por 1 min, depois de 50 a 215 °C a 40 °C min⁻¹, usando hélio como gás de arraste (1,0 mLmin⁻¹). Os acetatos de alditol foram identificados por tempos de retenção de GC.

2.9 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)

As análises de ressonância magnética nuclear mono (¹³C, ¹H e ³¹P) e bidimensionais foram realizadas em espectrômetro da marca BRUKER, modelo DRX 400 (400 MHz), série Avance, em tubos de 5 mm de diâmetro, utilizando acetona como padrão interno, tanto para as análises de ¹³C (31,45 ppm) quanto para ¹H (2,225 ppm). As análises monodimensionais de ³¹P foram realizadas no equipamento Bruker DPX 200 (200 MHz), equipado com sonda pentanuclear de observação direta de dois canais (¹H/²H e ¹³C ou ¹⁹F ou ³¹P), utilizando o padrão externo de ácido fosfórico 85 % ³¹P (0.00 ppm).

2.10 INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FT-IR)

As análises de infravermelho foram realizadas utilizando um espectrômetro ALPHA Bruker com Transformada de Fourier (TF). A análise direta das amostras foi realizada utilizando acessório de reflectância atenuada - ATR (Centro de Estudos em Biofarmácia - UFPR). As amostras foram e secas em estufa e analisadas em contato direto com o laser e o espectro adquirido com 64 varreduras, resolução de 4 cm⁻¹, na região entre 4000 e 400 cm⁻¹.

2.11 ENSAIO DE ATIVIDADE ANTICOAGULANTE *IN VITRO*

A atividade anticoagulante das frações nativas e modificadas quimicamente foi avaliada pelos testes de tempo de tromboplastina parcial ativada (APTT) e tempo de protrombina (PT). Os testes de atividade anticoagulante foram realizados no coagulômetro KL-340 (Meizhou Comley Hi-Tech, China) utilizando plasma ovino (Bio Nutrientes - lote 021120-POC, Brasil) NaCl 0,9% e heparina ($1,0 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$). (Calbiochem® USA, 100 KU , $2,5 \times 10^3 \text{ g mol}^{-1}$) foram usados como controle positivo e negativo da coagulação, respectivamente. Os kits de tempo de tromboplastina parcial ativada (APTT) e tempo de protrombina (PT) foram adquiridos da marca HemosIL® Instrumentation Laboratory Company, Bedford, MA, USA.

Para realizar as análises de tempo de tromboplastina parcial ativada (aPTT), foram incubados $100 \mu\text{L}$ de plasma ovino com $100 \mu\text{L}$ de solução salina (controle tempo de coagulação normal) ou amostra ($10 - 200 \mu\text{g}$ de polissacarídeo/ mL) ou heparina ($10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), a 37°C por 1 minuto, seguido de $100 \mu\text{L}$ de cefalina de coelho e re-incubação por 2,5 minutos. Decorrido este tempo, foram adicionados $100 \mu\text{L}$ de cloreto de cálcio $0,025 \text{ M}$, para iniciar a coagulação. O tempo de coagulação foi determinado em quadruplicata para cada concentração. O coagulômetro foi programado para efetuar leituras até 300 s.

Para o teste de PT (Tempo de protrombina), foram incubados $100 \mu\text{L}$ de plasma com $100 \mu\text{L}$ de solução salina ou amostra ($10 - 200 \mu\text{g}$ de polissacarídeo/ mL), ou heparina a 37°C por 1 minuto. Em seguida, $100 \mu\text{L}$ pré-aquecidos de reagente comercial para ensaio de PT adicionados para iniciar a coagulação. O tempo de coagulação foi determinado em quadruplicata. O coagulômetro foi programado para efetuar leituras até 100 s.

2.12 ANÁLISES DE DICROISMO CIRCULAR

Os espectros de dicroísmo circular foram obtidos em espectropolarímetro Jasco (J-815) em comprimentos de onda que variaram entre 197 e 250 nm. As amostras analisadas foram diluídas em água ultrapura e analisadas a 37°C . Cada espectro obtido refere-se à média de 5 mensurações repetidas sobre cada amostra, e os dados obtidos foram reportados como elipicidade molar ($\text{deg} \times \text{cm}^2 \times \text{dmol}$).

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 POLISSACARÍDEOS BIOSINTETIZADOS POR MACROALGAS VERDES DA ORDEM ULVALES

A ordem Ulvales é composta por várias espécies de algas verdes, algumas das principais espécies de algas verdes da ordem Ulvales são: *Ulva lactuca*, *Ulva fasciata* e *Ulva rígida*, essas espécies são comumente conhecidas como alface-do-mar, sendo encontradas em áreas costeiras e estuários e ainda costões rochosos e praias.

O gênero *Ulva* compreende cerca de 305 espécies reconhecidas ao redor do globo, nas quais as macroalgas apresentam morfologias filamentosas ou em lâminas. Já para o gênero *Gayralia* são reconhecidas apenas 3 espécies: *Gayralia oxysperma*, *Gayralia brasiliensis* e *Gayralia. Kuroshiensis* (ANDISKA; YANG; KIM, 2023). Várias espécies de gênero *Ulva* são consideradas comestíveis. A partir dessas algas são extraídas os polissacarídeos conhecidos como ulvanas e heteroramnanas (MOREIRA et al., 2022).

3.1.1 Estrutura química de ulvanas

As macroalgas verdes da ordem Ulvales (Chlorophyta), como as dos gêneros *Ulva* e *Enteromorpha* são amplamente distribuídas em todo o mundo Embora consumidas durante séculos as macroalgas verdes ainda são relativamente inexploradas comercialmente (MOREIRA et al., 2022). Macroalgas verdes da ordem Ulvales (Chlorophyta), ou seja, dos gêneros *Ulva* e *Enteromorpha* que apresentam uma ampla distribuição geográfica a nível mundial. Somente no início da década de 50 estudos pioneiros de Branding, Plant e Hardy (1954) começaram a lançar luz sobre a estrutura química dos polissacarídeos produzidos por estas espécies de macroalgas.

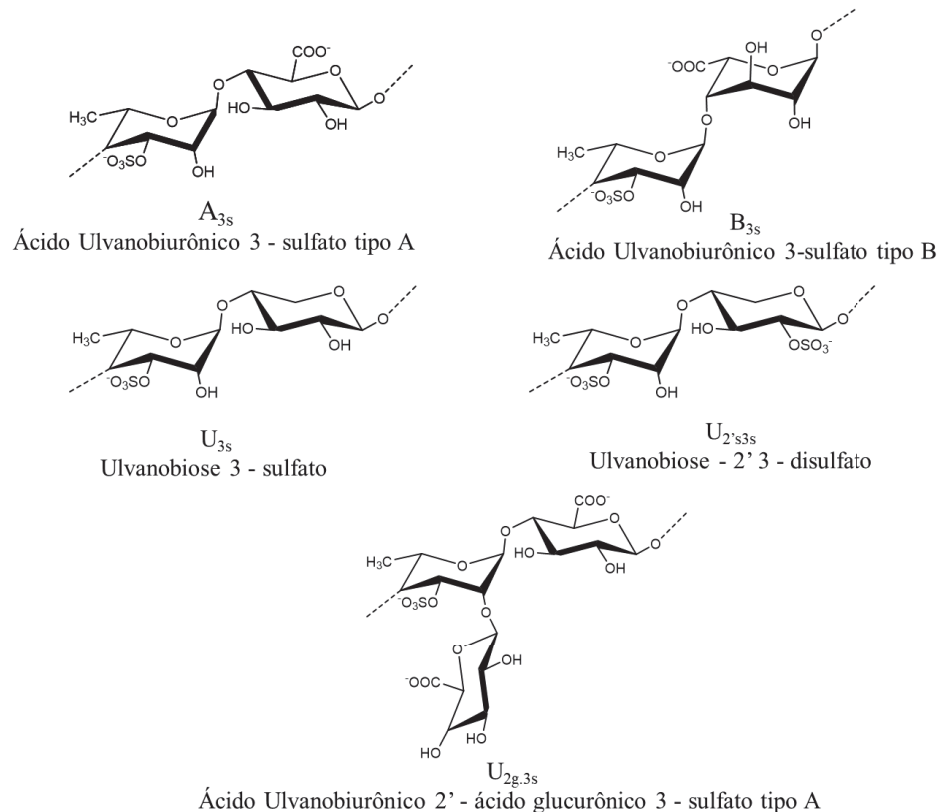
No estudo inicial utilizou-se a macroalga verde *Ulva lactuca*, onde foi possível determinar que os polissacarídeos biosintetizados por essa macroalga eram constituídos por unidades de D-xilose, L-ramnose, D-glucose e ácido D-glucurônico. A presença de grupos O-sulfato em sua estrutura foi somente sugerida, os quais estariam ligados a unidades de glucose ou ramnose (BRADING; GEORG-PLANT; HARDY, 1954).

Estudos posteriores com diversos extratos obtidos de macroalgas verdes dos gêneros *Ulva* e *Enteromorpha*, ao se utilizarem diversas metodologias de extração de polissacarídeos, foi possível um consenso de que essas macroalgas biosintetizavam um heteropolissacarídeo

solúvel em meio aquoso, constituído por diferentes monossacarídeos como xilose, glucose, ácido urônico e rarnose sulfatada (BRADING; GEORG-PLANT; HARDY, 1954; LAHAYE, 1998; LAHAYE; AXELOS, 1993; LAHAYE; BRUNEL; BONNIN, 1997; LAHAYE; RAY, 1996; ROBIC et al., 2009a) Esses polímeros foram denominados como “ulvanas” por Lahaye e Axelos (1993). Foi detectada Posteriormente em algumas espécies do gênero *Ulva* a presença de unidades de ácido idurônico em sua constituição (QUEMENER; LAHAYE, 1997).

Ulvanas representam cerca de 8 - 29% do peso seco das algas, sua extração é geralmente realizada com água quente (80 - 90°C) na presença ou não de oxalato de amônio, um agente quelante de cálcio, facilitando a extração (ROBIC et al., 2009a). Entre os diversos meios de purificação são realizadas a precipitação com etanol ou ainda com sais de amônio quaternário. A massa molecular pode variar de 150×10^3 a $200 \times 10^4 \text{ g.mol}^{-1}$ (PARADOSSI; CAVALIERI; CHIESSI, 2002).

FIGURA 7 - DÍADES PRESENTES EM ULVANAS



FONTE: O autor, 2023.

Com os avanços na caracterização química de ulvanas, foi possível determinar que baixas porcentagens de grupos sulfato localizadas na posição C-2 das unidades de xilose, enquanto a maioria deles está localizada na posição C-3 de unidades de rarnose (figura 7).

Com relação a sua estrutura química fina, ulvanas são constituídas majoritariamente pela díade do ácido ulvanobiurônico 3-sulfato tipo A (A3S): $[\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-D-GlcAp-(1}\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap 3-sulfato-(1}\rightarrow]$ (CARVALHO et al., 2018; COLODI et al., 2021; COSTE; CALLEJO; FERNÁNDEZ-DÍAZ, 2015; FREITAS et al., 2015; ROBIC et al., 2009b).

O ácido idurônico, encontrado em algumas espécies, constitui a díade denominada de ácido ulvanobiurônico tipo B (B3S): $[\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-L-IdoAp-(1}\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap 3-sulfato-(1}\rightarrow]$. Unidades de $\beta\text{-D-Xilose}$ constituem a díade de ulvanobiose 3-sulfato (U3s): $[\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-D-Xylp-(1}\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap 3-sulfato-(1}\rightarrow]$ (CARVALHO et al., 2018; COLODI et al., 2021; COSTE; CALLEJO; FERNÁNDEZ-DÍAZ, 2015; LAHAYE, 1998, 1998; ROBIC et al., 2009b). Quando a xilose encontra-se sulfatada em C-2 essa díade é denominada ulvanobiose 2',3-dissulfato (U2's,3s): $[\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-D-Xylp 2-sulfato-(1}\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap 3-sulfato-(1}\rightarrow]$.

Adicionalmente unidades de ramnose podem estar ramificadas em C-2 por unidades de ácido glucurônico originando o ácido ulvanobiurônico 2'ácido glucurônico 3-sulfato tipo A (A2g,3s): $[\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-D-GlcAp-(1}\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap 3-sulfato-(2}\rightarrow 1)\text{-}\beta\text{-D-GlcAp}]$ (CARVALHO et al., 2018; COLODI et al., 2021; COSTE; CALLEJO; FERNÁNDEZ-DÍAZ, 2015; FREITAS et al., 2015; LAHAYE, 1998, 1998; ROBIC et al., 2009b).

3.1.2 Atividades biológicas de ulvanas

As atividades biológicas de polissacarídeos, incluindo ulvanas, estão diretamente relacionadas à sua estrutura química. Essas atividades estão relacionadas com características estruturais específicas encontradas em ulvanas, tais como seu caráter iônico (presença de grupos sulfato e carboxila), além de apresentar domínio hidrofóbico devido à presença do desoxiaçúcar ($\alpha\text{-L-ramnose}$). Ulvanas se apresentam como um biopolímero com potencial aplicação na obtenção de diversos produtos de interesse biomédico e biotecnológico, além de apresentarem atividades biológicas como a atividade imunomoduladora, antioxidante, anticâncer, antiviral e na defesa de plantas, mostrando-se assim um biomaterial com alto potencial para produção de compostos bioativos (ALVES; SOUSA; REIS, 2013; BARAKAT et al., 2022a; CARVALHO et al., 2018; FREITAS et al., 2015; GARCÍA-MÁRQUEZ et al., 2023).

Fatores estruturais, bem como a presença e o teor de grupos sulfato, são fatores que têm sido correlacionados por diversos grupos de pesquisa com as diferentes atividades biológicas apresentadas por ulvanas. Com o objetivo de investigar o efeito do teor de sulfato na atividade anticoagulante Adrien e colaboradores (2019), isolaram ulvanas de *Ulva rígida*. A fração obtida foi sulfatada quimicamente, levando a um aumento no teor de sulfato de 11 %

(ulvan 1) para 20% (ulvan 2) após a sulfatação. A potencial atividade anticoagulante de ambas as frações foi então avaliada usando diferentes ensaios *in vitro*, visando avaliar sua ação na via intrínseca e/ou comum (tempo de tromboplastina parcial ativado), na via extrínseca (tempo de protrombina) e na via comum (tempo de trombina) e a via dependente de antitrombina específica (anti-Xa e anti-IIa) da cascata de coagulação. Suas propriedades anticoagulantes foram comparadas com de anticoagulantes comerciais: heparina e Lovenox®. A atividade anticoagulante da ulvana quimicamente sulfatada (ulvan 2) foi mais potente que Lovenox®, quanto seu potencial de ação nas vias intrínseca quanto a vias de coagulação extrínsecas. A fração de ulvana sulfatada quimicamente pode ser uma alternativa interessante às heparinas, com diferentes alvos e alta atividade anticoagulante (ADRIEN et al., 2019).

Devido à pandemia global de COVID-19, houve uma busca por compostos com atividade antiviral contra SARS-COV-2. Dentre a compostos bioativos utilizados nessas buscas, ulvanas obtidas de *Ulva sp.*, foi comparada a composição química e a atividade *in vitro* anti-SARS-COV-2 de dois extratos ulvanas brutos diferentes: um obtido por extração ácida e extração à base de oxalato de amônio. A composição dos extratos brutos foi analisada, e sua atividade antiviral foi avaliada em ensaio de redução de efeito citopático utilizando células Vero E6. Os protocolos de extração apresentaram um impacto significativo na composição química, na atividade anti-SARS-COV-2 e citotoxicidade desses extratos de ulvanas. O extrato de ulvanas baseado no protocolo de extração com oxalato de amônio apresentou maior massa molecular médio, e atividade antiviral 11,3 vezes maior do que o extrato obtido em meio ácido (SHEFER et al., 2021)

Ulvanas de *Ulva pertusa* obtidas por diferentes métodos de extração com água a 90°, ultrassônica, enzimática e ultrassônica-enzimática tiveram suas atividades antioxidantes avaliadas. Os rendimentos obtidos pelos quatro métodos de extração acima variaram de 17,88% a 26,77%. O uso de enzimas aumentou o rendimento da extração, sendo que o tratamento ultrassônico-enzimático, foi o que obteve o rendimento máximo (26,7%). Além disso, ulvanas extraídas por tratamento enzimático e ultrassônico apresentaram uma maior capacidade antioxidante em sequestrar o radical DPPH em relação as demais frações obtidas, apresentando um IC₅₀ de 6,52 mg.mL⁻¹ (CHEN; HUANG; HUANG, 2021).

Ainda em relação atividade biológica Ulvanas de *Ulva ohnoi* foram avaliadas quanto a ação imunomodulatória, sendo submetidas previamente a hidrólise com peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 50°C por diferentes períodos. Através dessa hidrólise foram obtidas frações com massas moleculares de 7, 9, 13, 21 e 209 x 10³g.mol⁻¹. As frações de ulvanas continham, 48,8 - 54,7 mol% de rarnnose, 32,5 - 35,9 mol% de ácido glucurônico, 4,5 - 7,3 mol% de ácido

idurônico e 3,3 - 5,6 mol% de xilose. Através de análises de RNM de ^1H e ^{13}C foi possível observar que a hidrólise com peróxido de hidrogênio ocorreu nas ligações glicosídicas, entretanto seria possível através dessa hidrólise a quebra de ligações em outros pontos da estrutura, o que não ocorreu, mantendo a estrutura oligossacarídica intacta. O efeito imunomodulatório *in vitro* das frações de ulvanas foi quantificado pela medição de níveis de moléculas de sinalização inflamatórias liberadas de macrófagos RAW 264.7 estimulados pelo LPS. Todas as frações de ulvanas não apresentaram toxicidade em células RAW 264.7 em concentrações abaixo de $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$. A secreção da interleucina 10 (IL-10) e a prostaglandina (E2) em dosagens de $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ demonstraram um efeito anti-inflamatório para ulvanas de alta massa molecular, em menor taxa essas frações também aumentaram a inflamação induzida pelo LPS através de pequenos aumentos de IL-1 β e IL-6 (KIDGELL, 2021).

Além de efeitos em células animais, ulvanas são polissacarídeos conhecidos por induzir resistência e proteger as plantas contra uma ampla gama de patógenos vegetais. Ulvanas de *Ulva fasciata* foram utilizadas no controle da antracnose do feijão causada por *Colletotrichum lindemuthianum*, bem como a influência no crescimento das plantas. Para determinar a ação de ulvanas sobre antracnose em condições de estufa, as plantas de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). A pulverização foliar dos extratos aumentou o peso seco das plantas de feijão em 20%. Além disso em condições de estufa, a pulverização de ulvanas a 10mg.ml^{-1} reduziu a gravidade da antracnose em 38% sem afetar o crescimento das plantas. Ulvanas são capazes de induzir resistência à antracnose do feijão (PAULERT et al., 2009).

Ainda com relação a doenças ocasionadas em plantas de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), ulvanas foram utilizadas no controle do murchamento do feijão causado por *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* (Fop). A infecção por Fop resulta em uma redução significativa no rendimento das culturas de feijão. Para avaliar esse efeito foi realizada imersão das sementes por 4 horas antes do plantio, além da irrigação do solo ou a pulverização foliar após 12 dias de plantio. Com o tratamento houve uma redução da gravidade da doença quando pulverizado nas folhas, entretanto não apresentou efeito significativo quando aplicado via imersão das sementes ou irrigação do solo. Ainda foi avaliado o efeito da frequência de pulverização de ulvanas no progresso do murchamento ocasionado por *Fusarium* e na colonização fúngica. A partir de duas aplicações ulvanas protegeram de forma semelhante as plantas de feijão, reduzindo a colonização em estágios precoces, mas não em estágios posteriores. Como resultados ulvanas reduziram significativamente a área sob a curva de progresso da doença em 27%, ou seja, ulvanas reduzem os sintomas de murchamento ocasionados por Fop, ainda reduzindo a colonização fúngica (DE BORBA; DE FREITAS; STADNIK, 2019).

Ulvanas são conhecidas por induzir resistência e proteger plantas contra uma ampla gama de fungos fitopatogênicos, como *Blumeria graminis f. sp. tritici* (Bgt), o agente causador do oídio em trigo. Entretanto os mecanismos de defesa induzidos pela ulvanas contra o Bgt em trigo relacionados à defesa, atividade enzimática, acúmulo de compostos fenólicos e peróxido de hidrogênio (H₂O₂), bem como o desenvolvimento das estruturas de infecção do Bgt *in vitro* e *in planta*. Os sintomas foram reduzidos em 42% em plantas tratadas com ulvanas. Houve ainda um aumento da presença de proteínas relacionadas a defesa e o acúmulo de H₂O₂ nos locais para entrada de Bgt, assim como o teor de compostos fenólicos. Ulvanas promovem múltiplos efeitos nas respostas de defesa do trigo, especialmente a ligados ao acúmulo de compostos fenólicos envolvidos no reforço da parede celular (VELHO et al., 2022).

3.2 MODIFICAÇÃO QUÍMICA DE POLISSACARÍDEOS

A modificação química de polissacarídeos é uma área de pesquisa em constante desenvolvimento que busca métodos adequados para alterar funcionalidades desses biomateriais, que desempenham papéis essenciais em diversos processos biológicos e amplamente utilizados em processos industriais, como a indústria alimentícia, cosmética, farmacêuticas, de biomateriais e biotecnologia (AHMAD, 2021; BARAKAT et al., 2022b).

O principal objetivo das modificações químicas baseia-se na alteração de estrutura molecular conhecida através da introdução de grupos funcionais, tais como sulfatos, carboxila, fosfato, entre outros, presentes ou não na molécula de origem, podendo assim inserir ou até mesmo aumentar sua biodisponibilidade. Essas alterações ocorrem por meio de reações de sínteses e semi-sínteses e rotas e condições específicas com uso de reagentes específicos.

Além das alterações biológicas as modificações químicas podem melhorar as propriedades físico-químicas e macromoleculares como a solubilidade, estabilidade térmica, propriedade reológicas e propriedades hidrodinâmicas. Essas alterações podem facilitar a incorporação desses polissacarídeos em formulações específicas, permitindo assim o desenvolvimento de materiais com propriedades direcionadas as aplicações específicas, como por exemplo indústria alimentícia, por exemplo, eles podem ser utilizados como espessantes, estabilizantes e emulsificantes, contribuindo para a melhoria das propriedades dos alimentos processados ou ainda na área farmacêutica, podem ser utilizados como carreadores de medicamentos, facilitando a liberação controlada e direcionada de substâncias ativas (CHEN; HUANG; HUANG, 2021; COSTE; CALLEJO; FERNÁNDEZ-DÍAZ, 2015; XIE et al., 2020).

Entretanto apesar de avanços significativos nesta área de pesquisa, ainda existem desafios a serem superados, como por exemplo a seleção adequada de agentes de síntese, condições de reação ideais e a manutenção das propriedades biológicas e a segurança desses polímeros são pontos que devem ser considerados, ou seja, um estudo sobre a compreensão dos efeitos das modificações químicas é imprescindível. A modificação química de polissacarídeos representa uma promissora abordagem para explorar o potencial desses biomateriais naturais, ampliando suas aplicações e contribuindo para o avanço da ciência e tecnologia de materiais.

3.2.1 Fosforilação química de polissacarídeos

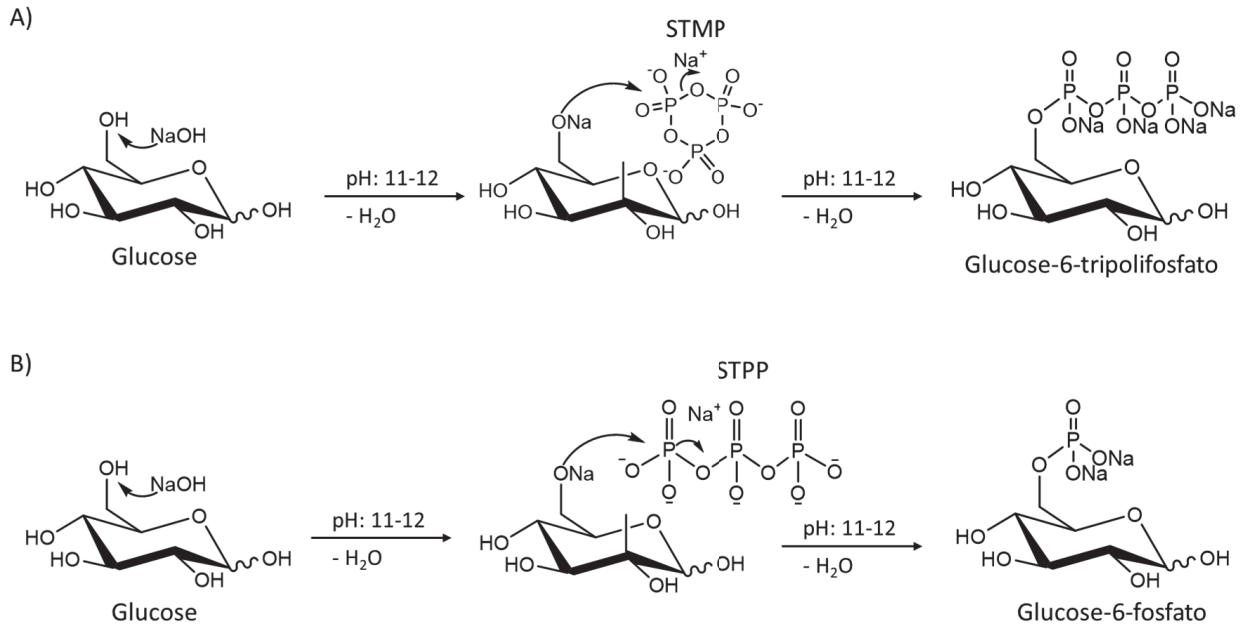
A fosforilação química de carboidratos é um processo de funcionalização em que grupos fosfato são adicionados a uma molécula de carboidrato em condições químicas controladas, sem a participação de enzimas. Esse processo é utilizado em sínteses e semi-sínteses químicas com o objetivo de modificar as propriedades moleculares de carboidratos, tornando-os mais reativos ou modificando suas propriedades físicas e químicas. Polissacarídeos fosforilados quimicamente apresentam atividades biológicas como antitumoral (CHEN et al., 2009), antiviral (MING et al., 2017; ZHANG et al., 2017), antioxidante (CAO et al., 2020) e anticoagulante (DACE et al., 1997; LIU et al., 2018).

Entretanto suas vias de modificação química são particularmente desafiadoras, já que em alguns casos, após a fosforilação química, eles podem se tornar insolúveis em água ou solventes orgânicos. Portanto, a escolha de um solvente apropriado para a reação é uma questão fundamental. Para superar esse problema, diversos solventes são utilizados em condições homogêneas e heterogêneas para tornar os polissacarídeos acessíveis à modificação. Dessa forma, considerando as mais diversas estratégias utilizadas para a fosforilação química de polissacarídeos, a utilização da água como solvente da reação e o uso de solventes orgânicos.

A introdução de grupos fosfato em polissacarídeos por esterificação tem sido amplamente realizada há mais de 60 anos utilizando ácido fosfórico (H_3PO_4) ou seus sais (NaH_2PO_4 , KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , K_2HPO_4 , Na_3PO_4 , $NaPO_3$) (WHISTLER; TOWLE, 1969).

Dentre os sais derivados do ácido fosfórico ressalta-se a fosforilação química de polissacarídeos em meio aquoso utilizando STPP (tripolifosfato de sódio) e STMP (trimetafosfato de sódio). Nesta técnica utilizada para modificar a estrutura desses polímeros, o STPP é um agente fosforilante altamente solúvel em água, enquanto o STMP é um derivado do STPP com um tamanho molecular menor. Isso permite sua adição com maior facilidade, evitando possível impedimento estérico presente no polissacarídeo.

FIGURA 8 - MECANISMO DE FOSFORILAÇÃO STPP-STMP



Fonte: O autor, 2023

A fosforilação utilizando STPP-STMP em meio aquoso é realizada em pH alcalino. Nesse contexto, o mecanismo proposto para essa reação ocorre em duas etapas para a STMP (fig. 10A) e em três etapas para STPP (fig. 10B), sendo que as duas primeiras etapas são iguais para ambos os compostos. Na primeira etapa, o polissacarídeo é ativado pela presença de NaOH, e na etapa posterior, ocorre um ataque nucleofílico ao ânion complexo do trimetafosfato de sódio (STMP) ou do tripolifosfato de sódio (STPP) pelos grupos hidroxila dos polissacarídeos ativados pelo NaOH (fig. 10), formando um intermediário. Na etapa posterior, ocorre a abertura do anel de STMP e a ligação covalente ocorre com a cadeia aberta. Na última etapa do mecanismo, após adição do alcóxido ao STMP e eliminação de pirofosfato, ocorre a substituição do grupo hidroxila pelo grupo fosfato de tripolifosfato (STPP) de sódio, ocorre a eliminação de grupos fosfato.

Para realizar a fosforilação química, os polissacarídeos são misturados com soluções aquosas contendo STPP e STMP em concentrações variadas (CHEN; HUANG; HUANG, 2021; FENG et al., 2017; SUFLET; CHITANU; DESBRIRES, 2010; XIE et al., 2020). A reação é realizada sob condições controladas de temperatura e pH (geralmente alcalino), para garantir uma eficiente fosforilação química sem degradação dos polímeros. A fosforilação química em meio aquoso utilizando STPP-STMP pode levar a uma variedade de modificações

estruturais nos polissacarídeos, incluindo mudanças na carga superficial, solubilidade em água e propriedades de gelificação. Essas modificações podem ser úteis em diversas aplicações, como na produção de biopolímero para uso em embalagens, adesivos, revestimentos e formulações farmacêuticas.

Entretanto para que seja possível realizar essa modificação, o polissacarídeo deve ter sua estrutura química fina determinada previamente, para que após a término da síntese seja possível determinar o grau de substituição (DS), o qual é definido como o número médio de grupos funcionais substituídos por unidade de monossacarídeo. Com relação ao DS a utilização de STPP-STMP em meio aquoso proporciona polissacarídeos com baixos graus de substituição.

O polissacarídeo obtido de *Cyclocarya paliurus* (CP), planta que cresce amplamente no sul da China a qual tem suas folhas utilizadas como chá na medicina tradicional chinesa, é constituído por Ara, Rha, Gal, Glc, Xyl, Man, GalA e GlcA. Este polissacarídeo foi submetido a fosforilação química utilizando STPP-STMP originando a fração P-CP com DS de 0,14. O polissacarídeo não modificado (CP) e seu derivado fosforilado (P-CP) foram investigados quanto as suas atividades antioxidantes e os efeitos citoprotetores *in vitro*. O polissacarídeo fosforilado (P-CP) mostrou excelente capacidade de eliminação de radicais hidroxila de $73,28 \pm 0,41\%$ na concentração de 0,25 mg/mL (dose-dependente) por análises de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila). O polissacarídeo modificado (P-CP) proporcionou um efeito protetor significativo contra o estresse oxidativo induzido por peróxido de hidrogênio em células RAW264, reduzindo o estresse oxidativo, aumentando o conteúdo da enzima antioxidante superóxido dismutase (SOD) e diminuindo o conteúdo de malonaldeído (MDA) em células danificadas por oxidação, além de eliminar ROS diretamente e regulando o ciclo celular, reduzindo a capacidade de apoptose e melhorando viabilidade celular, consequentemente atingindo a atividade antioxidante intracelular (XIE et al., 2020).

A dextrana obtida de *Astragalus membranaceus*, membro da família Leguminosae amplamente distribuído nas regiões de climas temperados e utilizada na medicina tradicional chinesa, teve sua atividade antiviral avaliada contra o vírus da hepatite A do pato (DHAV). Polissacarídeo constituído por unidades de glucose 4-ligadas, parcialmente ramificadas em C-6 por unidades simples de glucose a cada 10 unidades, foi fosforilado através do método de STPP-STMP para obtenção de seu derivado fosforilado (MING et al., 2017). Neste estudo as atividades antivirais dos derivados fosforilados e sulfatados foram avaliadas comparativamente. As atividades antivirais foram avaliadas *in vitro* e posteriormente teste *in vivo* pelo método de inoculação artificial em patos da espécie *Anas platyrhynchos* (pato-real) com a finalidade de avaliar a taxa de sobrevivência após a inoculação com o vírus.

Os resultados mostraram que a concentração máxima segura foi de $7,8 \text{ mg.mL}^{-1}$ para o derivado sulfatado e de $31,2 \text{ mg.mL}^{-1}$ para o derivado fosforilado, o que indicou que o derivado fosforilado apresenta menor toxicidade que o derivado sulfatado. A terapia clínica os efeitos foram avaliados pela taxa de mortalidade, indicadores bioquímicos relacionados à função hepática. Os resultados revelaram que o derivado fosforilado inibiu a proliferação em 85,1% com uma dose de $7,8 \text{ mg.mL}^{-1}$ mais eficientemente em todo o processo de multiplicação viral do que derivado sulfatado. Para os resultados de método de inoculação artificial *in vivo* apenas o derivado fosforilado melhorou taxa de sobrevivência para 33,5%, bem como lesões no fígado em ensaios clínicos, enquanto para o derivado sulfatado a taxa de sobrevivência foi de 6,7%. Os resultados demonstraram que o derivado fosforilado exibiu maior atividade antiviral tanto *in vitro* quanto *in vivo* (MING et al., 2017).

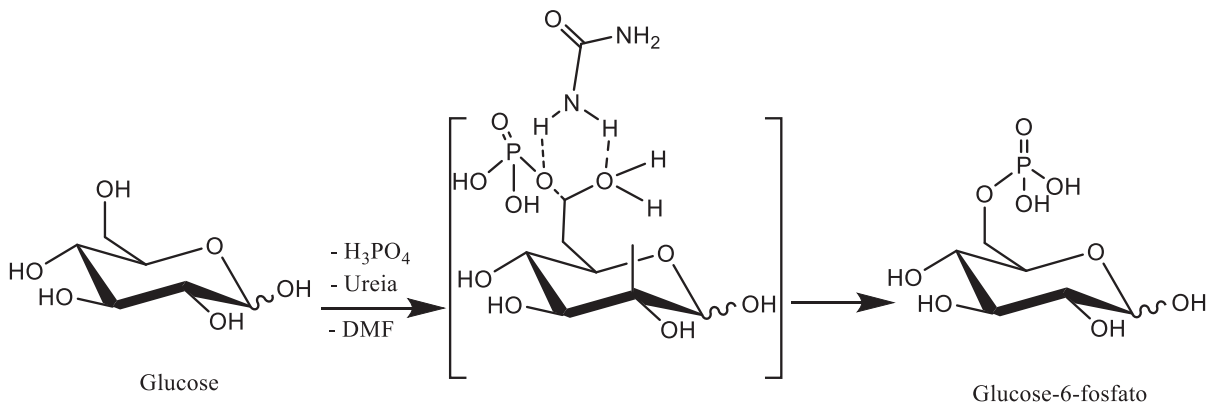
A fosforilação química de ulvanas da macroalga verde *Ulva pertusa* foi realizada utilizando os agentes fosforilantes STMP-STPP com o objetivo de investigar os efeitos das atividades antioxidante e anti-hiperlipidêmica *in vivo*. Após a fosforilação, houve um decréscimo (60,4 para 42,8%) no teor carboidratos totais e redução na massa molar ($143,2$ para $83,1 \times 10^3 \text{ g.mol}$) com uma recuperação de 75,8 % da massa inicial da reação e 10,5 % de fosfato, e ainda uma redução de grupos sulfato de 19,7 para 10,7%. Foram realizadas análises de infravermelho e de RMN ^{31}P . O espectro de infravermelho da fração fosforilada apresentou novos picos em relação ao polímero original em 1132 cm^{-1} e 998 cm^{-1} . O pico em 1132 cm^{-1} foi causado pelo estiramento da ligação P=O e o pico de 998 cm^{-1} foi relacionada ao estiramento da ligação P-O-C, indicando o sucesso da reação. As análises de RMN de ^{31}P , apresentaram deslocamentos químicos atribuídos a três espécies de fosfato, monofosfato (-0,18 ppm), difosfato (-10,40 ppm) e trifosfato (-21,41 ppm). Destaca-se que os autores não realizaram outras análises para determinar as posições de substituição (JIANG et al., 2020).

São ainda poucos os relatos na literatura sobre a fosforilação química de ulvanas e ainda há vários questionamentos relacionados a posição de entrada dos grupos fosfato, os quais precisam ser esclarecidas e qual sua relação com a atividade biológica. Outros aspectos que precisam ser esclarecidos são a redução da massa decorrente da reação de fosforilação e ainda a possível interação de grupos fosfato e sulfato presentes em ulvanas após a fosforilação. Ou seja, busca por respostas se demonstra pertinente devido ao fato da inserção de grupos fosfato pode potencializara a atividade biológica em polissacarídeos.

A utilização de solventes orgânicos é outra abordagem utilizada para a fosforilação de polissacarídeos, permitindo a introdução de grupos fosfato. Os solventes orgânicos são usados para dissolver tanto o polissacarídeo quanto o agente fosforilante e a reação de fosforilação

ocorre em solução. A fosforilação química de polissacarídeos em solvente orgânico é uma técnica que envolve a adição de grupos fosfato em meio não aquoso. Isso pode ser realizado usando vários agentes fosforilantes em solventes orgânicos, como o cloreto de fosforila (POCl_3), fosfato de trifenila (TPP), ácido fosfórico (H_3PO_4) e anidrido fosfórico (P_2O_5), muitos dos quais acabam reagindo violentamente com a água, inviabilizando assim sua utilização.

FIGURA 9 - MECANISMO DE FOSFORILAÇÃO H_3PO_4 - UREIA



Fonte: O autor, 2023

A reação de fosforilação utilizando ácido fosfórico (H_3PO_4) e ureia ($(\text{NH}_2)_2\text{CO}$) segue o princípio de fosforilação de polissacarídeos proposto por Inagaki et al., 1976. O tratamento térmico e a presença de ureia são essenciais para introduzir grupos fosfato no polissacarídeo. No entanto, o papel fundamental nesta reação de fosforilação é desempenhado pela ureia, a qual apresenta múltiplas funções em tais reações: catalisador e tampão (fig. 11). Manter a temperatura sobre o ponto de fusão da ureia, promove sua decomposição com a liberação de amônia ativa que se propõe a reagir com fosfato e gerar um fosfato de amônio intermediário, este intermediário se acumula no polissacarídeo e acredita-se que funcione como o principal reagente fosforilante. Muitos estudos sem sucesso mostraram que a fosforilação não pode ser conduzida sem a ureia como catalisador e seu efeito tampão (CAO et al., 2020).

A obtenção de celulose fosforilada (CP) através de uma reação de fosforilação utilizando ácido fosfórico e ureia como reagentes. A fosforilação de celulose com ácido fosfórico e ureia produziu um material com maior estabilidade térmica, bem como propriedades mecânicas e de adsorção de íons melhoradas em comparação com a celulose não modificada. Além disso, a fração CP apresentou uma capacidade significativa de adsorção de íons de metais pesados, como chumbo, cobre e zinco, em soluções aquosas (SUFLET; CHITANU; DESBRIRES, 2010)

A obtenção de polissacarídeos quimicamente fosforilados com a finalidade de avaliar a atividade anticoagulante é pouco relatada na literatura. Entretanto Dace et al, 1997, realizaram a comparação entre o mecanismo de ação de polissacarídeos sulfatados e fosforilados quimicamente. Os polissacarídeos comerciais: xilanas, fucoidanas e κ -carragenanas foram fosforilados quimicamente segundo a metodologia de Nishi et al, 1984 com sucesso pela reação com pentóxido de fósforo em ácido metanossulfônico. O aumento do teor de fosfato foi acompanhado pela diminuição da massa molar. A menor atividade dos derivados fosforilados quando comparada os derivados sulfatados foi relacionada a diminuição da massa molar. No entanto os polissacarídeos fosforilados quimicamente apresentaram a atividade anticoagulante aumentadas com relação aos polissacarídeos de origem. Para fração de origem de κ -carragenanas eram necessários 500 μg para dobrar o tempo de protrombina (PT), avaliadas *in vitro*, para a fração de κ -carragenana fosforilada quimicamente (15 % de grupos fosfato) foram necessários 20 μg para dobrar o valor de PT. Os autores relacionaram aumento na atividade anticoagulante a presença de ligações fosfodiester, difosfodiester bem com a presença de grupos fosfato (DACE et al., 1997; NISHI et al., 1984).

Um dos grandes desafios na fosforilação química de polissacarídeos e seus derivados é a dificuldade na caracterização dos produtos obtidos após a modificação química. Entre os métodos utilizados para caracterização dos produtos fosforilados está a espectroscopia de infravermelho, entretanto devido às limitações da técnica não é possível determinar a posição a qual houve a ligação no polímero.

Outra estratégia utilizada é a análise de espectroscopia de ressonância nuclear magnética de ^{31}P , entretanto somente a análise de unidimensional de fósforo não é o suficiente para confirmar a posição que se encontram os grupos fosfato no polímero, o que ocorre devido à complexidade dos polissacarídeos fosforilados. Portanto, é necessário realizar análises bidimensionais em conjunto com outros núcleos como ^1H , ainda existem poucos relatos indicando a posição correta dos grupos fosfato após a fosforilação química de polissacarídeos (COLEMAN et al., 2011; WANG et al., 2014; XIE et al., 2020; YE et al., 2013; ZHANG et al., 2017, 2009).

sulfato de condroitina conforme determinado pela absorção de água, houve ainda uma melhora na resistência mecânica observada pela morfologia usando microscopia eletrônica de varredura sugerindo seu possível uso para a engenharia de tecido cartilaginoso.

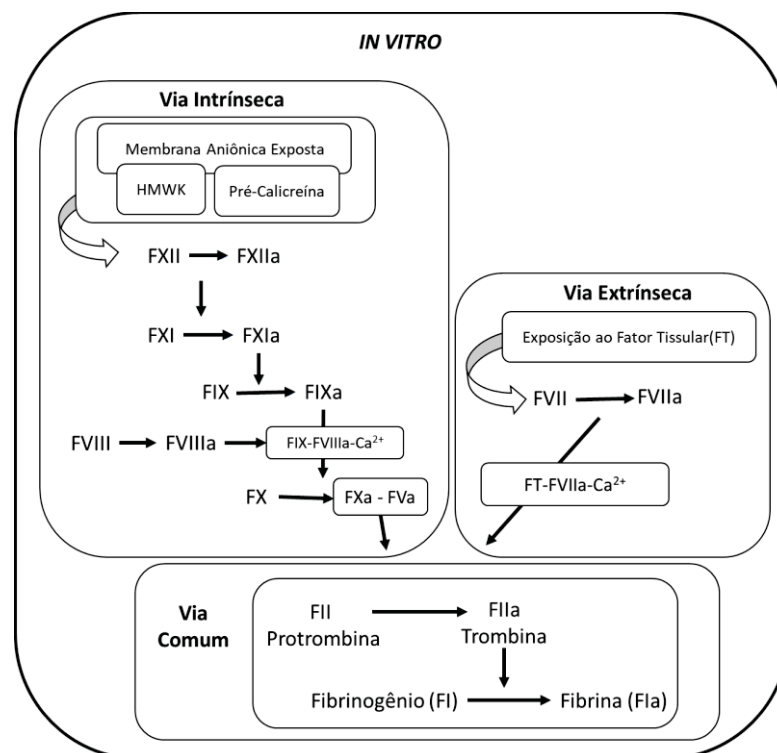
Hidrogéis de sulfato de condroitina (CS) tiveram sua (in)estabilidade hidrolítica avaliada após a adição de ésteres de metacrilato (MA). Hidrogéis feitos com CS derivado de glicidil metacrilato (CS(G)MA) ou anidrido metacrílico (CSMA) degradaram após 2 a 25 dias de maneira dependente da densidade de reticulação (pH 7,4, 37 °C). Os hidrogéis MA de condroitina dessulfatada se degradam, indicando que os grupos sulfato não são responsáveis pela sensibilidade hidrolítica do CS(G)MA (pH 7,0–8,0, 37 °C). Essa sensibilidade está associada a unidades de N-acetil-galactosamina presentes em CS(G)MA não formarem pontes de hidrogênio com os oxigênios de unidades ácido glucurônico adjacentes. Essa ausência de ligação permite ao CS(G)MA maior flexibilidade e hidratação da cadeia aumentando a sensibilidade à hidrólise do éster nas redes CS(G)MA. Este estudo relata sobre os efeitos da quiralidade dos monômeros na degradação do hidrogel que é altamente relevante para cientistas de biomateriais que desenvolvem biocompatíveis e/ou hidrogéis degradáveis. Com base neste estudo, hidrogéis à base de CS(G)MA podem ser utilizados como implantes hidroliticamente degradáveis para de tecidos e aplicações farmacêuticas (SCHUURMANS et al., 2021).

Ulvanas de *Ulva sp.*, devido à sua versatilidade química e bioatividade comprovada, foram utilizadas na criação de hidrogéis termogelificantes. Isso foi realizado através da adição de cadeias de poli(N-isopropilacrilamida) às ulvanas. A adição dessas cadeias conferiu propriedades termossensíveis à estrutura das ulvanas. No entanto, esse fenômeno só foi observado após a introdução de um iniciador radicalar que promoveu a polimerização da N-isopropilacrilamida por meio de irradiação UV. A comprovação desse fenômeno ocorreu por análises térmicas e reológicas, onde ocorreu uma transição sol-gel a 30 - 31 °C, indicando assim que ulvanas podem ser usadas para preparação de hidrogéis termogelificantes para aplicações biomédicas (MORELLI et al., 2016).

3.3 HEMOSTASIA E COAGULAÇÃO

A hemostasia é um processo fisiológico normal de prevenção de sangramentos e hemorragias, através da formação de coágulo sanguíneo. Como resultado de qualquer lesão é desencadeada uma série coordenada de respostas que requerem interações complexas entre plaquetas, cascata de coagulação, fluxo sanguíneo e cisalhamento, células endoteliais e fibrinólise. A hemostasia é o processo fisiológico que mantém a fluidez do sangue e a integridade dos vasos sanguíneos.

FIGURA 11 - MODELO CLÁSSICO DE COAGULAÇÃO *in vitro*

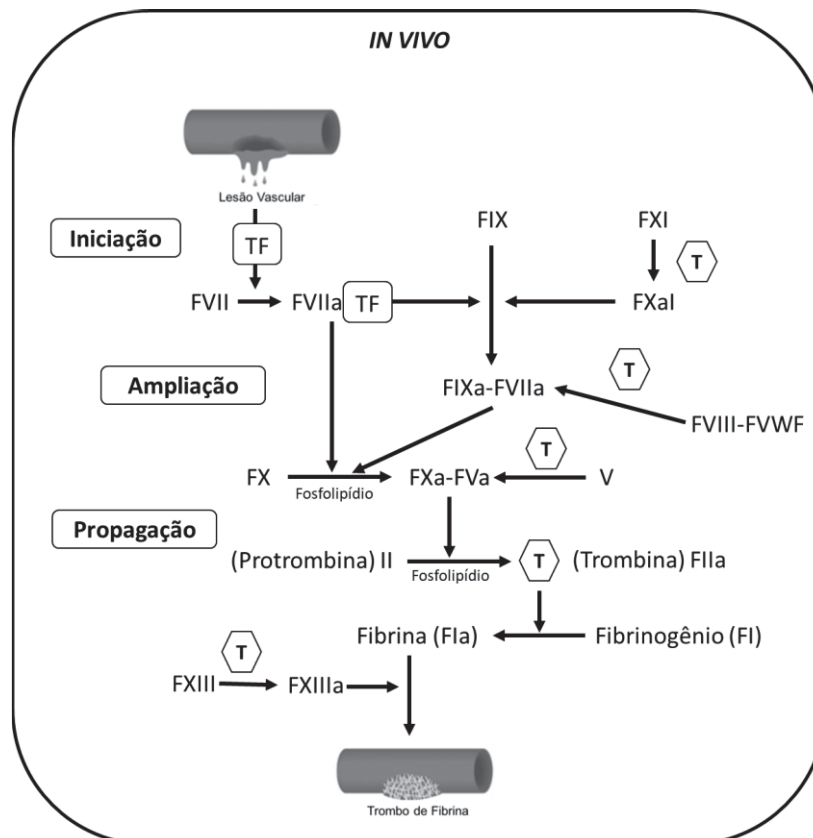


Fonte: O autor, 2023.

A coagulação sanguínea compreende um sistema de amplificação biológica que consiste na conversão de uma proteína solúvel do plasma, o fibrinogênio, formando o coágulo de fibrina quando ativado pela trombina. Esse fenômeno ocorre devido a uma série de reações químicas entre proteínas que convertem pró-enzimas (zimógenos) em enzimas (proteases). Essas pró-enzimas e enzimas são denominadas fatores de coagulação que ao final auxiliam o controle do sangramento, o que conhecemos como cascata de coagulação (SILVA et al., 2016).

O conceito da cascata de coagulação inicialmente foi proposto por Macfarlane (1964) e Davie e Ratnoff (1964), o qual representa o que conhecemos como modelo clássico da cascata de coagulação (fig. 13). Neste modelo a ativação de cada fator da coagulação leva a ativação de outro fator até a eventual formação da trombina. Em sua representação clássica a cascata de coagulação dividiu o curso da coagulação em duas vias: a via intrínseca na qual todos os componentes estão presentes no sangue (iniciada pela ativação de fatores de contato e, a seguir, pela ativação dos fatores XI, IX, VIII) e a via extrínseca (iniciada pela ativação do fator VII pelo fator tecidual). Ambas as vias convergem para a ativação de uma via comum, que compreende o fator X e o cofator V, sequencialmente, a trombina, responsável pela conversão de fibrinogênio em fibrina na última etapa, formando assim os coágulos (BIGGS; DOUGLAS; MACFARLANE, 1953; DAVIE; RATNOFF, 1964; MACFARLANE, 1964).

FIGURA 12 - MODELO DE COAGULAÇÃO *in vivo*



Fonte: O autor, 2023

A ativação da via intrínseca não requer necessariamente uma lesão tecidual externa, pois essa via se inicia a partir dos componentes do espaço intravascular. O início desse processo ocorre quando o fator XII entra em contato com uma superfície negativamente carregada (como por exemplo o colágeno), esse processo é conhecido como ativação por contato, e requer

a presença de outros componentes presentes no plasma como: pré-caliceína e cininogênio de alto peso molecular (High molecular weight kininogen – HMWK). Quando em contato com uma superfície negativamente carregada, o fator XIIIa ativa o fator XII (FXII-FXIIa), convertendo a pré-caliceína em caliceína, por mecanismo de retroalimentação fator XII é novamente convertido em XIIIa. Ainda, o fator XIIIa promove ativação do fator XI, o qual é cálcio dependente, gerando o fator XIa, o qual é responsável pela ativação do fator IX, novamente na presença de cálcio, gerando IXa. O fator IXa forma o complexo composto pelos cofatores, fator VIIIa e cálcio, esse complexo ativa o fator X, a partir desse ponto da via comum da coagulação é ativada, desencadeando a geração de trombina e, subsequentemente, formação de fibrina (BARROWCLIFFE, 2006; FRANCO, 2001b).

A via extrínseca está associada a lesões vasculares, esta via contém menos estágios do que a via intrínseca. Esta tem início a partir de danos nos vasos sanguíneos, ocorrendo a exposição do fator tecidual (FT) da superfície exposta. O fator tecidual é uma mistura complexa de lipoproteínas e fosfolipídios, uma proteína transmembrana, liberada pelas superfícies das células danificadas, que interage tanto com a forma inativa, quanto com a forma ativada do fator VII. O complexo FT/fator VIIa desencadeia a coagulação sanguínea convertendo o fator X para sua forma ativa Xa (FRANCO, 2001b). As duas vias encontram um caminho comum, a partir da forma ativa do fator Xa, onde ocorre a conversão de protrombina em trombina que por sua vez, estimula a conversão de fibrinogênio em fibrina. Por muito tempo o sistema de coagulação foi considerado constituído apenas por interações nas vias da coagulação e sua relação entre as superfícies celulares (plaquetárias, endoteliais e de micropartículas) fatores de coagulação e plaquetas. Entretanto com avanços nos conhecimentos da hemostasia, atualmente, considera-se um sistema com elementos regulatórios múltiplos no qual participam componentes celulares e moleculares (GOGOÍ et al., 2018).

O modelo da cascata da coagulação foi um grande avanço para compreender a formação do coágulo *in vitro* e para monitorização laboratorial, todavia em observações clínicas *in vivo* (fig. 14) foram encontradas diversas lacunas. Um exemplo destas lacunas está relacionado as deficiências de cininogênio de alto peso molecular, pré-caliceína e fator XII as quais prolongam o tempo tromboplastina parcial, embora estes não causam alterações significativas no sangramento. Por muito tempo essa e outras alterações da coagulação eram contempladas pelo modelo da cascata. Pesquisadores de coagulação concluíram que a via intrínseca não tem papel fisiológico verdadeiro na hemostasia. A divisão clássica da cascata da coagulação em via extrínseca e via intrínseca ainda tem aplicação didática. Entretanto, atualmente compreende-se a coagulação em três estágios: fase de iniciação, fase de

amplificação e fase de propagação (BARROWCLIFFE, 2006; DANTAS; SOUSA, 2007; GOGOI et al., 2018).

Na fase de iniciação a exposição de fator tecidual ao sangue, seja por lesão vascular ou por mecanismo de ativação endotelial inicia o processo de coagulação. Embora presente no endotélio, fator tecidual também é encontrado em monócitos, plaquetas e micropartículas (de vários tipos celulares) com potencial trombogênico comprovado. O fator tecidual forma um complexo com o fator VIIa, esse complexo catalítico FT-FVIIa ativa os fatores IX e X. O fator X ativado promove a formação de pequenas quantidades de trombina (FIIa) (SILVA et al., 2016).

Na fase de amplificação ocorre a formação de um complexo intrínseco, formado pelo fator IXa e cofator VIIa, promovendo a intensificação em 50 a 100 vezes na ativação de fator Xa e, como consequência promove a intensificação na produção de trombina (FIIa). A trombina (FIIa) *in vivo* atua em diversos mecanismos, entretanto sua principal via de atuação está na ativação das plaquetas, gerando assim maior agregabilidade, promovendo uma maior exposição da superfície fosfolipídica e aumentando a ativação do cofator VIII por liberá-lo do complexo com o Fator de von Willebrand (FVWF) e promovendo a ativação do fator XI. Esses mecanismos descritos levam a formação de um trombo de fibrina (DANTAS; SOUSA, 2007; FRANCO, 2001a; SILVA et al., 2016).

Como última etapa da coagulação *in vivo*, durante a fase de propagação, a trombina formada promove a geração de fibrina a partir do fibrinogênio, estabilizando o trombo plaquetário. Paralelamente, o fator XIIIa atua promovendo ligações com a fibrina, aumentando assim a resistência do trombo. Por fim, salienta-se, fundamental ação do inibidor da fibrinólise ativado pela trombina (TAFI, thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor) que, após ser ativado pela trombina, atua limitando a ação fibrinolítica da trombina sobre o trombo formado, evitando sua propagação patológica (FRANCO, 2001a; HOFFBRAND; MOSS, 2013; MARÍLIA et al., 2007; SILVA et al., 2016).

3.4 DICROISMO CIRCULAR DE CARBOIDRATOS

O dicróismo circular (CD) é uma técnica espectroscópica bem estabelecida amplamente utilizada para investigar estruturas de proteínas, polissacarídeos e ácidos nucleicos e fornece informações importantes sobre as ligações covalentes presentes na molécula. Isso ocorre devido a luz polarizada plana em superposição de luz polarizada circularmente à esquerda e à direita com a mesma frequência e amplitude. Uma molécula quiral tem coeficientes

de absorção diferentes para as luzes polarizadas circularmente à esquerda e à direita. Seu espectro de dicroísmo circular (CD) pode ser obtido registrando as mudanças nos coeficientes de absorção com a mudança no comprimento de onda da luz polarizada (FASMAN, 1996).

Dentre as vantagens das ferramentas de CD podem-se destacar como principais vantagens de seu uso a baixa exigência de concentração para analisar estruturas secundárias, a partir de $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para proteínas. Destaca-se ainda a possibilidade de uso de uma larga gama de concentrações de $0,001$ a 250 mg.mL^{-1} as quais podem ser usadas para determinar as estruturas secundárias e terciárias de variadas biomoléculas. Ao contrário de outros métodos espectroscópicos, o CD não requer preparação específica da amostra, sendo necessário que a amostra seja solúvel. Uma única medição de CD incluindo regiões distantes e próximas do UV ($240\text{--}180$ e $320\text{--}260$ nm, respectivamente) pode ser realizada em minutos (GOGOI et al., 2018; MARIA; MURAKAMI, 2016).

Espectros de CD de carboidratos são normalmente divididos em 3 regiões de comprimentos de onda, entre $200\text{--}240$ nm ocorrem bandas associadas as transições $n\text{-}\pi^*$ e em $180\text{--}200$ nm a transições $\pi\text{-}\pi^*$ decorrentes de substituintes mais comuns, como grupos acetamido e carboxila. Já bandas entre $140\text{--}180$ nm decorrentes de transições $n\text{-s}^*$ estão associadas ao acetal e grupos hidroxila (HAQUE et al., 2022).

Diversos carboidratos biologicamente importantes contêm substituintes, como grupos carboxila, acetamido, e sulfato, os quais exibem absorção na região do UV. Medições de CD em solução aquosa revelam que a N-acetilglucosamina apresentam uma banda negativa em torno de 210 nm, e uma banda positiva em torno de 180 nm, e um ombro em torno de 190 nm, enquanto N-acetilgalactosamina apresenta duas bandas negativas em torno de 210 e 170 nm e uma banda positiva em torno de 190 nm. O ácido D-glucurônico apresenta uma banda positiva em torno de 210 nm e uma banda negativa em torno de 185 nm, ambos fortemente dependentes do pH. As transições eletrônicas de carboidratos são influenciadas pelas condições do solvente e pelos substituintes, pela conformação (glucosamina ou galactosamina) e ácido urônico (ácido glucurônico ou idurônico). A configuração de grupos carboxila e o número e a posição do grupo sulfato definitivamente influenciam os espectros de CD. No entanto, as contribuições dos substituintes podem ser estimadas comparando os espectros de polissacarídeos e seus monômeros constituintes (ZHAO; WANG; ZHAO, 2023).

O CD de ulvanas extraídas de *Ulva rigida* foi investigado em função do pH e temperatura. Ulvanas contém unidades de ácido glucurônico que apresentam elipticidade na região espectral UV variando de 240 a 200 nm causada pela absorção do grupo carboxílico presente no polissacarídeo. Essas absorções são atribuídas para a transição $n\text{-}\pi^*$, em pH ácido

ulvanas em meio aquoso apresentam uma banda negativa em 238 nm e com uma banda positiva em 215 nm e com um ponto de inversão em 230 nm. O efeito da ionização em pH superior a 4,0 ocasionou um deslocamento da transição $n-\pi^*$ para energias mais altas com um ponto de inversão em cerca de 208 nm, deixando inalterada a estrutura do padrão (negativo banda posicionada em 216 nm, banda positiva em 203 nm) (PARADOSSI et al., 1999).

A inversão das bandas em ambas as cargas e grupos carboxílicos não carregados é indicativo da existência de diferentes isômeros rotacionais em relação à unidade glicosídica. Em estudos posteriores com ulvanas de *Ulva lactuca* e *Ulva rotundata*, apontam que para formas ácidas e salinas de ulvanas há contribuição insignificante dos açúcares neutros presentes na estrutura para o sinal entre 260 e 200 nm, onde a principal absorção devida à transição eletrônica $n-\pi^*$ de grupos carboxílicos. As descobertas apontaram para conformação essencialmente desordenada para ulvanas das espécies estudadas (PARADOSSI; CAVALIERI; CHIESSI, 2002).

Ulvanas de *Ulva fasciata* foram submetidas a análises de CD a 20 °C em água ultrapura, antes e após do tratamento térmico (1 h, 80 °C), com a finalidade de analisar a influência de proteínas na conformação do polissacarídeo. Apresentaram um padrão de CD característico de uma estrutura secundária helicoidal, com bandas positivas e negativas posicionadas em 201 e 225 nm, respectivamente (ponto de inversão em 215 nm). O espectro de CD tratado termicamente apresentou o mesmo perfil helicoidal observado anteriormente. Com base nesses resultados, os espectros de CD podem ser atribuídos às transições de conformação do polissacarídeo, em vez da presença de pequenas quantidades de proteínas residuais na amostra bruta. Portanto, nas condições experimentais deste estudo, o conteúdo de proteína não teve efeito sobre os espectros de CD (CARVALHO et al., 2020).

Além disso foi investigado conformação em função da temperatura, para isso a temperatura foi gradualmente aumentada até 70°C. Um aumento de temperatura de até 70 °C não alterou o padrão, embora tenha sido observada uma diminuição na banda positiva, concomitante com um aumento na banda negativa e um desvio no ponto de inversão de 214 para 207 nm. Após o aquecimento a 70 °C, a solução foi deixada resfriar até 20 °C, a elipsicidade molar a 201 nm retornou aos seus valores originais, sugerindo que a conformação helicoidal foi reestabelecida após o resfriamento (CARVALHO et al., 2020).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DE ULVANAS

Os polissacarídeos da macroalga verde (Chlorophyta) *Ulva fasciata* foram obtidos a partir da alga seca e moída, por meio de extração aquosa a 80 °C, resultando na fração denominada F. Além da fração F obtida neste trabalho, também foram caracterizadas as frações UF, obtidas da *Ulva fasciata* disponível na biblioteca de polissacarídeos do laboratório e a fração ULT, obtida da *Ulva laetevirens* do Mar Mediterrâneo (Nettuno, Itália Central), gentilmente cedida pela Professora Roberta Paulert (Universidade Federal do Paraná, Ciências Agrônômicas - Setor Palotina). As frações foram submetidas a análises químicas e espectroscópicas, incluindo RMN de 1D e 2D.

TABELA 3 - RENDIMENTO E ANÁLISES QUÍMICAS FRAÇÕES F, UF E ULT

Fração	Rendimento (%) ^a	Carboidratos totais (%) ^b	Ácidos urônicos (%) ^c	Sulfato (%) ^d	Proteínas (%) ^e	Composição Monossacarídica (mol %)				
						Rha	Xyl	Man	Gal	Glc
F	20,0	66,5	19,2	22,9 ^f	2,8	52,6	39,3	1,9	0,5	5,7
UF	n.d.	62,0	17,3	20,8 ^f	2,2	49,8	37,4	1,4	0,6	10,6
ULT	n.d.	61,2	18,9	16,7	2,8	48,8	39,9	1,6	0,6	6,0

^a Em relação à macroalga seca e moída. ^b Dubois et al., 1956. ^c Van Den Hoogen et al., 1998.

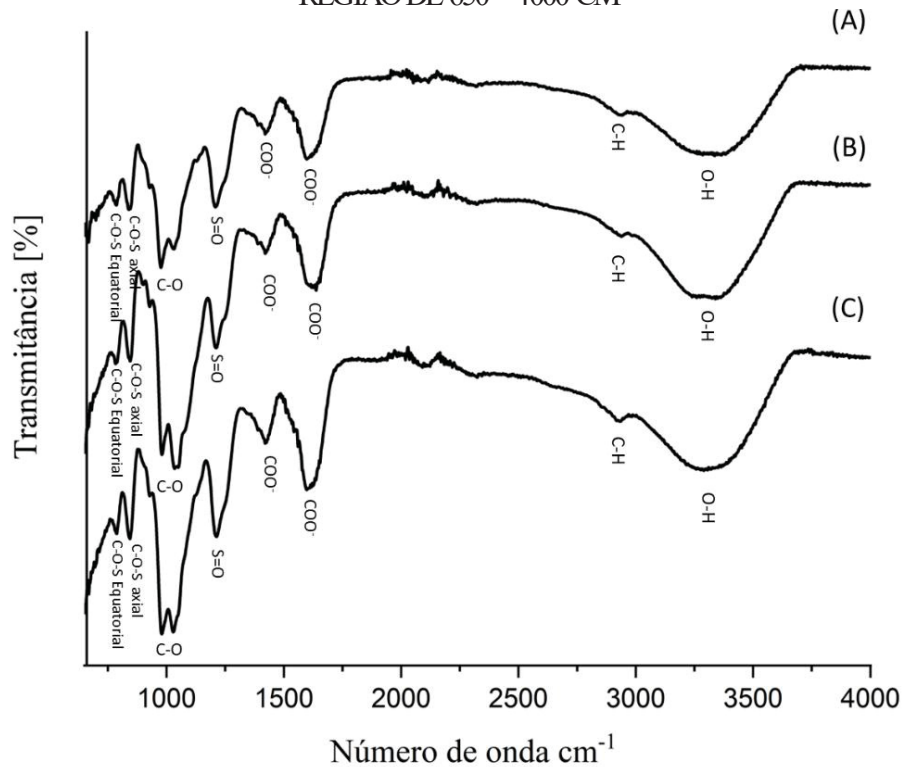
^d Dodgson; Price, 1962. ^e Lowry et al., 1951. ^f Na forma de SO₃⁻. n.d. não determinado

A fração F, quando comparada à macroalga verde seca e moída, teve um rendimento de 20,0%. Esta fração contém 66,5% de carboidratos totais, 22,9% de sulfato (SO₃⁻) e 2,8% de proteínas. A análise da composição monossacarídica revelou que a ramnose e a xilose são os principais monossacarídeos neutros (56,2 mol% e 39,3 mol%, respectivamente), com menores percentagens de glucose, manose e galactose. Além disso, a fração F contém 19,2% de ácidos urônicos.

Para fração UF foi determinado 62,0% de carboidratos totais, 20,8% de sulfato (SO₃⁻) e 2,2% de proteínas, além de 17,3% de ácidos urônicos. Com relação a análise da composição monossacarídica a mesma apresentou ramnose e a xilose como principais monossacarídeos neutros (49,8 mol% e 37,8 mol%, respectivamente), com menores percentagens de glucose, manose e galactose. Ainda a fração ULT apresentou teor de 61,2 % de carboidratos totais, 16,7 de sulfato (SO₃⁻) e 2,2 % de proteínas, adicionalmente 18,9% de ácidos urônicos. A análise de composição monossacarídica da fração ULT mostrou que ramnose e xilose (48,8 mol% e 39,9

mol%, respectivamente) são os monossacarídeos neutros majoritários, com menores percentagens de glucose, manose e galactose.

FIGURA 13 - ESPECTRO FT-IR DA FRAÇÃO UF (A) FRAÇÃO F (B) E FRAÇÃO ULT (C) - REGIÃO DE 650 – 4000 CM^{-1}



A partir dos resultados das análises de espectroscopia de infravermelho (FTIR) das frações UF, F e ULT (fig.15). A banda de absorção centrada em cerca de 3340 cm^{-1} a foi atribuída a estiramentos dos grupos hidroxila (OH), com menor intensidade a banda em torno de 2938 cm^{-1} correspondem a estiramentos de CH, decorrentes da presença de grupos do grupo metil (CH_3). Bandas entre 1636 e 1440 cm^{-1} , são características dos grupos carboxila de unidades de ácidos urônicos. Absorções fortes entre 1630-1646 cm^{-1} foram atribuídas ao estiramento assimétrico do grupo C=O e absorções fracas em torno de 1434 cm^{-1} do modo de estiramento simétrico de C=O. As absorções em 1208 cm^{-1} e 1060 cm^{-1} são consideradas na literatura como a regiões características para ulvanas (PARADOSSI et al., 1999).

A absorção de 1208 cm^{-1} é característica da vibração de estiramento do éster sulfato (S=O) do polissacarídeo. Os espectros de FT-IR frações UF, F e ULT apresentaram uma banda em 1056 cm^{-1} referentes a estiramentos da ligação C-O, característico das principais unidades monossacarídicas ramnose e ácido glucurônico presentes no polissacarídeo. O sinal em torno de 845 cm^{-1} corresponde a vibração da ligação C-O-S na posição axial do sulfato. O pico de

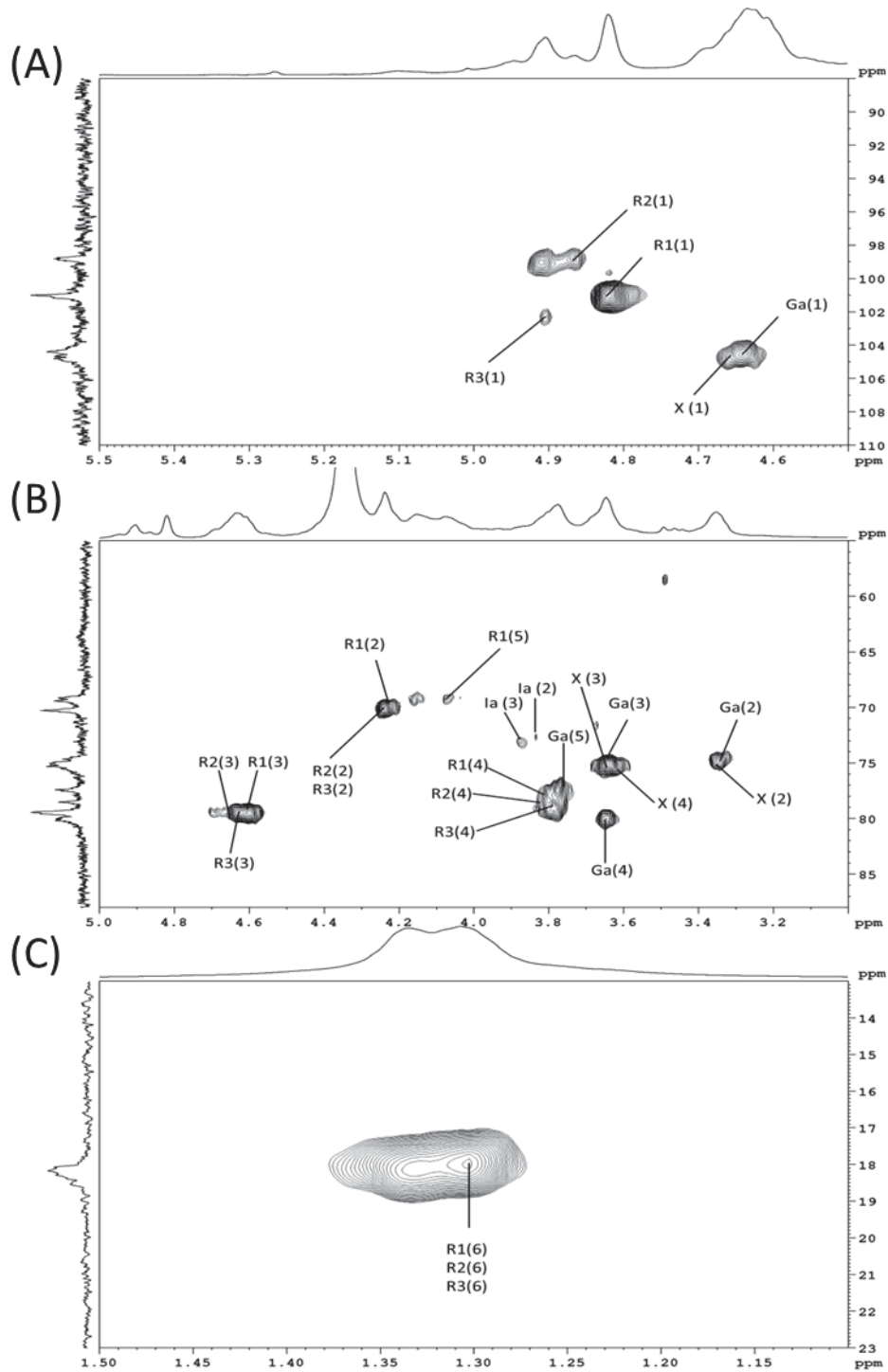
baixa intensidade em 785 cm^{-1} ocasionado pela vibração da ligação de C-O-S do sulfato em posição equatorial (ALVES; SOUSA; REIS, 2013; BARAKAT et al., 2022b; GARCÍA-MÁRQUEZ et al., 2023; PARADOSSI et al., 1999)

Na região anomérica do espectro de HSQC da fração F e UF (figuras 16A e 17A, respectivamente) apresentaram acoplamentos em $101,0/4,82$ e $104,5/4,63$ ppm atribuídos ao C-1/H-1 de unidades de α -L-ramnosep 3-sulfato e ao β -D-ácido glucurônicop respectivamente, formando a díade denominada de ácido ulvanobiurônico tipo A (A_{3s}). Aos acoplamentos em $99,0/4,90$ e $104,6/4,64$ foram atribuídos a C-1/H-1 de unidades de α -L-ramnosep 3-sulfato e β -D-xilosep, respectivamente correspondentes as díades denominadas de ulvanobiose. Adicionalmente os acoplamentos em $102,3/4,90$ e $5,12$ atribuídos a C-1/H-1 de unidades de α -L-ramnosep 3-sulfato e ao α -L-ácido idurônicop formando a díade denominada de ácido ulvanobiurônico tipo B (B_{3s}). Não foram observados acoplamentos referentes a díades de ulvanobiose 2-sulfato ($U_{2S,3S}$) (CARVALHO et al., 2018; COLODI et al., 2021; COSTE et al., 2015; CARVALHO et al., 2020; FREITAS et al., 2015; LAHAYE, 1998).

Na região anomérica do espectro de HSQC da fração ULT (fig. 18A) apresentou acoplamentos em $101,0/4,82$ e $104,4/4,64$ ppm atribuídos ao C-1/H-1 de unidades de α -L-ramnose 3-sulfato e ao β -D-ácido glucurônico respectivamente, formando a díade denominada de ácido ulvanobiurônico tipo A (A_{3s}). Aos acoplamentos em $98,9/4,90$ e $100,5/4,96$ atribuídos a C-1/H-1 de unidades de α -L-ramnosep 3-sulfato e β -D-xilosep 2-sulfato e os acoplamentos em $99,0/4,90$ e $104,8/4,67$ foram atribuídos a C-1/H-1 de unidades de α -L-ramnosep 3-sulfato e β -D-xilosep respectivamente correspondentes as díades denominadas de ulvanobiose. Adicionalmente os acoplamentos em $102,3/4,90$ e $104,1/5,14$ atribuídos C-1/H-1 de unidades de α -L-ramnosep 3-sulfato e ao α -L-ácido idurônicop formando a díade denominada de ácido ulvanobiurônico tipo B (B_{3s}) (CARVALHO et al., 2018; COLODI et al., 2021; COSTE; CALLEJO; FERNÁNDEZ-DÍAZ, 2015; FREITAS et al., 2015; LAHAYE, 1998, 1998; ROBIC et al., 2009b).

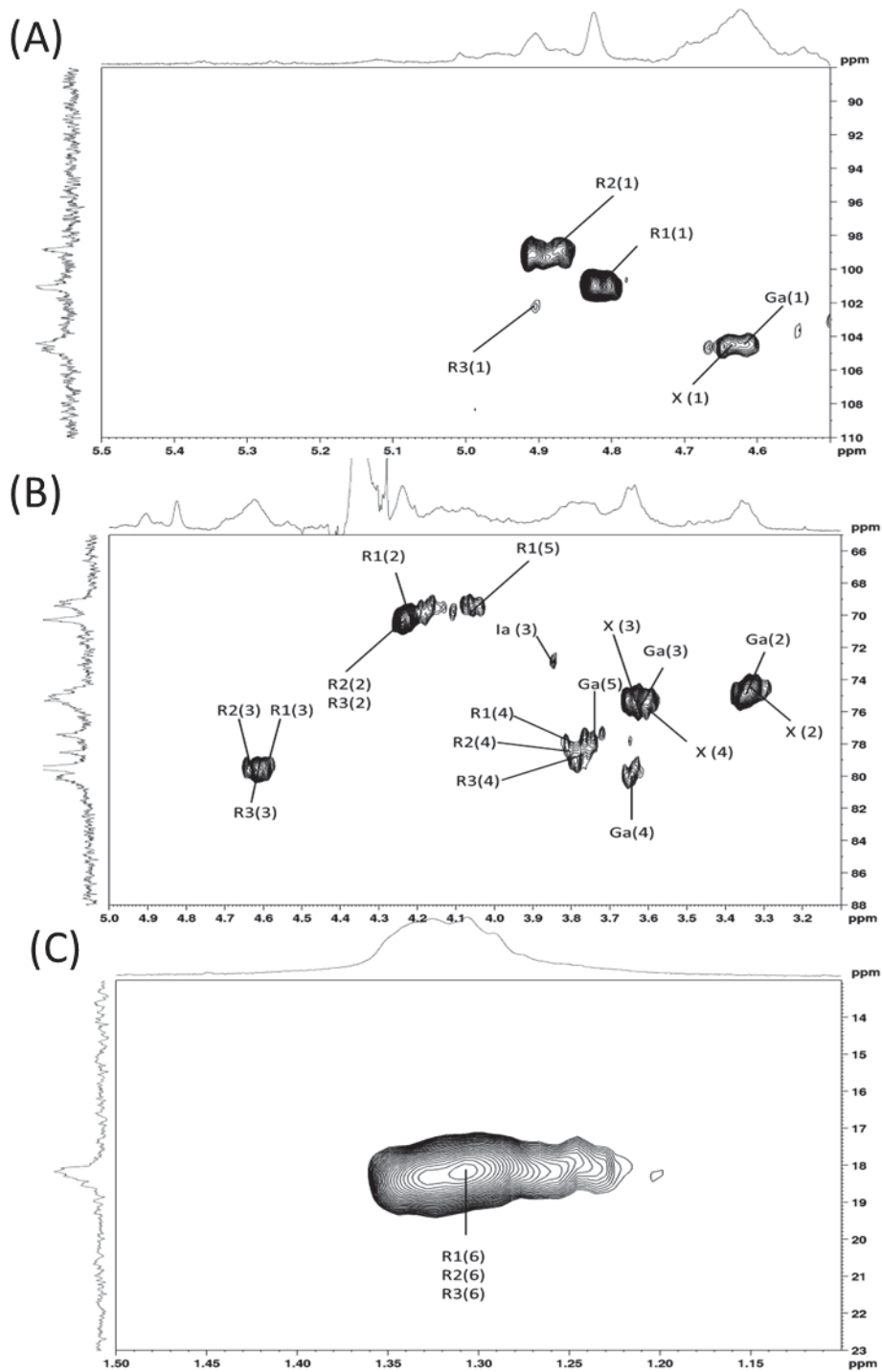
As análises químicas e espectroscópicas demonstraram que a frações F, UF e ULT são constituídas por polissacarídeos sulfatados contendo unidades de α -L-ramnosep, β -D-xilosep e ácidos urônicos. Estes dados estão de acordo com o que é relatado na literatura para as ulvanas de outras espécies do gênero *Ulva sp.* (CARVALHO et al., 2018; COLODI et al., 2021; ROBIC et al., 2009b). Os resultados estão apresentados na tabela 3 e figura 15.

FIGURA 14 - ESPECTRO DE HSQC DA FRAÇÃO F REGIÃO DE 88-110 ppm (A) DE 65-88 PPM (B) DE 23-13 PPM (C)



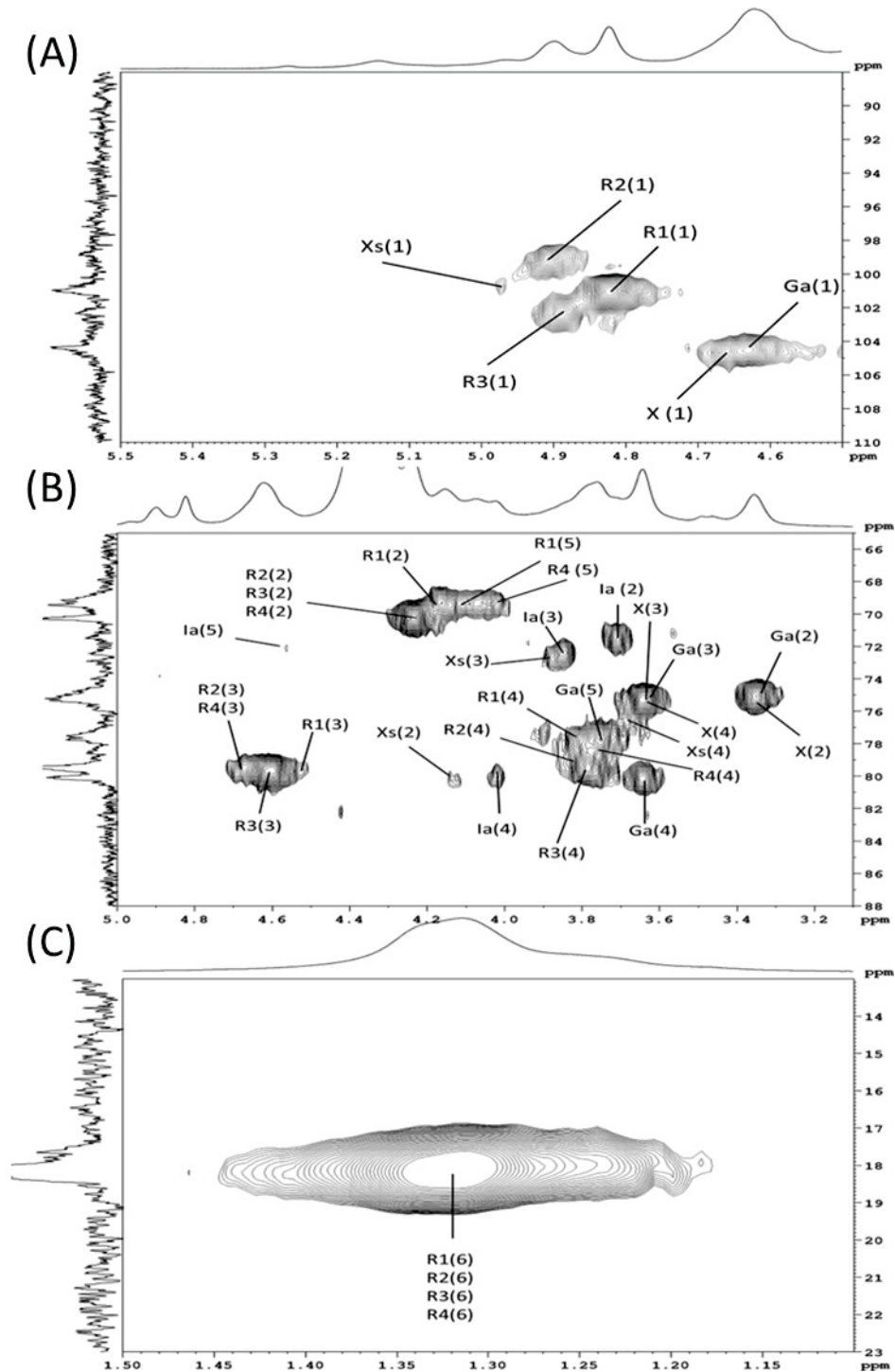
NOTA: Solvente: D_2O . Temperatura: 70°C . Acetona como padrão interno para ^1H (2,225 ppm) e ^{13}C (31,45 ppm). Ga e R1: β -D-ácido glucurônico e α -L-ramnose 3-sulfato da díade $\text{A}_{3\text{s}}$; X e R2: β -D-xilose e α -L-ramnose 3-sulfato da díade $\text{U}_{3\text{s}}$; Ia e R3: α -L-ácido idurônico e α -L-ramnose 3-sulfato da díade $\text{B}_{3\text{s}}$. Os números entre parênteses representam o posicionamento do carbono.

FIGURA 15 - ESPECTRO DE HSQC DA FRAÇÃO UF REGIÃO DE 88-110 ppm (A) DE 65-88 PPM (B) DE 23-13 PPM (C)



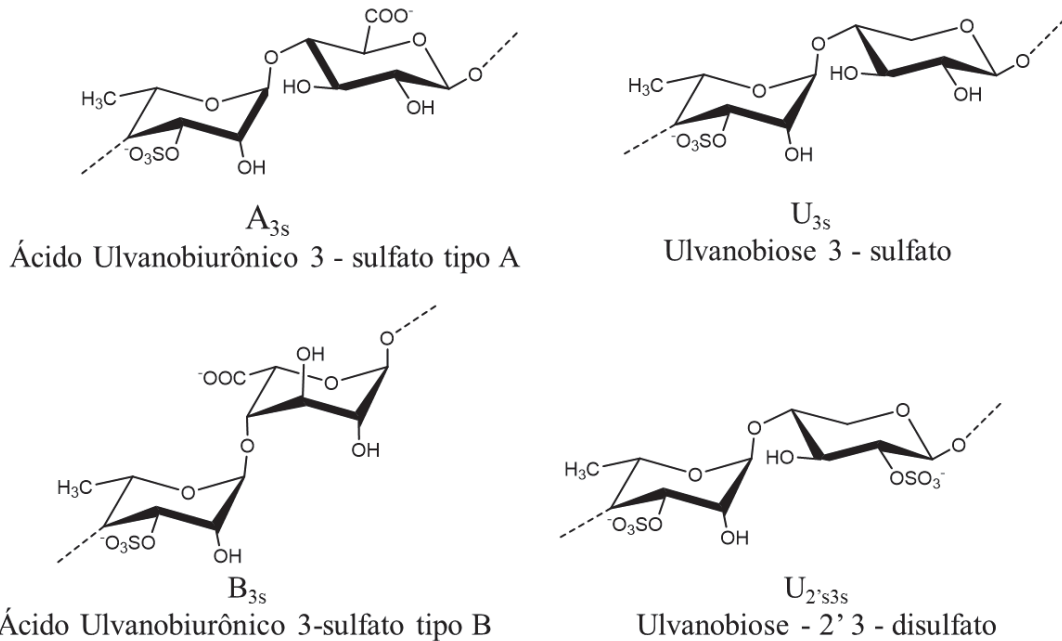
NOTA: Solvente: D_2O . Temperatura: 70°C . Acetona como padrão interno para ^1H (2,225 ppm) e ^{13}C (31,45 ppm). Ga e R1: β -D-ácido glucurônico e α -L-ramnose 3-sulfato da díade $\text{A}_{3\text{s}}$; X e R2: β -D-xilose e α -L-ramnose 3-sulfato da díade $\text{U}_{3\text{s}}$; Ia e R3: α -L-ácido idurônico e α -L-ramnose 3-sulfato da díade $\text{B}_{3\text{s}}$. Os números entre parênteses representam o posicionamento do carbono.

FIGURA 16 - ESPECTRO DE HSQC DA FRAÇÃO ULT REGIÃO DE 88-110 ppm
(A) DE 65-88 PPM (B) DE 23-13 PPM (C)



NOTA: Solvente: D_2O . Temperatura: 70°C . Acetona como padrão interno para ^1H (2,225 ppm) e ^{13}C (31,45 ppm). Ga e R1: β -D-ácido glucurônico e α -L-ramnose 3-sulfato da díade $\text{A}_{3\text{s}}$; X e R2: β -D-xilose e α -L-ramnose 3-sulfato da díade $\text{U}_{3\text{s}}$; Ia e R3: α -L-ácido idurônico e α -L-ramnose 3-sulfato da díade $\text{B}_{3\text{s}}$; Xs e R4: β -D-xilose 2-sulfato e α -L-ramnose 3-sulfato da díade $\text{U}_{2,3\text{s}}$. Os números entre parênteses representam o posicionamento do carbono.

TABELA 6 - DESLOCAMENTOS QUÍMICOS (PPM) DOS ESPECTROS DA FRAÇÃO ULT



Unidades	Díade	C1/H1	C2/H2	C3/H3	C4/H4	C5/H5	C6/H6
$\rightarrow 4$ - α -L-Rhap-3S-(1 \rightarrow)	A_{3s}	101,0/4,82	70,3/4,22	79,4/4,60	79,1/3,77	69,3/4,15	18,2/1,31
$\rightarrow 4$ - β -D-GluAp-(1 \rightarrow)		104,5/4,63	75,05/3,35	75,4/3,64	80,1/3,64	77,7/3,74	~175,5
$\rightarrow 4$ - α -L-Rhap-3S-(1 \rightarrow)	U_{3s}	99,0/4,90	70,4/4,24	79,4/4,63	78,5/3,81	69,3/4,05	18,2/1,31
$\rightarrow 4$ - β -D-Xylp-(1 \rightarrow)		104,6/4,64	74,8/3,35	74,3/3,65	75,5/3,65	63,9/4,09	-
$\rightarrow 4$ - α -L-Rhap-3S-(1 \rightarrow)	$U_{2'3s}$	98,9/4,90	70,4/4,24	79,4/4,63	78,5/3,81	69,2/4,05	~18,2/1,31
$\rightarrow 4$ - β -D-Xylp-2S-(1 \rightarrow)		100,5/4,96	80,3/4,11	73,1/3,86	75,5/3,65	63,1/4,08	-
$\rightarrow 4$ - α -L-Rhap-3S-(1 \rightarrow)	B_{3s}	102,2/4,91	70,4/4,24	72,4/3,83	78,5/3,81	69,7/4,00	~18,2/1,31
$\rightarrow 4$ - α -L-IdoAp-(1 \rightarrow)		104,1/5,14	71,7/3,67	72,7/3,83	80,4/4,02	72,1/4,57	~176,2

Desta maneira, as análises de RMN permitem concluir que as frações F e UF obtidas de *Ulva fasciata* são constituídas pelas díades A_{3s} , B_{3s} e U_{3s} , enquanto fração de ulvanas ULT obtidas de *Ulva laetevirens* além das díades encontradas nas frações F e UF apresentou a díade de $U_{2'3s}$. A ulvana ULT apresentou uma maior complexidade quando comparada as demais frações obtidas de *Ulva fasciata*. Apesar das variações de composição e de estrutura observadas pelas diferentes técnicas as frações obtidas estão de acordo com o previamente descrito na literatura para ulvanas de *Ulva sp.* (BARAKAT et al., 2022b; CARVALHO et al., 2018; COLODI et al., 2021; GARCÍA-MÁRQUEZ et al., 2023; LAHAYE; AXELOS, 1993; PARADOSSI et al., 1999; PARADOSSI; CAVALIERI; CHIESSI, 2002).

4.2 FOSFORILAÇÃO QUÍMICA DE ULVANAS EM MEIO AQUOSO

Com a finalidade de fosforilar ulvanas quimicamente em meio aquoso foram realizados diferentes condições de fosforilação química utilizando o método STMP-STPP (JIANG et al., 2020). A escolha desse método ocorreu devido a dissolução em água, com a possibilidade de controle dos parâmetros das reações, como por exemplo pH e temperatura. Foram adicionados ao meio reacional conteúdo ulvanas os agentes fosforilantes trimetafosfato de sódio (STMP) e tripolifosfato de sódio (STPP) em diferentes concentrações, alterando a temperatura e o pH do meio reacional, conforme o descrito na tabela 7.

TABELA 7 - CONDIÇÕES DE FOSFORILAÇÃO QUÍMICA

Fração	Agente fosforilante	Condições	Referências
1R	1:2 - STMP-STPP	H ₂ O - 30 °C – pH 7 - 24 horas	O autor, 2023
2R	1:2 - STMP-STPP	H ₂ O - 30 °C – pH 10 - 24 horas	O autor, 2023
3R	1:2 - STMP-STPP	H ₂ O - 30 °C – pH 7 - 5 horas	O autor, 2023
4R	1:2 - STMP-STPP	H ₂ O - 60 °C – pH 7 - 5 horas	FENG et al., 2017
5R	1:2 - STMP-STPP	H ₂ O - 80 °C – pH 7 - 5 horas	O autor, 2023
6R	1:6 - STMP-STPP	H ₂ O - 100 °C – pH 9 - 7 horas	JIANG et al., 2020
9R	1:6 - STMP-STPP	H ₂ O - 30 °C – pH 7 - 6 horas	O autor, 2023

Fonte: o autor, 2023

TABELA 8 - ANÁLISES QUÍMICAS DA FRAÇÃO UF E DE SEUS DERIVADOS APÓS FOSFORILAÇÃO

Fração	Recuperação (%) ^a	Carboidratos totais (%) ^b	Sulfato (%) ^c	Fosfato (%) ^f
UF	-	62,0	20,8 ^d	0,0
1R	31,2	45,5	15,8 ^d	0,2
2R	73,8	69,5	16,7 ^d	0,1
3R	41,8	64,9	14,8 ^d	0,6
4R	46,2	53,6	18,6 ^d	0,3
5R	39,1	68,8	17,6 ^d	0,3
6R	84,2	55,7	13,1 ^d	1,3

^aEm relação à fração UF. ^bDubois et al., 1956. ^cDodgson; Price, 1962. ^dNa forma de SO₃⁻. ^fGreenfield; Kalber, 1954.

Foram realizadas análises químicas das frações obtidas após a fosforilação (tabela 8) nas condições apresentadas na tabela 7. Para as frações 1R e 2R foram mantidas as condições de temperatura, de concentração de agentes fosforilantes e de tempo reacional variando-se apenas os valores de pH. Ambas as frações apresentaram uma redução nos teores de sulfato em comparação com a fração UF. A fração 1R apresentou uma menor recuperação e um menor

teor de carboidratos e um teor de fosforo 50% maior que o da fração 2R. Foi escolhida a condição de pH da fração 2R para seguir os testes por apresentar uma maior recuperação, um maior teor de carboidratos totais e uma menor perda de grupos sulfato em relação a fração 1R.

A partir dos resultados obtidos para as frações 1R e 2R foram preparadas novas reações variando a temperatura, mantendo a concentração de reagente e o tempo de reação, dando origem as frações 3R, 4R e 5R. A temperaturas variaram de 30 a 80°C, entretanto a recuperação das frações foi a similar as frações 1R e 2R. Entretanto a fração 3R apresentou o maior de teor de fosfato que as demais frações, todas as frações apresentaram teores de carboidratos maiores que 50% indicando assim que a temperatura não tem influência na degradação do polissacarídeo quando ele é fosforilado quimicamente em meio aquoso.

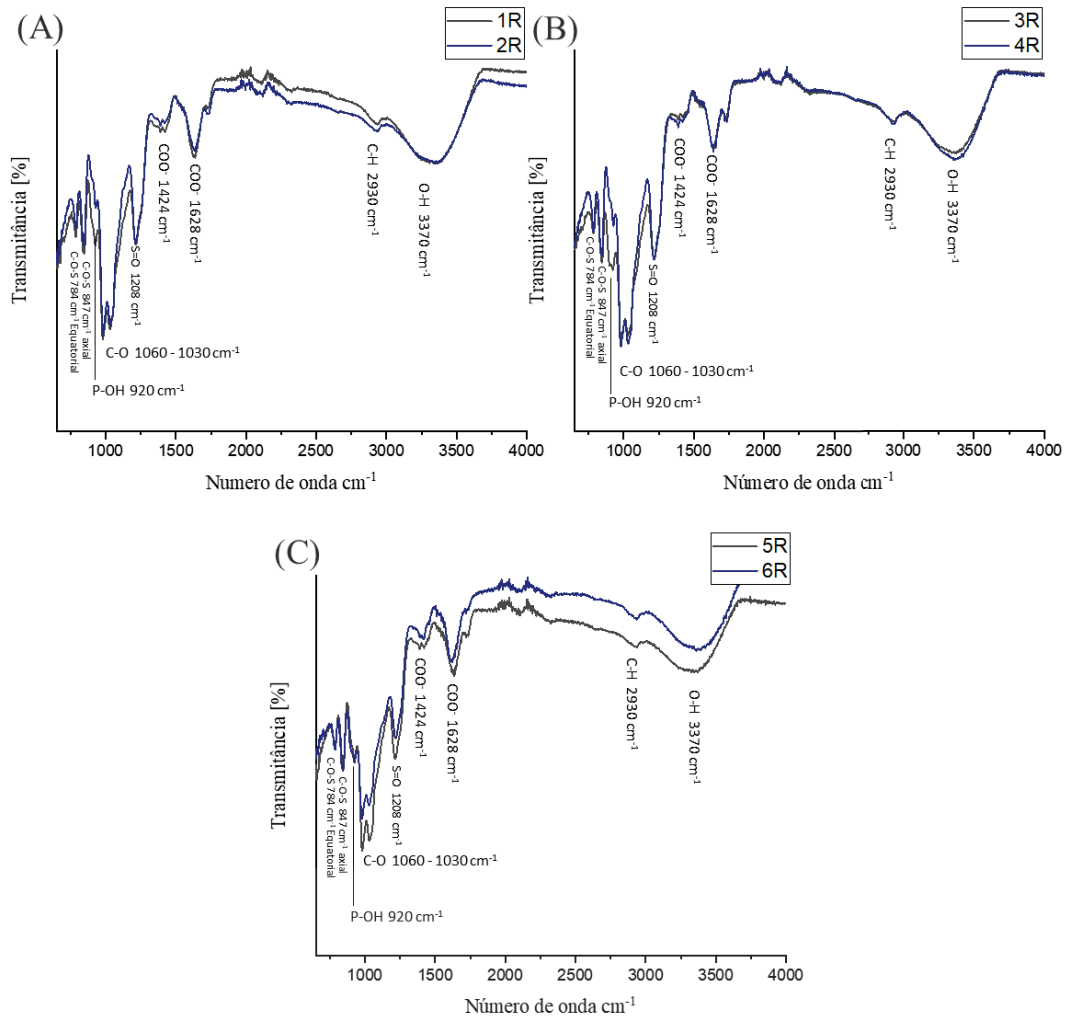
As reações de fosforilação foram realizadas conforme descritos na tabela 7, para acompanhamento das modificações químicas e estruturais decorrentes destas reações. Os produtos submetidos as reações de fosforilação foram analisadas quanto aos teores de carboidratos totais, sulfato e fosfato e análises espectroscópicas de RMN de ^{31}P .

Após análises das frações 1R a 5R as quais foram fosforiladas utilizando o método (STMP-STPP), foram escolhidas as condições para novas rodadas de fosforilação, com o objetivo de obter maiores quantidades de material. A fração UF foi novamente dissolvida em água e então adicionados os agentes fosforilantes trimetafosfato de sódio e tripolifosfato de sódio em proporções definidas por Jiang e colaboradores, 2020, dando origem a fração 6R, enquanto para a fração 9R a temperatura e o pH do meio reacional foram escolhidos considerando os resultados obtidos na etapa anterior, conforme o descrito na tabela 7.

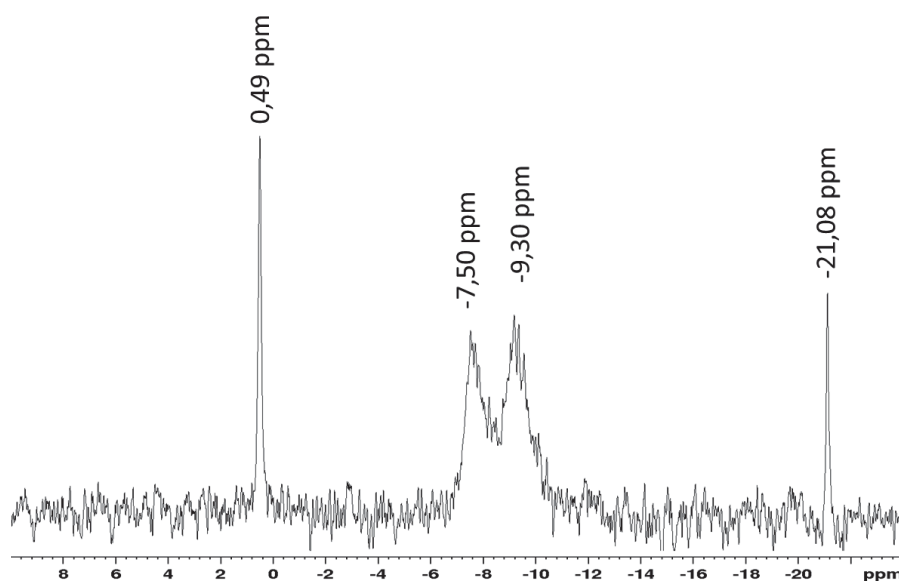
A fração 6R apresentou uma recuperação de 84,2% em relação a sua fração de origem UF, apresentando um decréscimo de 10,2% e de 37,0% nos teores de carboidratos totais e nos teores de sulfato respectivamente, os resultados dos teores de fosfato apresentaram um teor de fosfato de 1,3% com grau de substituição (DS) de 0,07.

As frações 1R a 6R (tabela 7) foram analisadas por FT-IR. Após a fosforilação as frações apresentaram padrões similares entre si (fig. 19) e apresentaram algumas diferenças significativas com a fração de origem. O espectro FT-IR dos derivados fosforilados apresentou novas bandas: uma banda em 1208 cm^{-1} , correspondente às ligações P=O e uma banda em 920 cm^{-1} relacionado ao grupo P-OH e o aumento na intensidade dos picos de 845 cm^{-1} e 785 cm^{-1} correspondente às ligações P-O-C, esses picos se sobrepõem aos ocasionados pela vibração da ligação de C-O-S (NISHI et al., 1984; SUFLET; CHITANU; DESBRIRES, 2010; WANG et al., 2014; YE et al., 2013).

FIGURA 17 - ESPECTRO FT-IR DA FRAÇÕES 1R E 2R (A) 3R E 4R (B), 5R E 6R (C) OBTIDOS APÓS FOSFORILAÇÃO QUÍMICA - REGIÃO DE 650 – 4000 CM⁻¹



O espectro de RMN de ³¹P da fração 6R (fig. 20), foi comparado aos sinais encontrados na literatura para esta modificação química quando realizada em meio aquoso, após a fosforilação foram observados os deslocamentos químicos em 0,49 ppm (monofosfato), -7,50 e -9,60 ppm (difosfato) e -21,08 ppm (trifosfato) o indicando que a fração 6R foi substituída por diferentes espécies de fosfato (CHEN et al., 2021; JIANG et al., 2020; XIONG et al., 2019).

FIGURA 18 - ESPECTRO DE RMN DE ^{31}P DA FRAÇÃO 6R.

Nota: Solvente = D_2O . Temperatura = 70°C . H_3PO_4 como padrão externo ^{31}P (0.0 ppm).

Os espectros de RMN de ^{31}P da fração 6R apresentaram sinais em regiões referentes a monofosfato, difosfato e a trifosfato. Entretanto somente com esses resultados não é possível confirmar a ligação dos grupos fosfato ao polissacarídeo, devido a semelhança entre os sinais s reagentes de fosforilação e o produto fosforilado. Assim, uma estratégia foi elaborada utilizando o meio de reação sem o polissacarídeo para controle dos reagentes. Além disso, o controle da temperatura e do pH foi mantido durante todo o período da reação em tampão fosfato com pH 7, resultando na fração 9R (conforme a tabela 9).

TABELA 9 - CONTROLE DE TEMPERATURA E PH NA OBTENÇÃO DA FRAÇÃO 9R

Nº da alíquota	Tempo (h)	pH	Temperatura ($^\circ\text{C}$)
0	0 h	7,55	34,5
1	1 h	7,97	30,0
2	2 h	7,90	31,1
3	3 h	7,83	29,7
4	4 h	7,96	29,6
5	5 h	8,10	30,7
6 (9R)	6 h	7,51	30,2
Média		7,83	30,83
Desvio padrão		$\pm 0,15$	$\pm 1,0$

Durante o experimento, foram coletadas amostras a cada hora, totalizando um período de 6 horas de reação. Este procedimento foi realizado para monitorar a progressão da reação e garantir que os dados mais precisos fossem coletados. O tampão da reação, as amostras coletadas e o branco da reação foram todos analisados por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^{13}P (^1H). Essas análises foram realizadas em um espectrômetro Bruker DPX 200 (200 MHz). O ácido fosfórico 85% ^{31}P (0.00 ppm) foi utilizado como padrão externo. As medições foram feitas à temperatura ambiente e envolveram 512 varreduras, garantindo uma cobertura abrangente do espectro de ressonância.

Os espectros de RMN de ^{13}P correspondentes às amostras estão apresentados na Figura 18. A análise do meio reacional em tampão pH 7 (Figura 18 (B)) mostrou apenas um pico em 2.0 ppm, que corresponde ao fosfato de potássio (KH_2PO_4). Este pico é uma indicação direta da presença de fosfato de potássio no meio reacional.

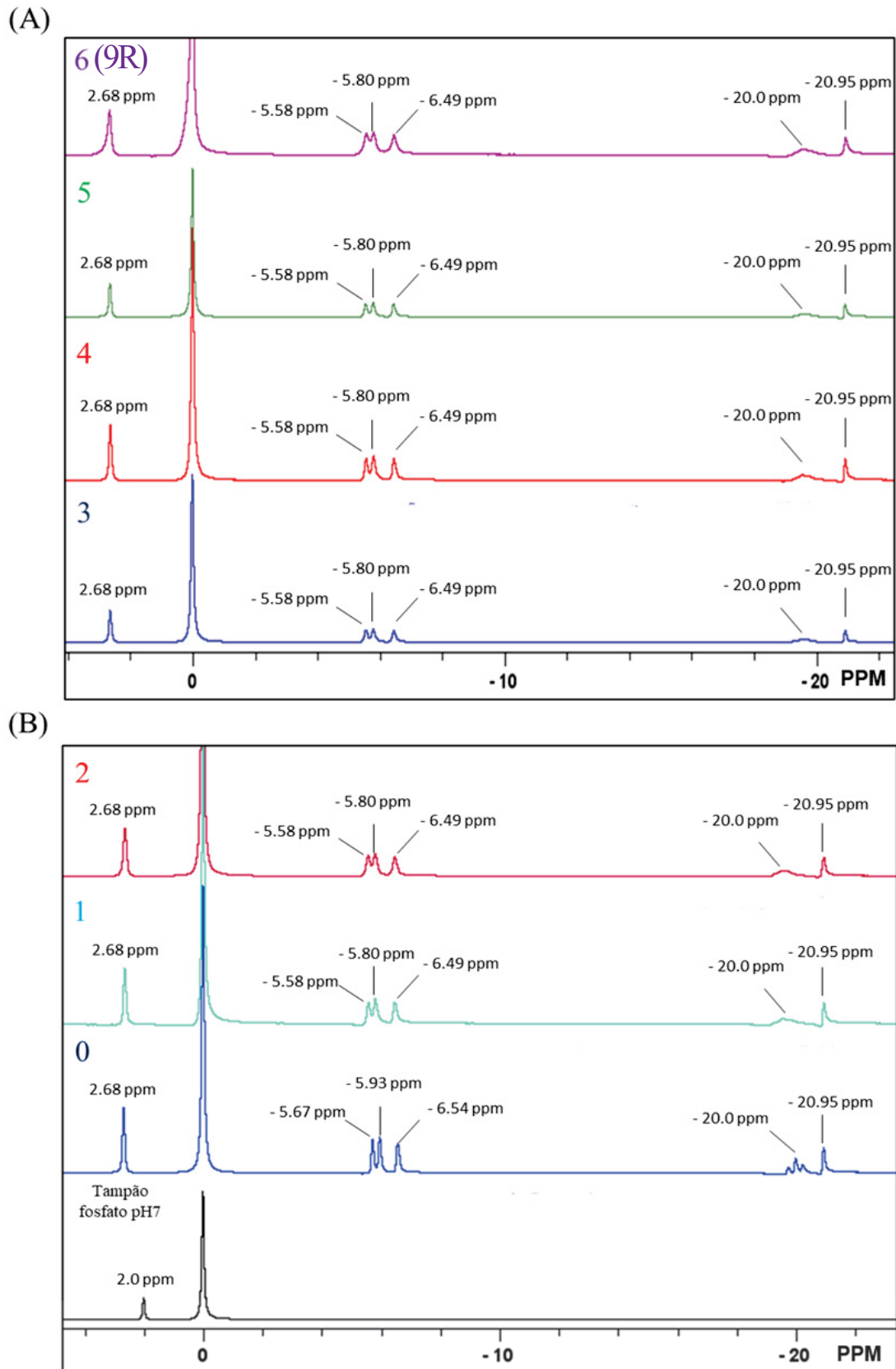
No início da reação (tempo 0), foi observado um pequeno aumento de pH, de 7,00 para 7,55. Este aumento pode ser atribuído à natureza da reação e aos reagentes envolvidos. À medida que a reação progredia, ocorreram pequenas mudanças no pH do meio reacional, com uma média de 7,83 e um desvio padrão de $\pm 0,15$. Estas mudanças no pH podem ser devidas à formação de produtos ou à utilização de reagentes durante a reação.

A temperatura se manteve próxima aos 30°C , com pequenas variações. A manutenção de uma temperatura constante é crucial em experimentos químicos, pois a temperatura pode influenciar a velocidade e o resultado da reação. As pequenas variações observadas são normais e estão dentro do esperado para este tipo de experimento.

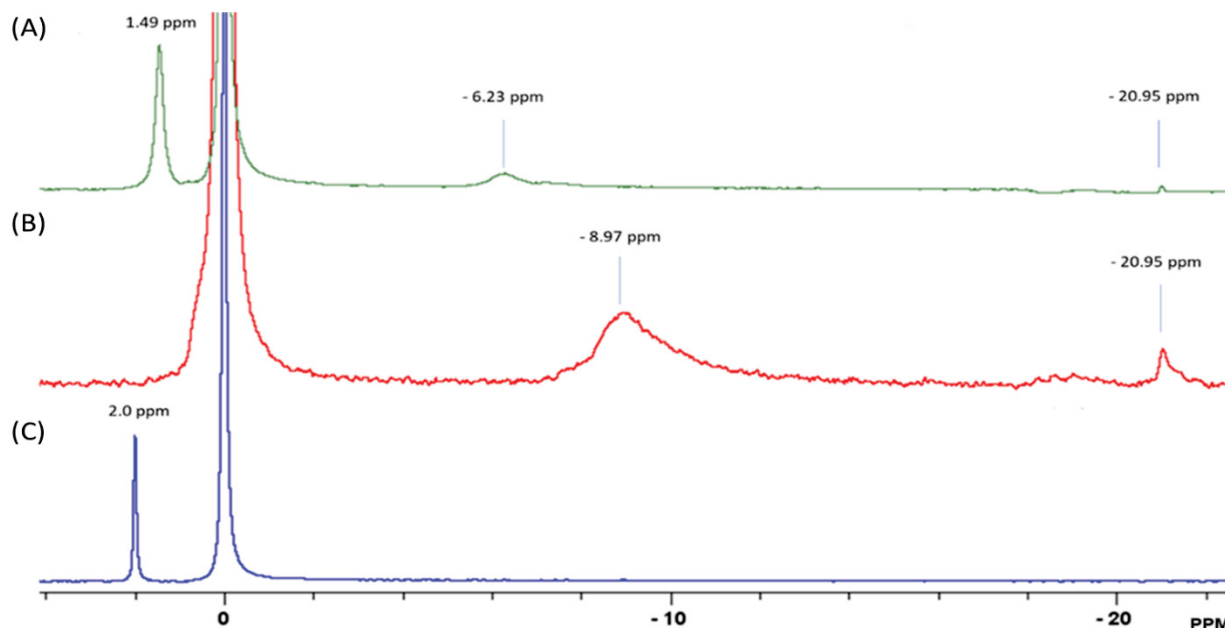
Ainda com relação aos deslocamentos químicos observados nos espectros de RMN o pico em -20,95 ppm refere-se aos grupos fosfatos na forma cíclica presentes trimetafosfato de sódio, enquanto o sinal na região de -20,0 ppm é referente tripoli fosfato de sódio um reagente de cadeia aberta, estes sinais representam os agentes fosforilantes intactos (fig. 18(B)).

Os picos em -5,58 ppm e -5,93 ppm são referentes a trifosfato de sódio, o pico em -6,54 ppm é referente a difosfato de sódio, estes sinais sofreram uma pequena variação entre as alíquotas, entretanto não foi perceptível o aparecimento de novos picos no decorrer da reação nem de deslocamentos que poderiam ter ocorrido em decorrência de ligações entre o polissacarídeo e os grupos fosfato presentes nos agentes fosforilantes. Para o fosfato de sódio foi atribuído o sinal em 2,68 ppm, o qual não sofreu alteração em nenhuma das alíquotas analisadas (SANG; PRAKASH; SEIB, 2007).

FIGURA 19 - ESPECTROS DE RMNDE $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ DAS ALÍQUOTAS DA REAÇÃO DE FOSFORILAÇÃO DA ULVANA UF



Nota: Solvente = D_2O . 85% H_3PO_4 como padrão externo ^{31}P (0.0 ppm). (A) Alíquotas 3,4,5 e 6 (9R). (B) Tampão fosfato pH7, alíquotas 0, 1 e 2. Temperatura ambiente (TA)

FIGURA 20 - ESPECTRO DE RMNDE ^{31}P DA FRAÇÃO 9R

Nota: Solvente = $\text{D}_2\text{O}:\text{H}_2\text{O}$ (1:10). 85% H_3PO_4 como padrão externo ^{31}P (0.0 ppm) temperatura ambiente. (A) Fração 9R em tampão fosfato pH 7. (B) Fração 9R pH 5,14. (C) tampão fosfato pH 7.

Através dos espectros obtidos do meio reacional e das alíquotas foram identificadas diversas espécies de grupos fosfato presentes nos agentes fosforilantes (fig. 18). Entretanto não foi possível diferenciar os agentes fosforilantes dos grupos fosfato possivelmente ligados.

A fração 9R apresentou um teor de fosfato de 1,1%, e um pH de 5,14 na concentração de $20 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, a qual foi utilizada para as análises. Na figura 19 (B) está apresentada o espectro da fração 9R (pH 5,14), três sinais no espectro de ^{31}P (figura 19), em 0,74 ppm (sinal não apresentado) referentes a grupos monofosfato, um pico largo em -8,97 ppm referente a grupos difosfato ou trifosfato, e em -20,95 ppm um sinal referente a trimetafosfato de sódio que permaneceu como possível contaminante mesmo após a dialise.

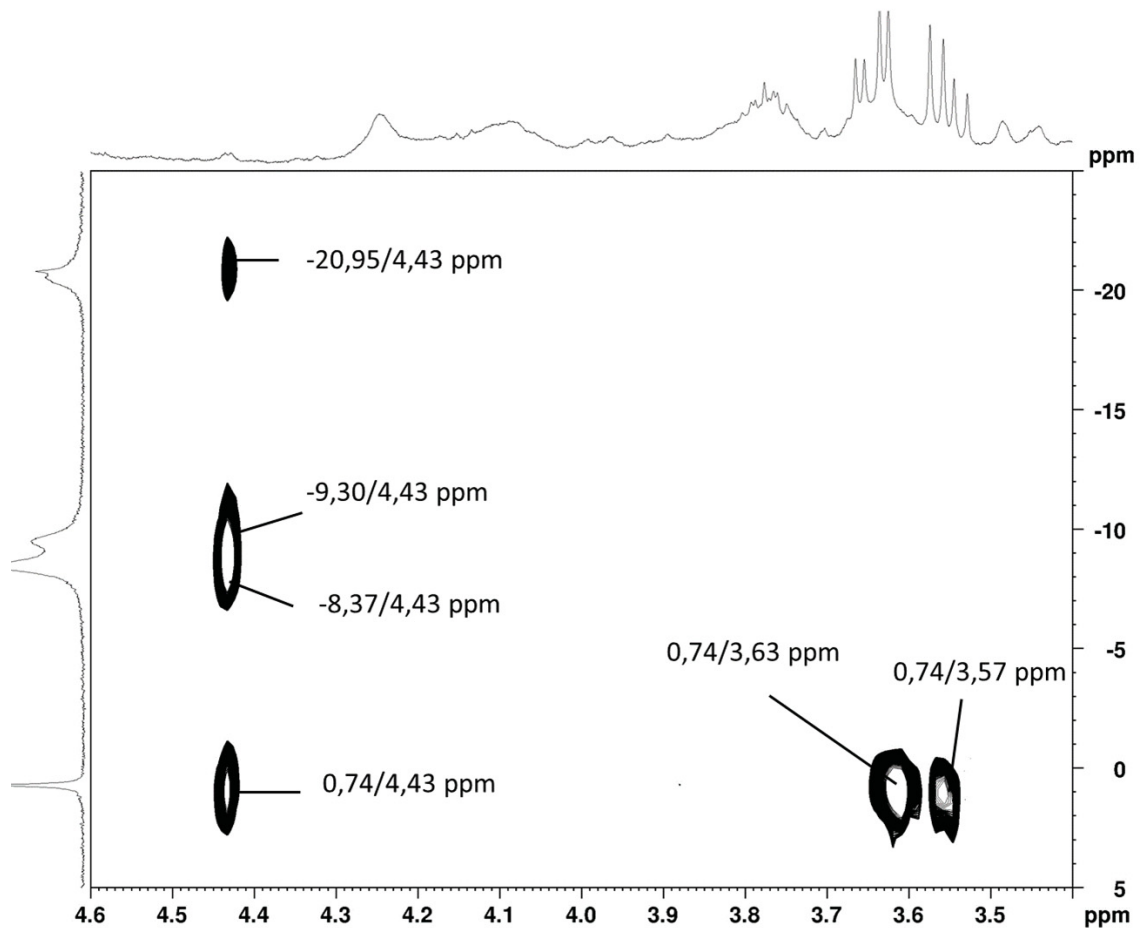
Na figura 18 são apresentados os espectros referentes as alíquotas coletadas no decorrer da reação, já o espectro apresentado na figura 19 (A) é referente a fração 9R em pH 7,00 e na figura 19 (C) está representado o espectro da do tampão fosfato o qual foi utilizado para modificar o pH da fração 9R, o qual apresentou um pico único em 2,0 ppm referente ao fosfato de sódio presente neste tampão.

Após a alteração no pH da fração 9R observou-se um deslocamento em alguns sinais, este fato foi atribuído a diferença de pH do meio utilizado para as análises. Os sinais de sofreram uma alteração para baixo campo de 0,74 para 1,49 ppm na região de monofosfato, e de -8,97 para -6,23 ppm região referentes a grupos difosfato e ainda podemos destacar esses sinais se

diferem dos sinais -5,58 ppm e -5,93 ppm referentes a trifosfato de sódio, o pico em -6,54 ppm e referente a difosfato de sódio encontrados nos espectros do meio reacional (fig. 19) indicando uma possível ligação covalente dos grupos fosfato a ulvanas.

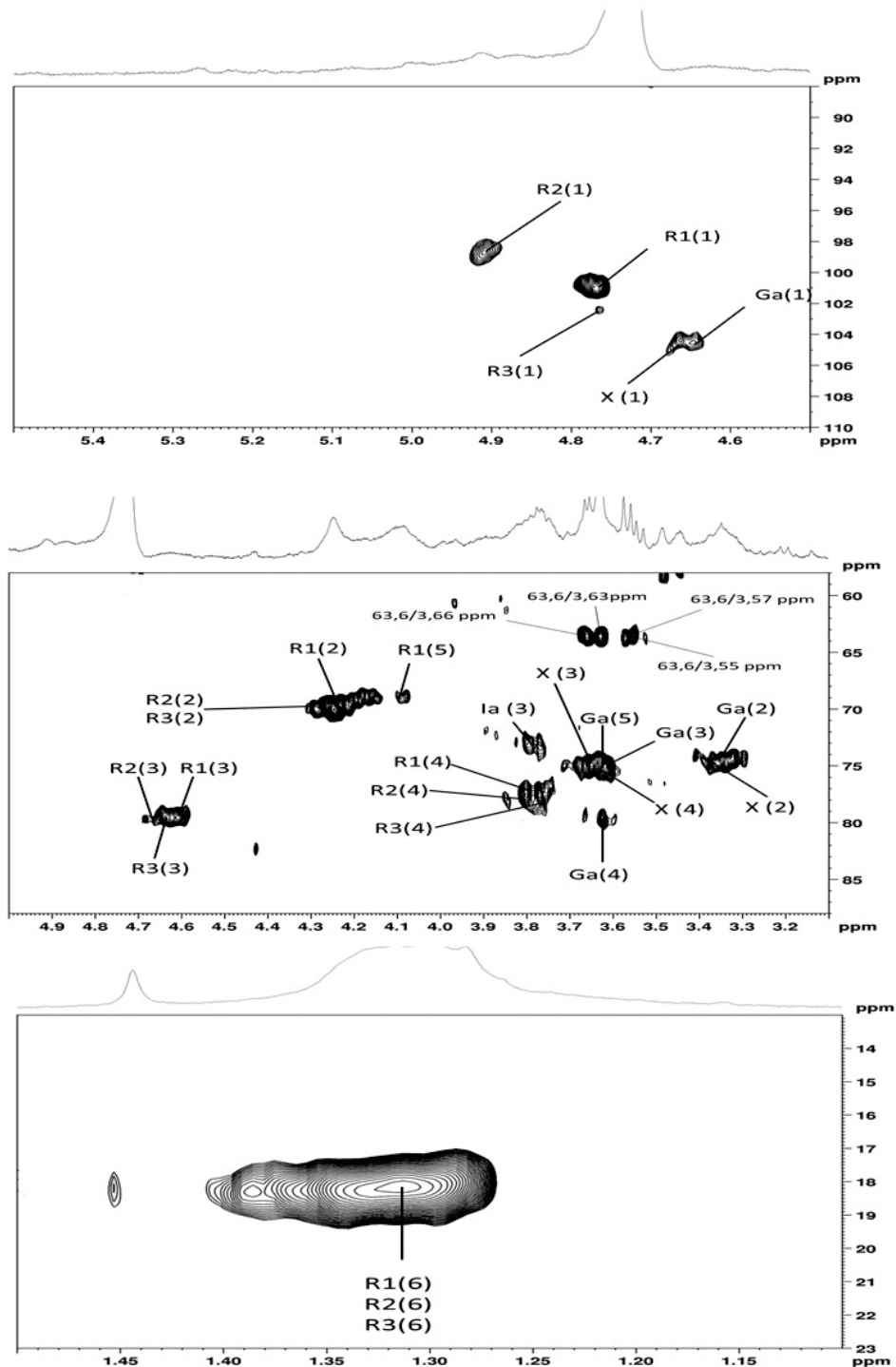
Foram realizadas análises de HMBC de $^1\text{H}/^{31}\text{P}$ da fração 9R (fig. 20) e os sinais foram comparados de acordo com a literatura para esta modificação química quando realizada em meio aquoso. Após a fosforilação foram observadas as correlações dos deslocamentos químicos em 0,74/4,43 ppm (monofosfato), -8,37/4,43 e -9,30/4,43 ppm (difosfato) e -21,95/4,43 ppm (trifosfato) o indicando que a fração 9R foi possivelmente substituída por diferentes espécies de fosfato. Adicionalmente os espectros apresentaram sinais em 0,74/3,63 ppm e 0,74/3,57 ppm referentes a grupo monofosfato em regiões diferentes do espectro de ^1H .

FIGURA 21 - ESPECTRO DE HMBC DE $^{31}\text{P}/^1\text{H}$ DA FRAÇÃO 9R REGIÃO DE 5 - 25 PPM



Nota: Solvente = D_2O . 85% H_3PO_4 como padrão externo ^{31}P (0.0 ppm). Temperatura ambiente.

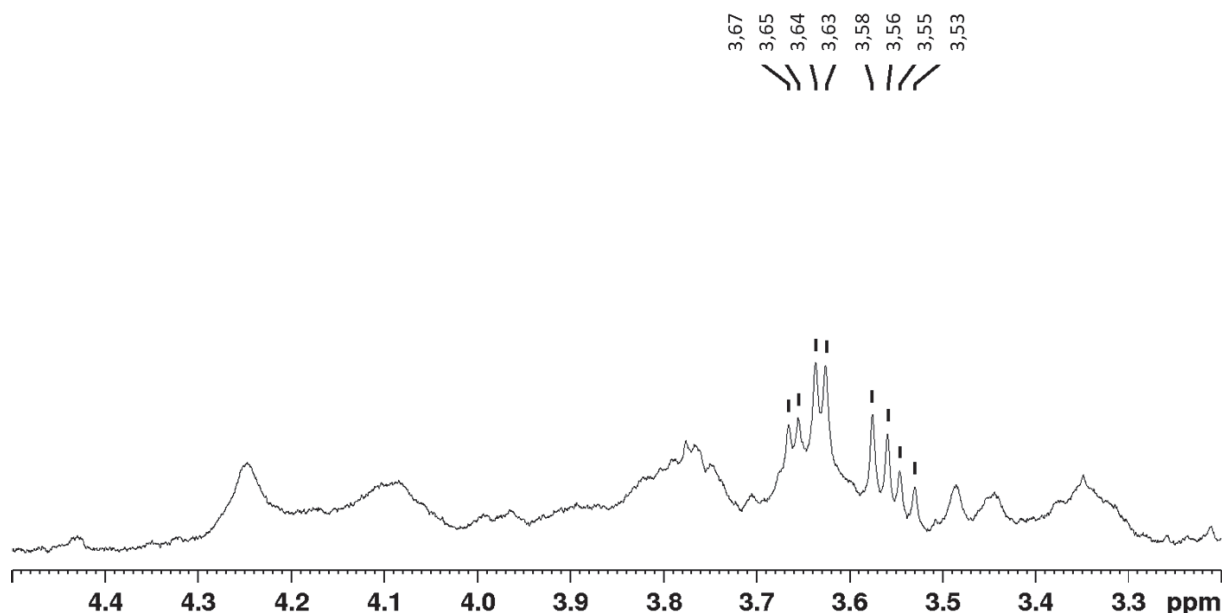
FIGURA 22 - ESPECTRO DE HSQC DA FRAÇÃO 9R - REGIÃO DE 88-110 PPM(A) DE 65-88 PPM (B) DE 23-13 PPM (C)



NOTA: Solvente: D₂O. Temperatura: 30 °C. Acetona como padrão interno para ¹H (2,225 ppm) e ¹³C (31,45 ppm). Ga e R1: β-D-ácido glucurônico e α-L-ramnose 3-sulfato da díade A_{3s}; X e R2: β-D-xilose e α-L-ramnose 3-sulfato da díade U_{3s}; Ia e R3: α-L-ácido idurônico e α-L-ramnose 3-sulfato da díade B_{3s}. Os números entre parênteses representam o posicionamento do carbono.

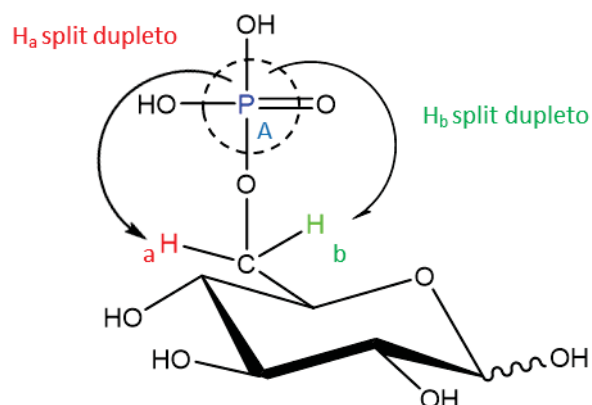
Adicionalmente a fração 9R foi submetida a análises de HSQC editado, com sinais de CH₂ invertidos (sinais negativos). A região anomérica do espectro de HSQC de ¹H/¹³C da fração 9R (fig. 25) apresentou acoplamentos em 101,0/4,82 e 104,4/4,64 ppm atribuídos ao C-1/H-1 de unidades de α -L-ramnosep 3-sulfato e ao β -D-ácido glucurônicop respectivamente, formando a díade denominada de ácido ulvanobiurônico tipo A (A_{3s}). Os acoplamentos em 98,9/4,90 e 100,5/4,96 atribuídos a C-1/H-1 de unidades de α -L-ramnosep 3-sulfato e β -D-xilosep 2-sulfato e os acoplamentos em 99,0/4,90 e 104,8/4,67 foram atribuídos a C-1/H-1 de unidades de α -L-ramnosep 3-sulfato e β -D-xilosep respectivamente correspondentes a díade denominada de ulvanobiose. Adicionalmente os acoplamentos em 102,3/4,90 e 104,1/5,14 atribuídos C-1/H-1 de unidades de α -L-ramnosep 3-sulfato e ao α -L-ácido idurônicop formando a díade denominada de ácido ulvanobiurônico tipo B (B_{3s}). Estes sinais estão também presentes no espectro da fração UF qual deu origem a fração 9R. (CARVALHO et al., 2018; COLODI et al., 2021; COSTE; CALLEJO; FERNÁNDEZ-DÍAZ, 2015; FREITAS et al., 2015; LAHAYE, 1998, 1998; ROBIC et al., 2009b). Foi possível identificar novos sinais nas correlações de 63,6/3,55 ppm, 63,6/3,57 ppm, 63,6/3,63 ppm e 63,6/3,66, os quais apresentaram-se negativos no espectro indicando que estavam ligados a CH₂.

FIGURA 23 - ESPECTRO DE ¹H DA FRAÇÃO 9R - REGIÃO DE 4,50 - 3,20 PPM



NOTA: Solvente: D₂O. Temperatura = 30 °C. Acetona como padrão: ¹H (2,225 ppm) e ¹³C (31,45 ppm).

FIGURA 24 – UNIDADE DE GLUCOSE 6-FOSFATO



Fonte: o autor, 2023

Ao analisar o espectro de ^1H na região de 3,20 a 4,50 ppm (fig.25) foram observados 4 dupletos de 4 e 6 Hz e entre eles de 16 a 17 Hz esses acoplamentos estão relacionados a ligação com fósforo, o que já é relatado na literatura para glucose 6-fosfato (CUI et al., 2006).

Ao comparar os resultados das análises de RMN de HMBC ($^3\text{P}/^1\text{H}$) e a HSQC ($^{13}\text{C}/^1\text{H}$) foi possível observar que as correlações 0,74/3,63 ppm e 0,74/3,57 ppm referentes a grupo monofosfato (HMBC) e 63,6/3,63 ppm e 63,6/3,57 ppm (HSQC) referentes a correlação de grupos CH_2 , os sinais referentes aos hidrogênios estavam presentes nos dois espectros indicando que havia uma relação entre esses hidrogênios e grupos HPO_3 e CH_2 .

Entretanto na cadeia principal de ulvanas não são constituídas por monossacarídeos que apresentem grupos CH_2 que poderiam ter seus sinais acoplando ao fosfato encontrado no espectro de HMBC ($^3\text{P}/^1\text{H}$). No entanto a análise de composição monossacarídica da fração de origem UF apresentou 12,6% de hexoses, sendo elas manose (1,4%), galactose (0,6%) e glucose (10,6%) ou seja essas unidades estariam sujeitas a fosforilação (fig.26) (CHEN et al., 2009).

A partir das análises realizadas, foi possível concluir que ocorre a fosforilação. No entanto, é importante notar que os monossacarídeos que são fosforilados na metodologia que utiliza STMP-STPP são aqueles que contêm hidroxilas primárias. Essas hidroxilas primárias estão mais acessíveis do que as hidroxilas secundárias presentes em ulvanas. Por exemplo, nas ulvanas, encontramos unidades de ramnose, xilose e ácido glucurônico na cadeia principal. Estas moléculas possuem hidroxilas secundárias, que não são tão facilmente acessíveis para a fosforilação como as hidroxilas primárias. Portanto, embora a fosforilação ocorra, ela é mais eficaz em monossacarídeos com hidroxilas primárias.

4.3 FOSFORILAÇÃO QUÍMICA EM MEIO ORGÂNICO

Com o objetivo de realizar a fosforilação química das ulvanas em meio orgânico, foram conduzidos experimentos com diferentes condições utilizando diferentes métodos como descritos na tabela 10. A escolha das metodologias se deu pelo uso de dimetilformamida anidra (DMF)(a) como solvente em todas as reações, sendo esse um solvente amplamente utilizado em outras modificações químicas como a sulfatação por exemplo. Entretanto ulvanas não são totalmente solúveis em DMF(a) sendo necessário o uso de um pré-tratamento com a prévia dialise do material em uma solução de trietilamina 3% por 12 horas e posterior liofilização. Nas metodologias foi utilizado ureia para facilitar a dissolução da ulvanas em meio orgânico e tributilamina buscando prevenir uma possível degradação total do material de partida no meio reacional.

TABELA 10 - FOSFORILAÇÃO QUÍMICA EM MEIO ORGÂNICO

Fração	Agente fosforilante	Condições	Referências
XP1	STPP (3,5 mmol.L ⁻¹)(a)	DMF(a) – 120 °C - 6 horas	(WHISTLER; TOWLE, 1969) ^(b)
XP2	STMP (3,5 mmol.L ⁻¹)(a)	DMF(a) – 120 °C - 6 horas	(WHISTLER; TOWLE, 1969) ^(b)
XP3	STPP (3,5 mmol.L ⁻¹)(a)	DMF(a) – 30 °C - 24 horas	(INOUE et al., 1983) ^(b)
XP4	STMP (3,5 mmol.L ⁻¹)(a)	DMF(a) – 30 °C – 24 horas	(INOUE et al., 1983) ^(b)
UF-P	Ácido Fosfórico (20,0 mmol.L ⁻¹)(c)	DMF(a) - 30°C - 6 horas	(COLEMAN et al., 2011) ^(b)
UF-P1	Ácido Fosfórico (10,0 mmol.L ⁻¹)(c)	DMF(a) – 30 °C - 6 horas	(COLEMAN et al., 2011) ^(b)
UF-P2	Acido Fosfórico (15,0 mmol.L ⁻¹)(c)	DMF(a) – 30 °C - 6 horas	(COLEMAN et al., 2011) ^(b)
UF-P3	Acido Fosfórico (5,0 mmol.L ⁻¹)(c)	DMF(a) – 30 °C - 6 horas	(COLEMAN et al., 2011) ^(b)

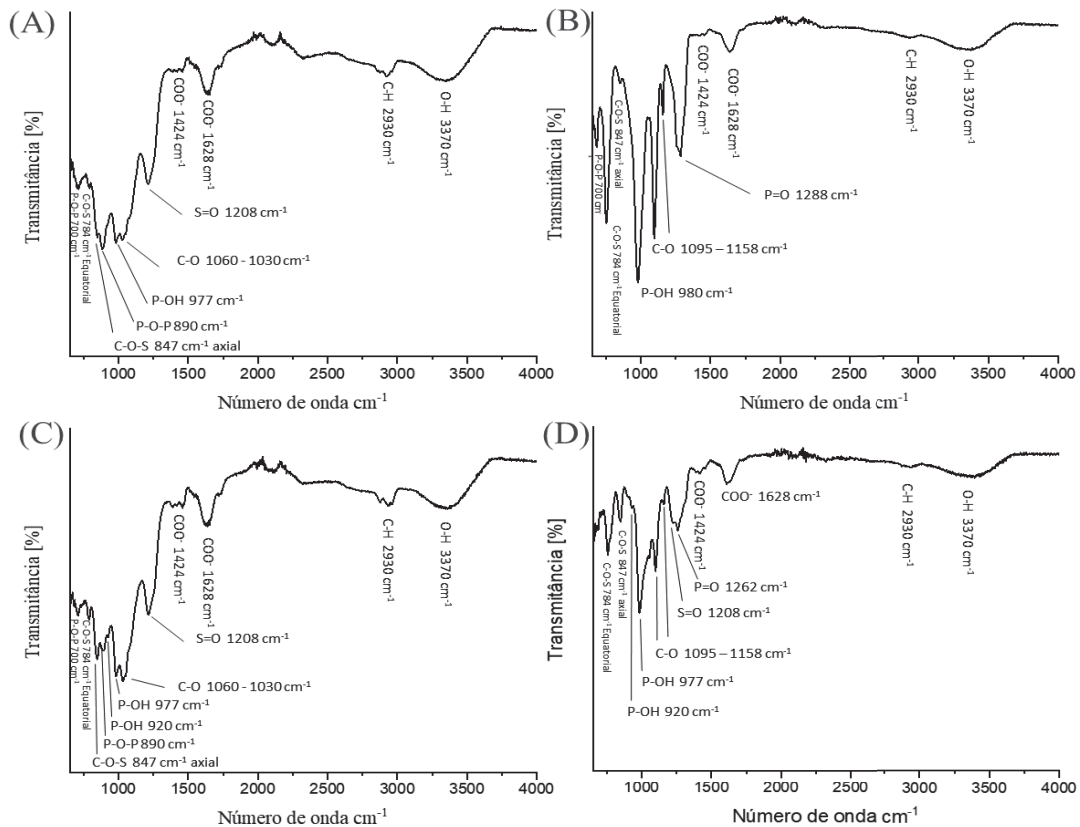
(a) 3,0 eq. de tributilamina. (b) adaptado. (c) 3,5 g de ureia.

Após a fosforilação as frações XP1 a XP4 (tabela 10) foram analisadas por FT-IR. As frações XP1 e XP3 foram fosforiladas agente fosforilante (STPP), porém em diferentes condições bem como para as frações XP2 e XP4 em STMP. Após a fosforilação as frações apresentaram padrões similares dependentes do agente fosforilante. Após a fosforilação as frações apresentaram novas bandas. Uma das dificuldades nas análises de FT-IR das frações fosforiladas é o fato de que as bandas características das ligações P=O e P-O-C em 1235 e 1070 cm⁻¹ podem estar sobrepostas por bandas de S=O e C-O em 1208 e 1060 cm⁻¹ presentes na fração UF.

As frações XP1 e XP3 (fig. 27) apresentaram novas bandas em 920 e 977 cm⁻¹, 890 e 700 cm⁻¹ correspondentes a grupos P-OH e a grupos P-O-P de polifosfato, respectivamente. As frações apresentaram diferenças entre si na região de 900 – 700 cm⁻¹, com 24 horas de reação a 30°C houve o aparecimento de uma maior quantidade de novas bandas enquanto uma para a

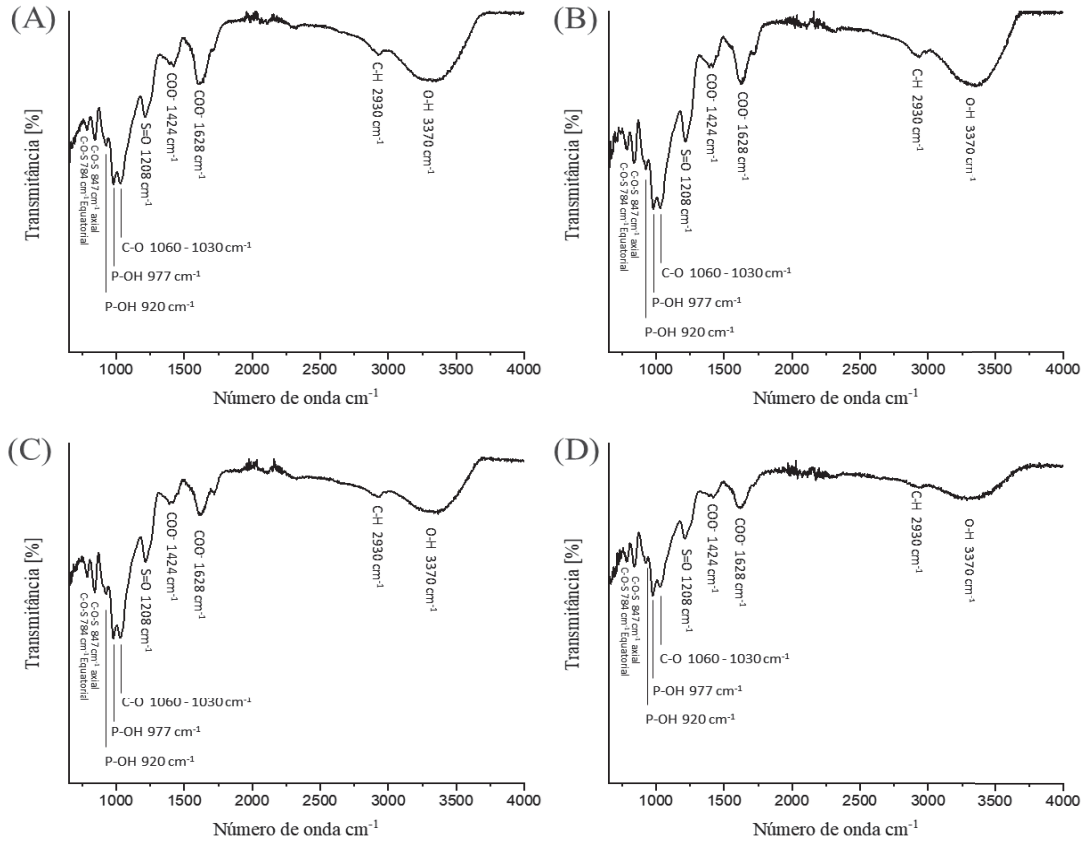
reação por 6 horas a 120 °C apresenta um espectro semelhante, porém com um menor número de bandas, o que indica que um maior tempo promove uma adição de uma maior quantidade de grupos fosfato (COLEMAN et al., 2011; WANG et al., 2020).

FIGURA 25 - ESPECTRO FT-IR DA FRAÇÃO XP1 (A), XP2 (B), XP3 (C) E XP4 (D) OBTIDOS APÓS FOSFORILAÇÃO QUÍMICA - REGIÃO DE 650 – 4000 CM⁻¹



Os espectros de FT-IR das frações XP2 e XP4 (fig. 27) apresentaram diferenças significativas quando comparados as frações XP1 e XP3 devido a diferenças estruturais nos agentes fosforilantes. Foram mantidas as bandas em 920 e 977 cm⁻¹ correspondentes a grupos P-OH, entretanto não foi observada a banda em 890 e 700 cm⁻¹ referente a grupos P-O-P da fração XP4. Entretanto na fração XP2 a banda de 700 cm⁻¹ indica a abertura de anel de trimetafosfato de sódio devido a temperatura de 120 °C utilizada na reação, gerando grupos polifosfato. Adicionalmente está presente uma banda em 980 cm⁻¹ correspondes a grupos P-OH. As duas frações apresentaram bandas em 1288 e 1262 cm⁻¹ referentes a grupos P=O. As frações XP2 e XP4 apresentaram mudanças nas bandas referentes aos grupos C-O para 1095 e 1158 cm⁻¹, respectivamente (CAGNIN et al., 2021; COLEMAN et al., 2011; LARKIN, 2011; WANG et al., 2014, 2020).

FIGURA 26 - ESPECTRO FT-IR DA FRAÇÃO UF-P (A), UF-P1 (B), UF-P2 (C) E UF-P3 (D) OBTIDOS APÓS FOSFORILAÇÃO QUÍMICA - REGIÃO DE 650 – 4000 CM⁻¹



As frações UF-P a P3 (fig. 25) apresentaram novas bandas em 920 e 977 cm⁻¹ correspondentes a grupos P-OH em diferentes modos vibracionais. Não foram observadas bandas referentes a grupos P-O-P de grupos polifosfato. As frações apresentaram um espectros semelhantes entre si, não sendo observadas diferenças significativas, apesar do uso de diferentes concentrações do agente fosforilante (COLEMAN et al., 2011).

Além de análises de FT-IR foram realizadas análises químicas das frações obtidas após a fosforilação (tabela 11) nas condições apresentadas na tabela 10. As frações UF-P a P3 foram submetidas a reação de fosforilação nas mesmas condições de temperatura, variando a concentração de agentes fosforilantes e mantendo o tempo reacional. Ambas as frações apresentaram uma redução nos teores de sulfato de 16 a 50% em comparação com a fração UF. A fração UF-P3 apresentou uma menor recuperação, entretanto apresentou um maior teor de carboidratos e um teor de fósforo menor entre as frações. As demais frações apresentaram recuperação maior que 50%, com teores de carboidratos entre 47,3 e 54,7 %. Com relação aos teores de fósforo as frações seguem a seguinte ordem UF-P1>UF-P2>UF-P>UF-P3.

TABELA 11 - ANÁLISES QUÍMICAS DA FRAÇÃO UF E DE SEUS DERIVADOS APÓS FOSFORILAÇÃO

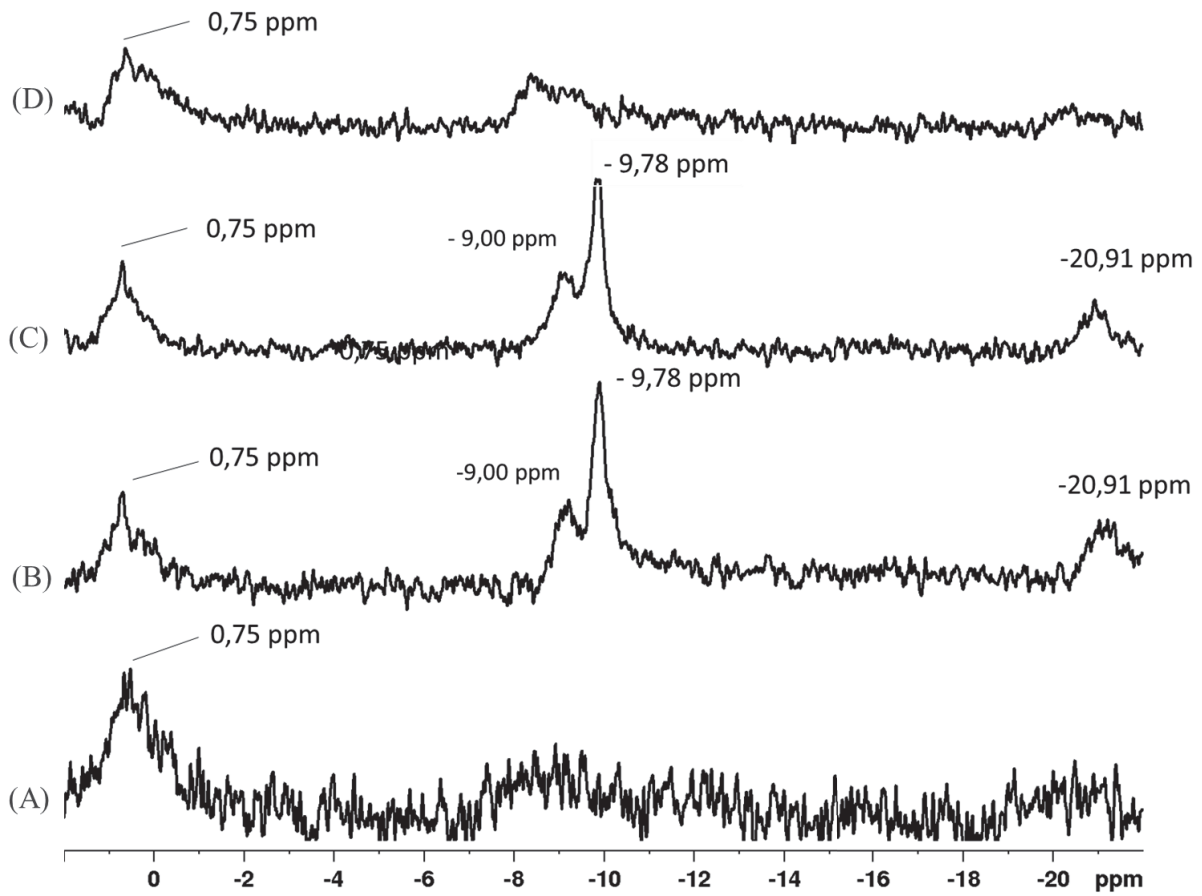
Fração	Recuperação (%) ^a	Carboidratos totais (%) ^b	Sulfato (%) ^c	Fosfato (%) ^f
UF	-	62,0	20,8 ^d	0,0
UF-P	53,7	54,7	10,6 ^d	1,0
UF-P1	65,4	47,3	14,4 ^d	1,3
UF-P2	60,1	59,9	13,3 ^d	1,2
UF-P3	46,6	62,6	17,3 ^d	0,9
XP1	27,7	5,5	-	2,6
XP2	9,0	5,7	-	0,0
XP3	27,1	3,8	-	2,1
XP4	42,1	39,9	-	0,1

^aEm relação à fração UF. ^bDubois et al., 1956. ^cDodgson; Price, 1962. ^dNa forma de SO₃⁻. ^fGreenfield; Kalber, 1954.

As frações XP1 e XP2 foram fosforiladas em meio orgânico utilizando diferentes agentes fosforilantes, para fração XP1 utilizou-se STPP já para fração XP2 o agente utilizado foi o STMP, submetidas a aquecimento de 120 °C por 6 horas. Como resultado dessa reação temos um decréscimo de 90% nos teores de carboidratos dessas frações, com um teor de fosfato de 2,6% para a fração XP1 e 0,0% para fração XP2. As frações XP3 e XP4 foram submetidas a reação de fosforilação com os mesmos agentes fosforilantes mencionados anteriormente STPP para fração XP3 e STMP para fração XP4, a 30 °C por 24 horas. A fração XP3 apresentou uma redução de 94 % no teor de carboidratos enquanto a fração XP4 apresentou uma redução de 35,6 %. O teor de fosfato foi de 2,1 e 0,1 % para as frações XP2 e XP4, respectivamente. Os baixos teores de fosfato para as frações XP2 e XP4, não necessariamente indicam que essas frações não contenham grupos fosfato, e sim indicam a presença de grupos que podem não formar complexos com molibdato de amônia na reação colorimétrica utilizada nestas dosagens.

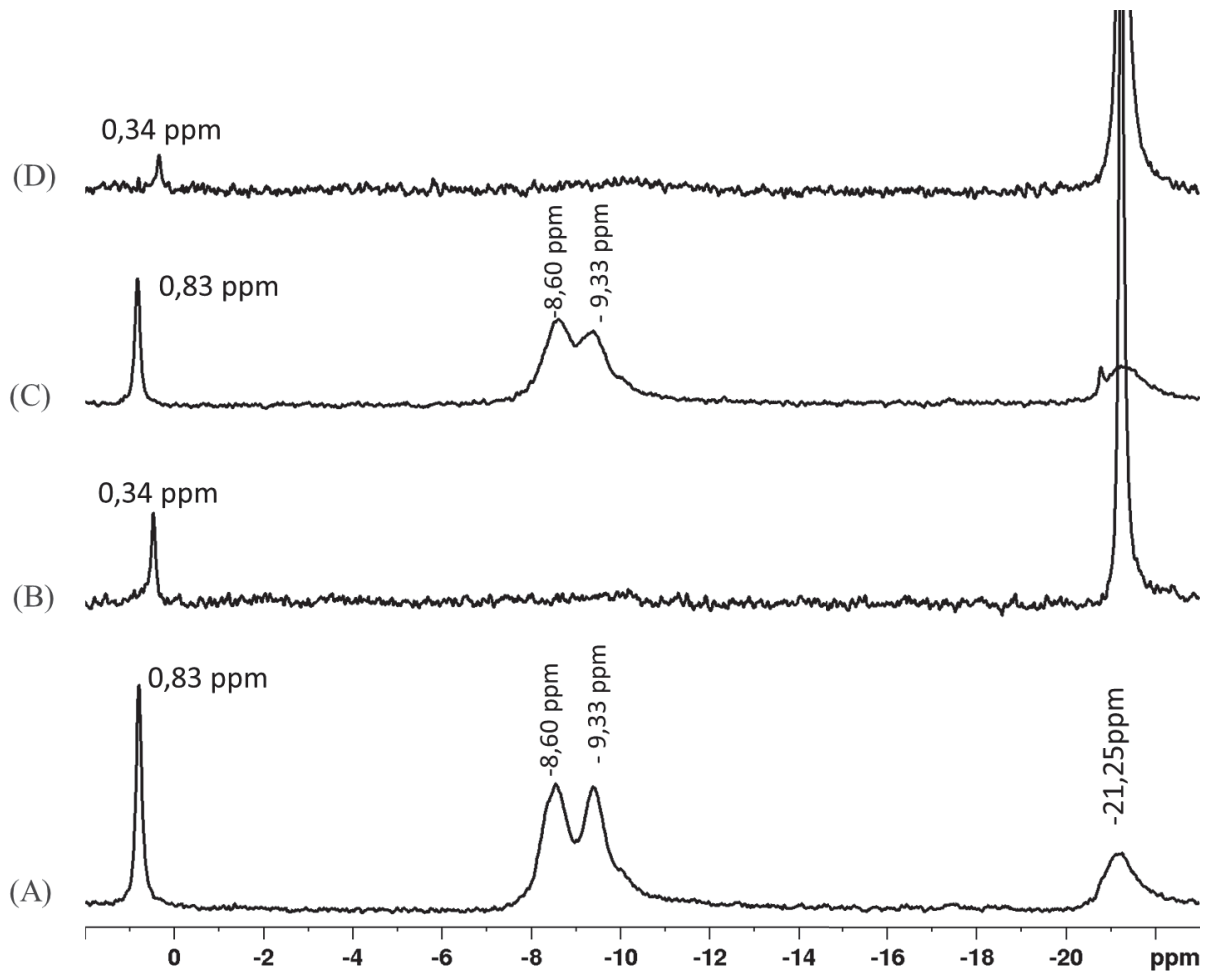
Nos espectros de RMN de ³¹P das frações UF-P a P3 (fig. 29), foram encontrados comparado aos sinais para esta modificação química. após a fosforilação todas as frações apresentaram pico em 0,75 ppm (monofosfato). Adicionalmente as frações UF-P1 e UF-P2 apresentaram sinais de deslocamentos químicos -9,00 e -9.78 ppm (difosfato) e -21,91 ppm (trifosfato) o indicando que essas frações foram substituídas por diferentes espécies de fosfato, para essas frações foram utilizados 10 e 15 mmol de ácido fosfórico como agente fosforilante, o que indica que nessa faixa de concentração de agente fosforilante ocorre a formação de grupos difosfato e trifosfato, o que não ocorre nas demais frações (COLEMAN et al., 2011; JIANG et al., 2020; WANG et al., 2020; XIONG; HUANG; HUANG, 2019).

FIGURA 27 – ESPECTRO DE RMN DE ^{31}P DAS FRAÇÕES UF-P (A), UF-P1 (B), UF-P2 (C) E UF-P3 (D) – REGIÃO 2 A -22 PPM



Nota: Solvente: D_2O . 85% H_3PO_4 como padrão externo ^{31}P (0.0 ppm) temperatura ambiente (TA).

FIGURA 28 – ESPECTRO DE RMN DE ^{31}P DAS FRAÇÕES XP1 (A), XP2 (B), XP3 (C) E XP4 (D) – REGIÃO 2 A -23 PPM



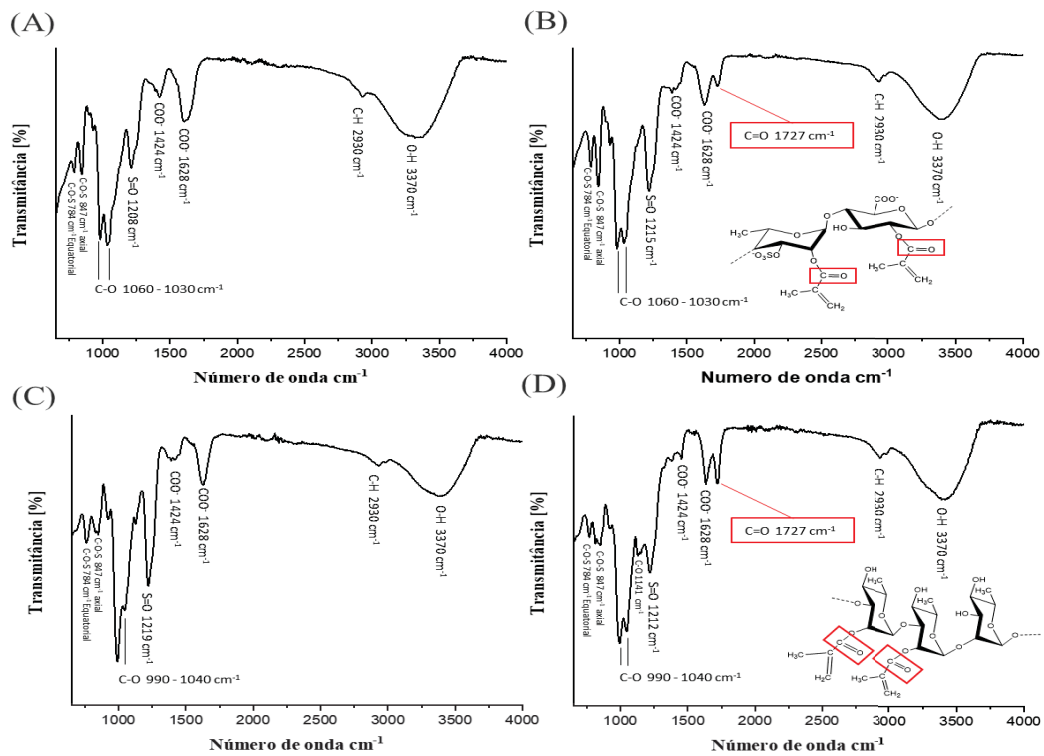
Nota: Solvente = $\text{D}_2\text{O}:\text{H}_2\text{O}$ (1:10). 85% H_3PO_4 como padrão externo ^{31}P (0,0 ppm) temperatura ambiente (TA).

Os espectros de RMN de ^{31}P das frações XP1 a XP4 (fig.30), apresentaram sinais similares aos encontrados nas frações XP1 e XP3. Após a fosforilação todas as frações apresentaram sinais em 0,34 e 0,83 ppm (monofosfato). Adicionalmente as frações XP1 e XP3 apresentaram sinais de deslocamentos químicos -8,60 e -9,33 ppm (difosfato). Todas as frações apresentaram sinais na região e -21,25 ppm (trifosfato), entretanto para as frações XP2 e XP4 esse sinal está presente com maior intensidade, podendo ser referente a grupos metafosfato (fosfato cíclico) o que explicaria o baixo ou inexistente teor de fosfato. As frações apresentaram diferente espécies de fosfato, porém devido à redução nos teores de carboidratos essas frações não foram utilizadas nos testes de atividade anticoagulante *in vitro*.

4.4 METACRILAÇÃO QUÍMICA DE POLISSACARÍDEOS

Além da reação de fosforilação foi realizada a reação de metacrililação de ulvanas (fração UF – *Ulva fasciata*) e heteroramnanas (fração GB – *Gayralia brasilienses*). Foi utilizado como agente de metacrililação o anidrido metacrílico (MA) dando origem as frações UFM (ulvanas metacriladas) e GBM (heteroramnanas metacriladas). Após a funcionalização com grupos metacrilato foram realizadas caracterizações por FT-IR e RMN de ^1H , para confirmar a inserção desses grupos nos polissacarídeos utilizados.

FIGURA 29 - ESPECTRO FT-IR DA FRAÇÃO UF (A), UFM (B), GB (C) E GBM (D) OBTIDOS APÓS METACRILAÇÃO QUÍMICA – REGIÃO DE 650 A 4000 cm^{-1}

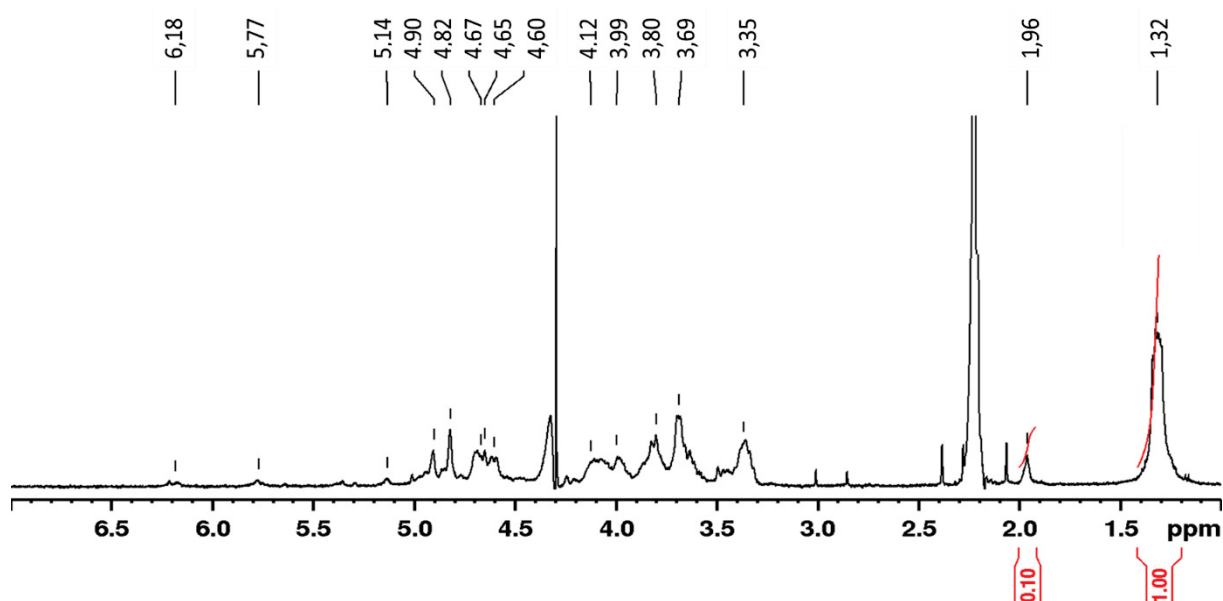


A fração UF não modificada apresentou bandas características em 3370, 2938, 1628, 1424, 1060 e 1030 cm^{-1} correspondendo aos modos vibracionais OH, COO⁻ antisimétrico, COO⁻ simétrico e C-O-C (anel), respectivamente. A bandas em 1208 cm^{-1} corresponde a ligação S=O, e bandas em torno de 845 cm^{-1} corresponde a vibração da ligação C-O-S na posição axial do sulfato, já a banda de baixa intensidade em 785 cm^{-1} vibracionais da ligação de C-O-S do sulfato em posição equatorial (GARCÍA-MÁRQUEZ et al., 2023; PARADOSSI et al., 1999). Após a metacrililação a fração UFM (fig. 28 (B)) apresentou uma nova banda em

1727 cm^{-1} característica da ligação C=O presente em grupos metacrilato como observado por Morelli et al., 2016, ao funcionalizar ulvanas de *Ulva sp.*

A fração GB (fig. 28 (C)) não modificada apresentou bandas características em 3370, 2930, 1628, 1424, 1219, 1040 e 1040 cm^{-1} correspondendo aos modos vibracionais OH, COO⁻ antisimétrico, COO⁻ simétrico, S=O e C-O-C (anel), respectivamente similares aos observados para as ulvanas UF. Adicionalmente o espectro apresentou bandas em torno de 845 cm^{-1} correspondente a vibração da ligação C-O-S na posição axial do sulfato e uma banda de baixa intensidade em 785 cm^{-1} que corresponde a ligação de C-O-S do sulfato em posição equatorial (GARCÍA-MÁRQUEZ et al., 2023; PARADOSSI et al., 1999). A fração GBM obtida após a reação de metacrilatação apresentou novas bandas em 1727 cm^{-1} característica da ligação C=O presente em grupos metacrilato como tem observado para fração UFM e uma banda em 1141 cm^{-1} de característica de ligação C-O entre o grupo metacrilato e a hidroxila presentes no polissacarídeo (MANSUR et al., 2008; MORELLI et al., 2016).

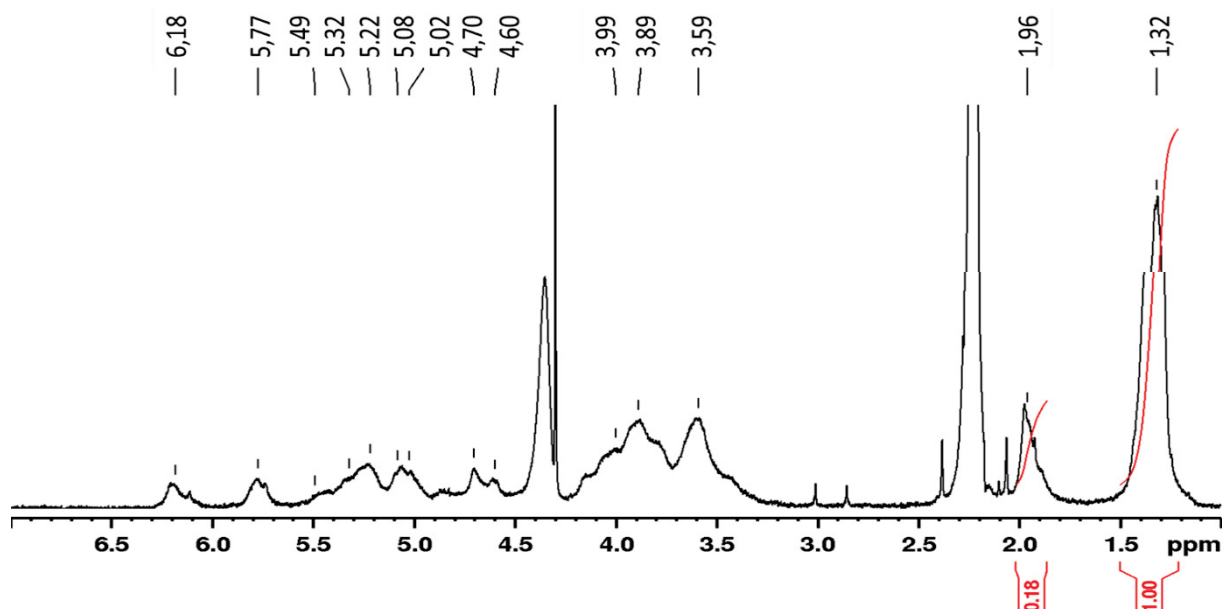
FIGURA 30 – ESPECTRO DE RMN DE ^1H DA FRAÇÃO UFM – REGIÃO DE 7,00 – 1,00 PPM



A adição de grupos metacrilato foi confirmada por análises de RMN de ^1H das frações UFM e GBM. Na região anomérica do espectro de RMN de ^1H da fração UFM (fig. 32) os sinais em 4,82 e 4,64 ppm foram atribuídos a H-1 de unidades de α -L-ramnosep 3-sulfato e ao β -D-ácido glucurônicop, em 4,90 e 4,67 ppm atribuídos a H-1 de unidades de α -L-ramnosep 3-sulfato e β -D-xilosep, em 4,90 e 5,14 ppm foram atribuídos H-1 de unidades de α -L-ramnosep 3-sulfato e ao α -L-ácido idurônicop, unidades estas presentes no fração de origem UF

(CARVALHO et al., 2018; COLODI et al., 2021; COSTE; CALLEJO; FERNÁNDEZ-DÍAZ, 2015; FREITAS et al., 2015; LAHAYE, 1998, 1998; ROBIC et al., 2009b).

FIGURA 31 – ESPECTRO DE RMN DE ^1H DA FRAÇÃO GBM – REGIÃO DE 7,00 – 1,00 PPM



A fração GBM obtida após metacrilção da heteroramnana GB é constituída principalmente de unidades de α -L-ramnose. Na região anomérica espectro da de ^1H da fração GBM (fig. 33) os sinais entre 5,49 e 5,02 ppm foram atribuídos aos hidrogênios anoméricos de unidades de α -L-ramnose. Os sinais em 5,02, e 5,08 ppm foram atribuídas a unidades de α -L-ramnose 3-ligadas e 3-ligadas 4-sulfato, respectivamente, em 5,49 e 5,32 ppm foram atribuídas, respectivamente, a unidades α -L-ramnose 3-ligadas sulfatadas em C-2 e em C-2 e C-4 (MAZEPA et al., 2021)

Adicionalmente dois sinais distintos em 6,18 e 5,77 ppm foram atribuídos a prótons do grupo alceno ($\text{C}=\text{CH}_2$) de metacrilato e o sinal em 1,96 ppm, foi atribuído a grupos metil adjacentes a dupla ligação ($\text{CH}_3\text{-C}=\text{CH}_2$), os quais não estavam presentes nas frações nativas UF e GB. O sinal em 1,32 ppm correspondente aos hidrogênios metílicos (C-6) das unidades de α -L-ramnose presentes nas frações é considerado para definir o grau de metacrilção (DS). Devido à heterogeneidade química das frações UFM e GBM o DS, calculado pela razão entre a intensidade do sinal de 1,96 ppm de metacrilato para a intensidade do sinal de 1,32 ppm de polissacarídeo, pode ser considerado como uma estimativa do valor efetivo, sendo um DS de 0,3 e 0,5 para UFM e GBM, respectivamente, correspondentes ao número de grupos metacrilato por unidades de α -L-ramnose (MORELLI; CHIELLINI, 2010).

4.5 PROPRIEDADES MACROMOLECULARES DAS ULVANAS NATIVAS E DE SEUS PRODUTOS OBTIDOS APÓS A MODIFICAÇÃO QUÍMICA

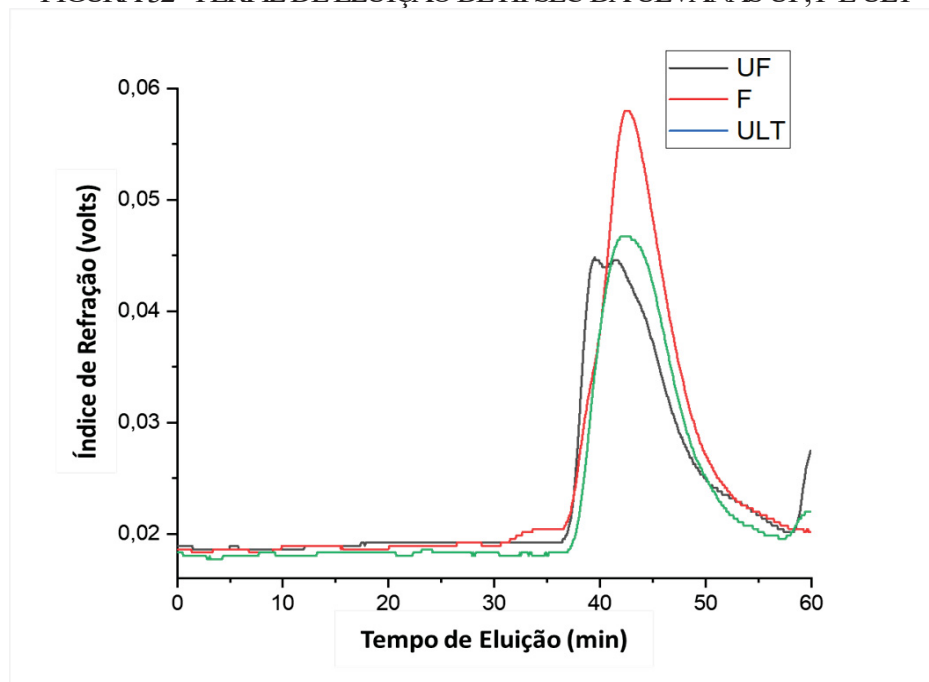
As reações de fosforilação e metacrililação de ulvanas nativas originaram novos biopolímeros, os quais sofreram alteração em sua estrutura pela adição de grupos fosfato e metacrilato. Destaca-se ainda que modificações químicas podem alterar as propriedades físico-químicas de polímeros em solução. Ulvanas nativas e modificadas quimicamente foram avaliadas quanto a sua distribuição da massa molar pela técnica de HPSEC-RI-MALLS. Para tanto, foram utilizadas as ulvanas nativas (F, UF e ULT), modificadas por fosforilação em meio aquoso (1R a 6R e 9R) em meio orgânico (UF-P, UF-P1, UF-P2, UF-P3, XP1, XP2, XP3 e XP4) e metacrilados (UFM e GBM).

4.5.1 Cromatografia de Exclusão por Tamanho de Alto Desempenho (HPSEC)

A determinação da massa molar das ulvanas nativas e de seus produtos modificados quimicamente foi realizada através da técnica de cromatografia de exclusão por tamanho acoplada a um detector de índice de refração e de espalhamento de luz.

Ulvanas nativas UF, F e ULT apresentaram perfil de eluição homogêneo (fig.34), em análises de HPSEC, quando analisadas pelo detector de índice de refração, o que indica que estas frações foram purificadas com sucesso pelo processo de diálise.

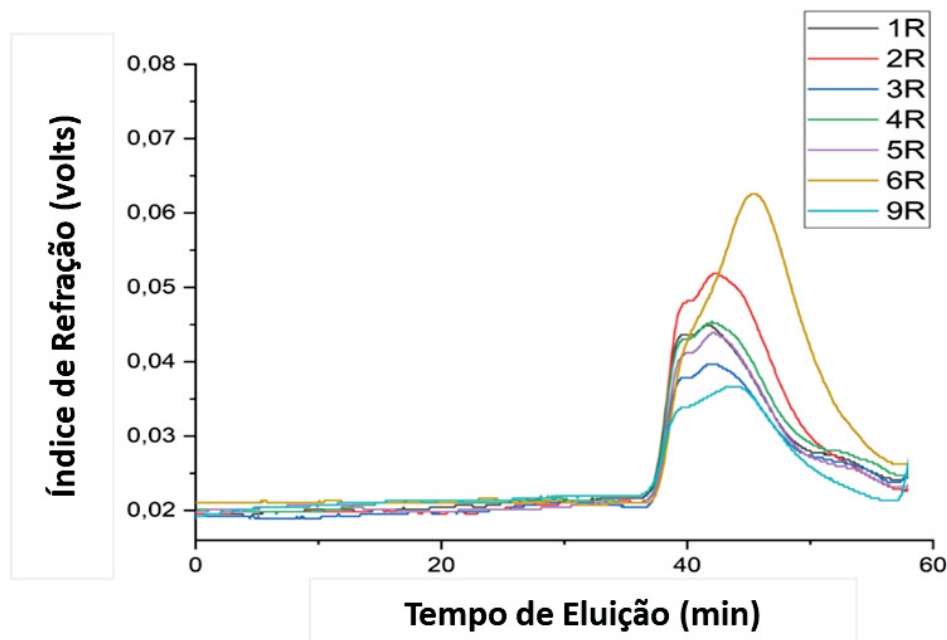
FIGURA 32 - PERFIL DE ELUIÇÃO DE HPSEC DA ULVANAS UF, F E ULT



Foi determinada a massa molar e o dn/dc das ulvanas F e ULT. A ulvana F apresentou uma massa molar de $110,8 \times 10^3 \text{ g.mol}^{-1}$ com um dn/dc de $0,107 \text{ mL.g}^{-1}$ e a ulvana ULT apresentou uma massa molar de $109,7 \times 10^3 \text{ g.mol}^{-1}$ e um dn/dc de $0,118 \text{ mL.g}^{-1}$. Os resultados de massa molar e dn/dc estar de acordo com os apresentados na literatura para ulvanas (BARAKAT et al., 2022a; CARVALHO et al., 2018).

Foram ainda realizadas análises de HPSEC as frações 1R a 6R e 9R (tabela 7) obtidas após a fosforilação química em meio aquoso. Foi possível observar que frações 1R a 5R e 9R apresentaram um padrão de eluição similar (fig. 32), sugerindo que as mudanças de temperatura e pH não alteram significativamente a massa molar entre as frações.

FIGURA 33 - PERFIL DE ELUIÇÃO DE HPSEC COM DETECTOR DE ÍNDICE DE DERIVADOS FOSFORILADOS EM MEIO AQUOSO



A análise de HPSEC da fração 6R (fig. 35) apresentou perfil de eluição homogêneo quando analisada pelo detector de índice de refração. Quando comparada a fração de origem UF foi observado um deslocamento no pico após a reação de 40,4 min para 45,5 min indicando uma redução na massa molar após a reação de fosforilação pode estar relacionada com a redução nos teores de carboidratos totais.

As frações fosforiladas em meio orgânico (UF-P, UF-P1, UF-P2, UF-P3, XP1, XP2, XP3 e XP4) apresentaram perfis de eluição diferentes entre si (fig. 36). As frações UF-P a P3 apresentaram um perfil homogêneo após a fosforilação química, havendo apenas uma pequena diferença entre as frações. Para XP1 a XP4 foi observada uma similaridade entre as frações XP1 a XP3 as quais apresentaram perfil homogêneo enquanto a fração XP4 apresentou um

perfil heterogêneo apresentando 2 picos, um coincidente com as demais frações em 57 min e outro próxima 43 min o que indica que essa fração apresentou uma menor degradação.

FIGURA 34 - PERFIL DE ELUIÇÃO DE HPSEC DA FRAÇÕES OBTIDAS APÓS A FOSFORILAÇÃO QUÍMICA EM MEIO ORGÂNICO

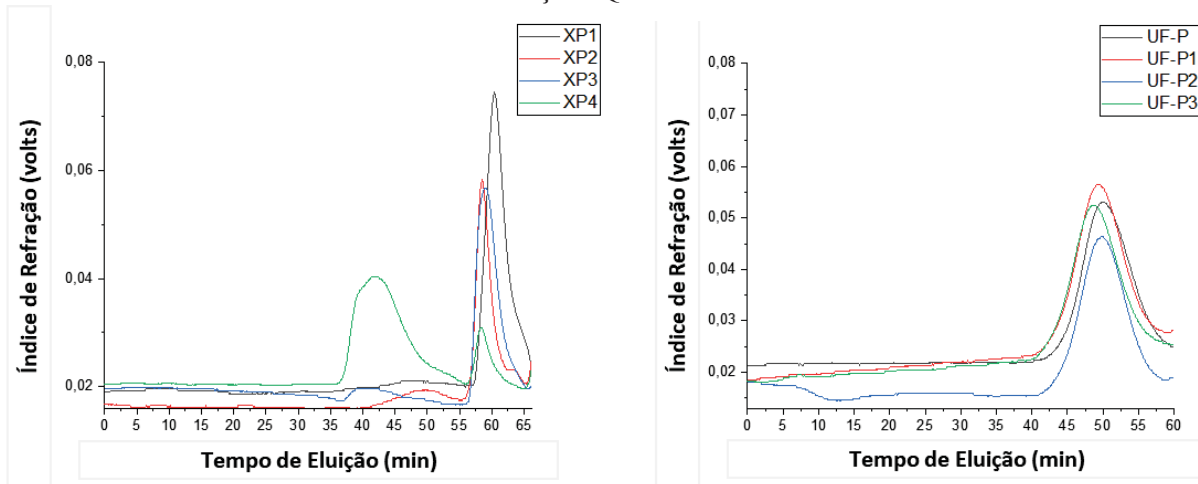
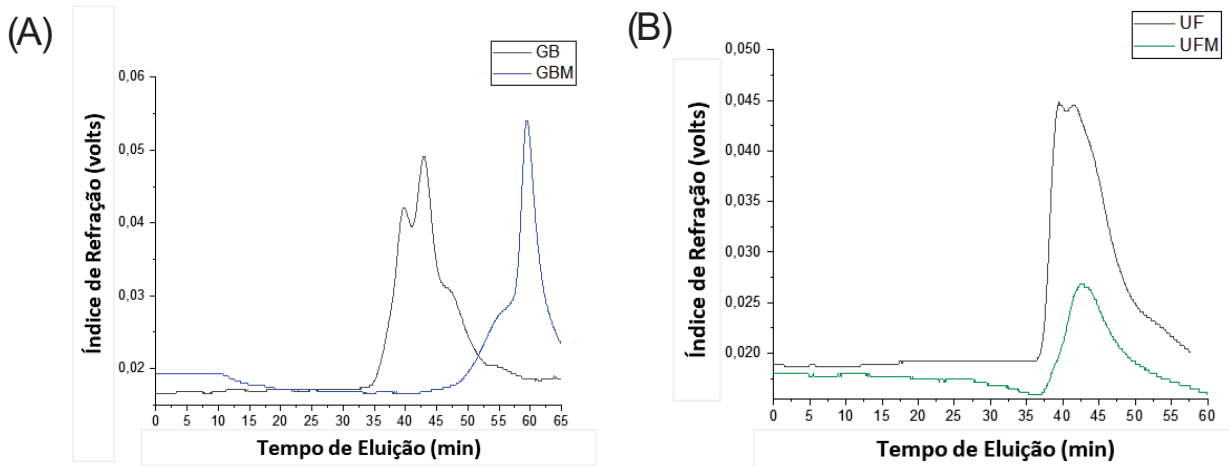


FIGURA 35 - PERFIL DE ELUIÇÃO DE HPSEC DA FRAÇÕES GB e GBM (A) UF e UFM (B)



As frações metacriladas foram avaliadas por HPSEC (fig. 34). fração GB (heteroramnana obtida de *Gayralia brasiliensis*) apresentou um perfil heterogêneo apresentando 2 picos principais. O produto da metacrilção de GB (GBM) apresentou perfil homogêneo com uma redução significativa da massa molar. A ulvana metacriladas UFM apresentou um perfil homogêneo após a metacrilção com, havendo apenas uma pequena diferença de tempo de eluição de 40,4 min. para UF e de 42,2 min. para UFM. Deste modo podemos concluir que heteroramnanas são mais suscetíveis a redução da massa molar que ulvanas após a metacrilção.

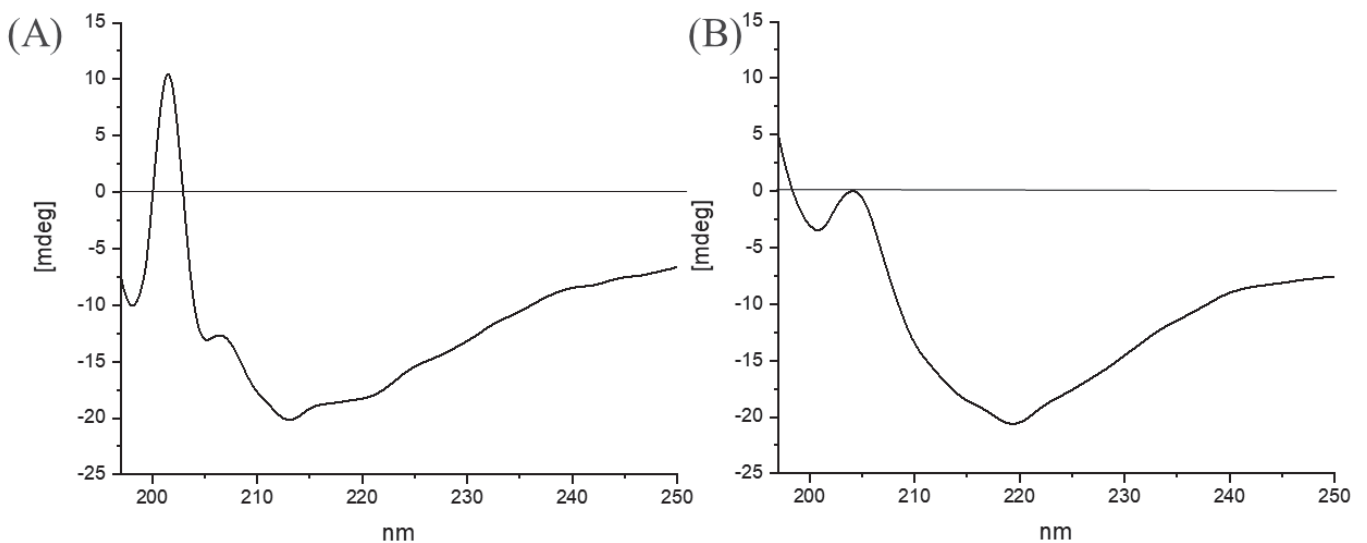
4.6 DICROISMO CIRCULAR

Os grupos fosfato, sulfato e carboxila são responsáveis por conferir um caráter aniônico aos polissacarídeos e essa característica tem sido associada à atividade anticoagulante dessas biomoléculas. Portanto, a presença desses grupos nos polissacarídeos pode ser fundamental para sua interação com as proteínas envolvidas na cascata de coagulação (CIANCIA et al., 2010; CARVALHO et al., 2020).

Vale ressaltar que essa interação não é unicamente determinada pela composição química do polissacarídeo, mas também depende da sua conformação na solução. Observa-se que transições de conformação, passando de uma configuração aleatória para uma ordenada, possibilitam um posicionamento adequado dos grupos com cargas negativas no sítio de ligação da proteína, o que favorece a interação de maneira mais eficiente (HAQUE et al., 2022; MARIA; MURAKAMI, 2016; ZHAO; WANG; ZHAO, 2023).

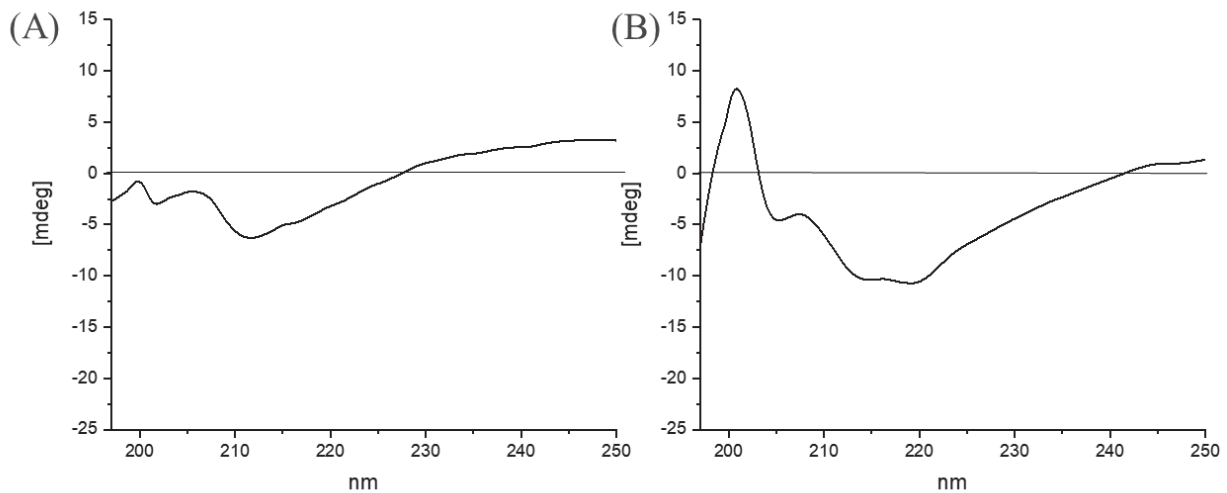
A técnica de dicroísmo circular (CD) foi utilizada com o objetivo de fornecer informações referentes a conformação das frações nativas (UF e UF), fosforilada em meio aquoso (6R e 9R) meio orgânico (UF-P, UF-P1, UF-P2, UF-P3, XP1, XP2, XP3 e XP4) e metacriladas (GBMe UFM) na temperatura de 37°C, sendo esta condição, a utilizada nos testes de atividade anticoagulante.

FIGURA 36 - ESPECTRO DE VARREDURA DE DICROISMO CIRCULAR (197 A 250 NM) DA FRAÇÃO UF (A) E F (B)



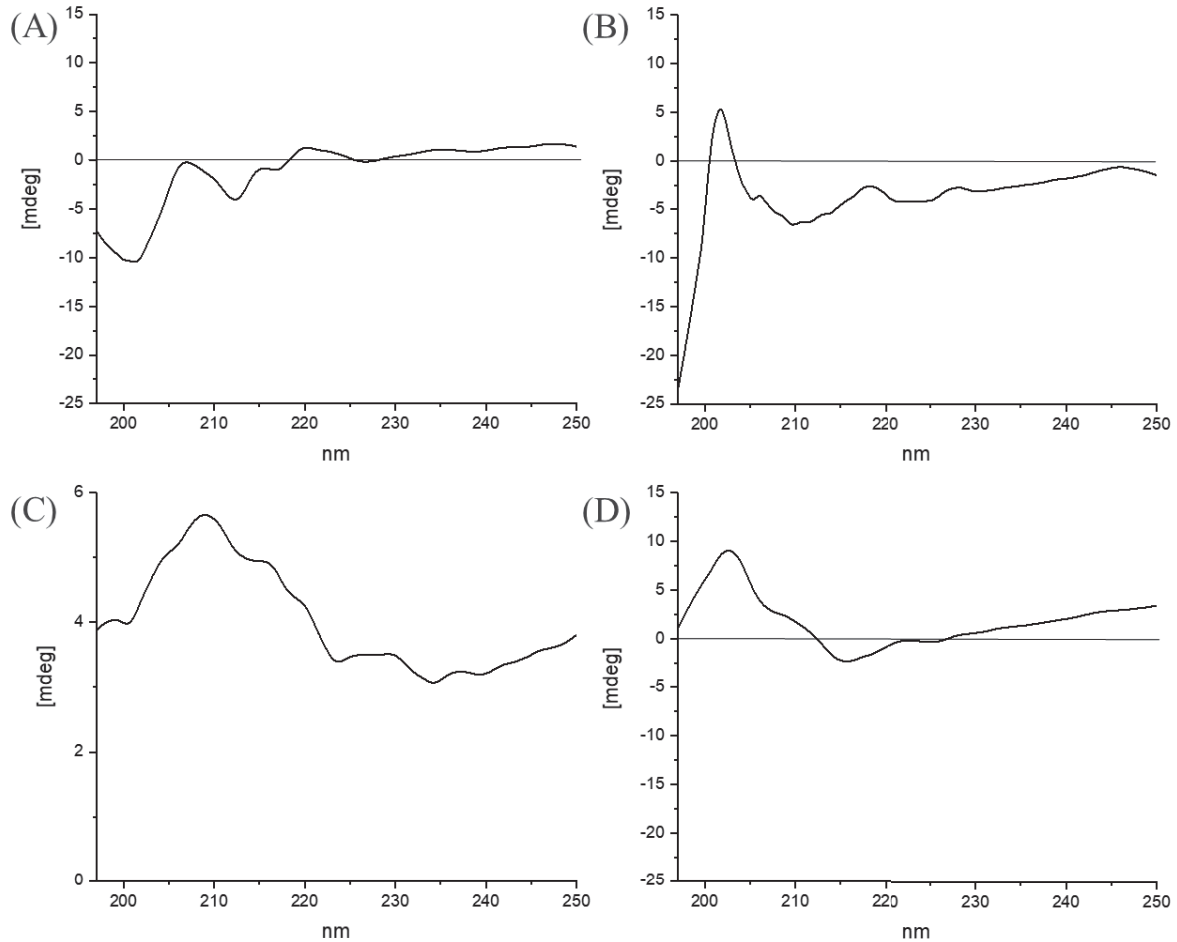
A fração UF (fig. 38) exibiu um padrão dicróico com bandas positivas e negativas posicionadas em 201 e 213 nm, respectivamente (ponto de inversão em 203 nm), apresentando uma conformação helicoidal característica. Para a fração F (fig. 38(B)) tem-se um padrão dicróico distinto com banda negativa em 220 nm, entretanto em 204 nm é possível observar uma banda que se projeta para a área positiva do gráfico, o que indica uma possível transição entre uma estrutura aleatória para a estrutura helicoidal. A presença dessas estruturas é relatada na literatura para ulvanas obtidas de *Ulva fasciata* (CARVALHO, et al. 2020) e *Ulva rigida* (PARADOSSI, et al. 1999).

FIGURA 37 - ESPECTRO DE VARREDURA DE DICROISMO CIRCULAR (197 A 250 NM) DA FRAÇÃO 6R (A) E 9R (B), OBTIDAS APÓS FOSFORILAÇÃO



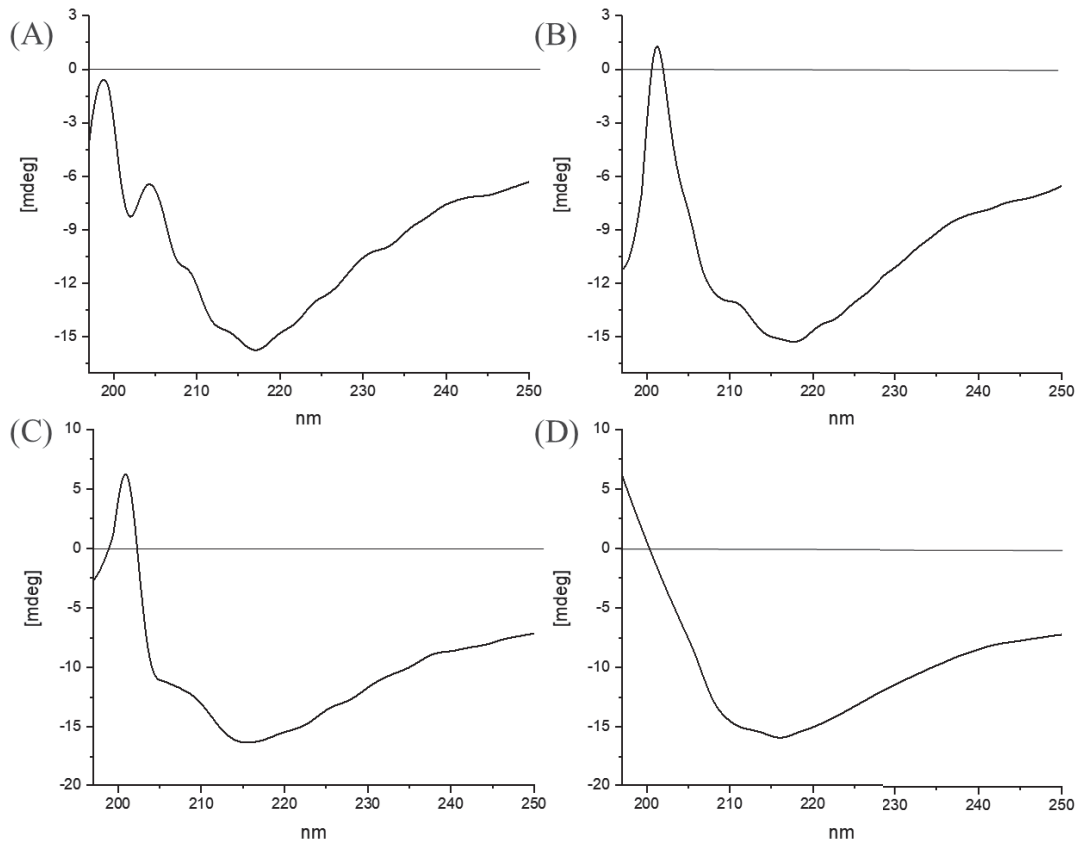
Após a fosforilação química em meio aquoso as frações 6R e 9R foram submetidas a análises de varredura de dicróismo circular (CD). A fração 6R (fig. 39(A)) apresentou padrão dicróico com uma banda negativa em 211 nm (ponto de inversão 227 nm) sendo esse um comportamento típico de uma estrutura aleatória. De modo diferente a fração 9R (fig. 39(B)) apresentou um padrão dicróico com bandas positivas e negativas 200 nm e 219 nm (ponto de inversão 203 nm), apresentando assim uma estrutura helicoidal similar a apresentada para a fração de origem UF. Esse resultado sugere que as condições de reação utilizadas para obtenção da fração da 9R (STMP:STPP – 30 °C – pH 7 – 6 horas) ocasionou uma pequena ou nenhuma alteração na estrutura secundária da ulvana de origem enquanto para a fração 6R (STMP:STPP – 100 °C – pH 7 – 7 horas) as condições reacionais ocasionaram uma mudança significativa na estrutura secundária após a fosforilação química em meio aquoso.

FIGURA 38 - ESPECTRO DE VARREDURA DE DICROISMO CIRCULAR (197 A 250 NM) DA FRAÇÃO XP1 (A), XP2 (B), XP3 (C) E XP4 (D), OBTIDAS APÓS FOSFORILAÇÃO



As frações XP1, XP2, XP3 e XP4 (fig. 40) foram submetidas a análises de varredura de dicroísmo circular. As frações XP1 e XP3 foram submetidas a fosforilação química utilizando o agente fosforilante (STPP). A fração XP1 apresentou uma banda positiva em 220 nm (ponto de inversão 218 nm) e duas bandas negativas em 212 e 201 nm sendo esse um comportamento típico de uma estrutura aleatória, já para a fração XP3 houve uma perda completa na estrutura secundária indicada pela curva apresentar somente valores positivos em toda a extensão do espectro. As frações XP2 e XP4 submetidas a fosforilação química utilizando o agente fosforilante (STMP) apresentaram bandas positivas em 201 e 202 nm, bandas negativas em 210 e 215 nm (ponto de inversão 203 e 212 nm), respectivamente indicando uma estrutura helicoidal em ambos, porém, apresentando uma intensidade menor nas bandas apresentando uma diminuição de hélices em sua estrutura, quando comparadas a fração de origem.

FIGURA 39 - ESPECTRO DE VARREDURA DE DICROISMO CIRCULAR (197 A 250 NM) DA FRAÇÃO UF-P (A), UF-P1 (B), UF-P2 (C) E UF-P3 (D), OBTIDAS APÓS FOSFORILAÇÃO



Após a fosforilação química as frações UF-P, UF-P1, UF-P2, UF-P3 (fig. 38) foram submetidas a análises de varredura de dicróismo circular. Todas as frações submetidas a fosforilação com agente fosforilante ácido fosfórico apresentaram como característica em comum, uma banda acentuada na região entre 240 e 200 nm causada pela absorção do grupo carboxílico, com uma banda negativa centrada na região próxima a 215 nm. Estes resultados sugerem a permanência desses grupos na estrutura, o que também é observado na fração nativa antes da modificação, ou seja, mesmo com as diferentes concentrações do agente fosforilante são mantidas as unidades com grupos carboxila. Adicionalmente as frações UF-P1 e UF-P2 apresentaram uma banda positiva em 201 nm (ponto de inversão 202 nm) sendo essa uma característica de uma estrutura secundária helicoidal, entretanto com uma menor intensidade que a fração de origem, o que pode indicar a presença dessas estruturas na cadeia após a fosforilação química em menor quantidade.

FIGURA 41 - ESPECTRO DE VARREDURA DE DICROISMO CIRCULAR (197 A 250 NM) DA FRAÇÃO UF (A), UFM (B), OBTIDAS APÓS MODIFICAÇÃO QUÍMICA

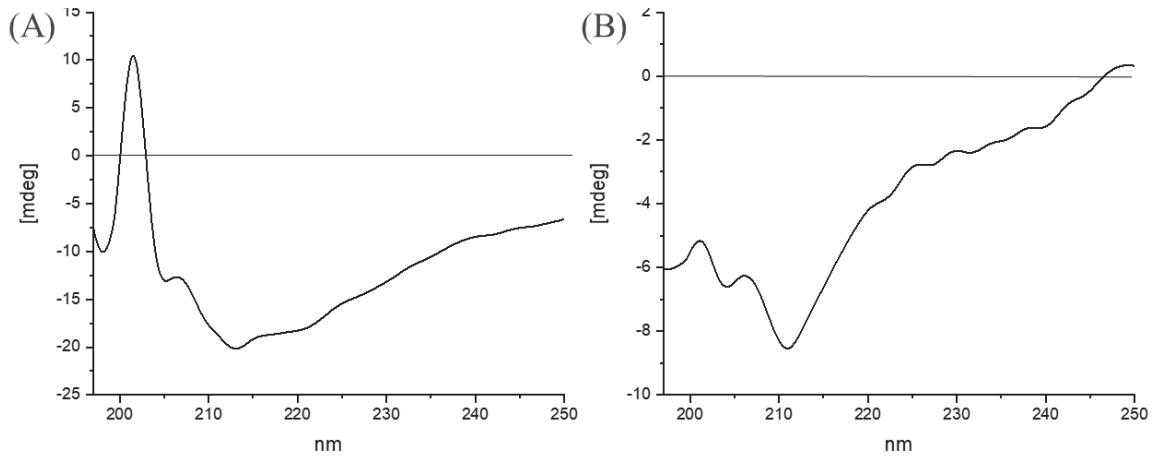
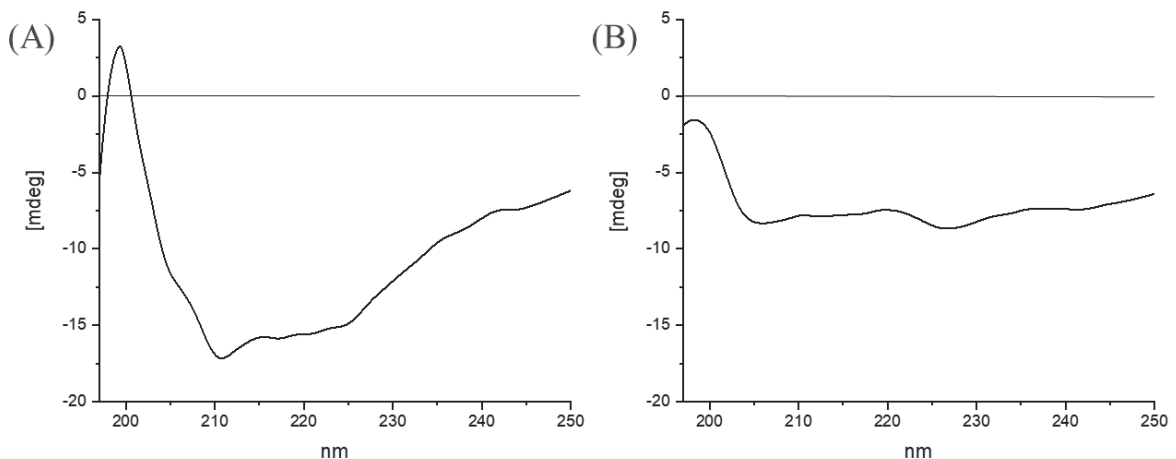


FIGURA 40 - ESPECTRO DE VARREDURA DE DICROISMO CIRCULAR (197 A 250 NM) DA FRAÇÃO GB (A), GBM (B), OBTIDAS APÓS MODIFICAÇÃO QUÍMICA



Adicionalmente foi realizada a análise de varredura de CD para as frações utilizadas para obtenção de produtos metacrilados. A fração UF (fig. 39) exibiu um padrão dicróico com bandas positivas e negativas posicionadas em 201 e 213 nm, respectivamente (ponto de inversão em 203 nm), apresentando uma conformação helicoidal característica, para a fração UFM obtida por metacrilção uma banda negativa em 210 nm indicando uma mudança para conformação aleatória. A fração GB (fig. 40) obtida de *Gayralia brasiliensis* exibiu um padrão dicróico com bandas positivas e negativas posicionadas em 199 e 210 nm, respectivamente (ponto de inversão em 200 nm), apresentando uma conformação helicoidal característica, já a fração GBM obtida após a metacrilção apresentou toda extensão da varredura na região negativa do espectro indicando uma estrutura com conformação aleatória (CARVALHO et al., 2018; PARADOSSI et al., 1999).

4.7 ATIVIDADE ANTICOAGULANTE DE ULVANAS E SEUS PRODUTOS MODIFICADOS QUIMICAMENTE

A ação anticoagulante das frações de ulvanas UF, F e ULT e de seus derivados quimicamente modificados por fosforilação e metacrililação foram avaliadas por meio dos testes de coagulação aPTT (Tempo de ativação parcial da tromboplastina) e PT (Tempo de protrombina).

4.7.1 Teste de tempo de tromboplastina parcial ativada (aPTT)

O teste do aPTT foi realizado para as frações UF, F, ULT, 6R, 9R, UF-P, UF-P1, UF-P2, UF-P3, UFM, GB e GBM. As frações PC-UF (fração carboxireduzida e fosforilada) e PD-UF (fração dessulfata e fosforilada) as quais foram carboxireduzida e dessulfatada com o objetivo de avaliar a influência da fosforilação química diante da ausência dos grupos aniônicos carboxila e sulfato.

Com este ensaio é possível avaliar *in vitro* a via intrínseca da cascata de coagulação através de um substituto plaquetário (cefalina) e de um ativador do FXI (cloreto de cálcio) e um fator de contato (caulim ou sílica). Para a avaliação da atividade anticoagulante foram utilizadas concentrações crescentes das frações citadas ($10 - 200 \mu\text{g.mL}^{-1}$), como controle positivo (valores normais de coagulação) e negativo de coagulação, a salina e a heparina (10 mg.mL^{-1} , $>300 \text{ s}$), respectivamente. Os resultados dos ensaios foram expressos como médias APTT (s) \pm desvio padrão da média (DPM) e estão listados na tabela 11.

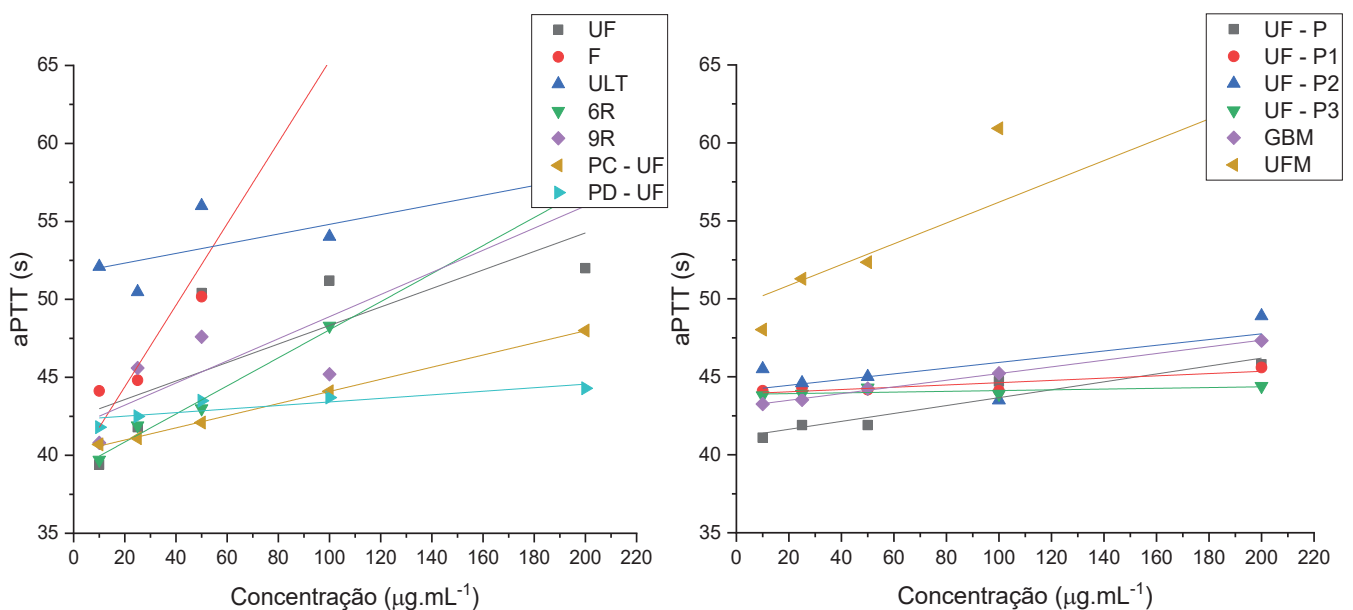
A fim de aprofundar a compreensão da relação entre a modificação química e as alterações da atividade anticoagulante da fração UF e seus produtos modificados em comparação à heparina. A fração UF e seus produtos modificadas demonstraram-se atividade menor que a apresentada pela heparina. Através do gráfico de aPTT podem ser observadas as variações nos tempos de coagulação em relação às concentrações, além de confirmar a diferença entre a atividade da heparina e das frações, mas também é possível compreender melhor a ação das frações na via intrínseca da cascata de coagulação em diferentes concentrações testadas. Quando comparada a heparina as frações testadas apresentaram uma baixa atividade anticoagulante. A partir dos resultados de testes aPTT em função da concentração, é então traçada uma linha de tendência linear para todas as frações analisadas.

TABELA 12 - TESTE DE APTT DE ULVANAS UF, F E ULT E SEUS PRODUTOS MODIFICADOS

Fração	Polissacarídeo ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)				
	10	20	50	100	200
UF	$39,4 \pm 0,3$	$41,8 \pm 0,4$	$50,4 \pm 0,4$	$51,2 \pm 0,5$	$52,0 \pm 0,9$
F	$44,1 \pm 0,8$	$44,8 \pm 0,7$	$50,2 \pm 0,4$	$65,5 \pm 0,5$	$91,8 \pm 2,2$
ULT	$52,1 \pm 1,0$	$50,5 \pm 1,4$	$56,0 \pm 2,0$	$54,0 \pm 0,6$	$57,9 \pm 3,2$
6R	$39,7 \pm 0,4$	$41,9 \pm 0,1$	$43,0 \pm 1,0$	$48,3 \pm 0,7$	$57,0 \pm 1,1$
9R	$40,8 \pm 0,8$	$45,6 \pm 0,6$	$47,6 \pm 0,3$	$45,2 \pm 0,3$	$57,1 \pm 1,6$
PC-UF	$40,7 \pm 0,7$	$41,1 \pm 1,8$	$42,1 \pm 0,9$	$44,1 \pm 1,3$	$48,0 \pm 1,9$
PD-UF	$41,8 \pm 1,3$	$42,5 \pm 1,6$	$43,5 \pm 1,1$	$43,7 \pm 0,8$	$44,3 \pm 0,8$
UF-P	$42,9 \pm 0,1$	$42,3 \pm 0,4$	$41,8 \pm 0,3$	$43,5 \pm 0,6$	$45,4 \pm 1,3$
UF-P1	$44,1 \pm 1,0$	$44,3 \pm 0,5$	$44,2 \pm 0,3$	$44,1 \pm 0,3$	$45,6 \pm 2,0$
UF-P2	$45,5 \pm 0,5$	$44,6 \pm 1,8$	$45,0 \pm 2,1$	$46,6 \pm 0,2$	$48,9 \pm 0,9$
UF-P3	$43,8 \pm 0,6$	$43,9 \pm 0,3$	$44,3 \pm 0,8$	$43,9 \pm 0,9$	$44,4 \pm 0,6$
UFM	$48,0 \pm 2,3$	$51,3 \pm 0,9$	$52,4 \pm 0,7$	$60,9 \pm 0,5$	$60,7 \pm 0,9$
GB	$60,4 \pm 0,3$	$83,5 \pm 0,4$	$174,7 \pm 0,4$	>300	>300
GBM	$43,3 \pm 0,8$	$43,5 \pm 0,8$	$44,3 \pm 1,1$	$45,2 \pm 0,7$	$47,3 \pm 1,6$
HEPARINA	>300	-	-	-	-

Nota: Resultados expressos em tempo médio (s) \pm SEM. Salina ($39,9 \pm 0,7$ s) como controle positivo de coagulação.

FIGURA 42 - GRÁFICO DE APTT EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ULVANAS UF, F E ULT E SEUS PRODUTOS MODIFICADOS



A partir destas curvas de aPTT (fig. 41) foi calculada a equação da reta referente a ação anticoagulante das frações na via intrínseca para cada uma das frações, com o objetivo de comparar a atividade anticoagulante entre as frações. As equações da reta estão representadas na tabela 11. A partir destas equações foi possível calcular a concentração necessária para que o polissacarídeo dobre o tempo de coagulação em relação à salina (CN2aPTT) (Tabela 13), esse dado representa a potência do fármaco, quanto mais baixo for o valor, mais intensa é a capacidade de ação do polissacarídeo testado.

TABELA 13 - EQUAÇÃO DA RETA, CN2APTT E $\Delta T.MG^{-1}$ DE ULVANAS UF, F E ULT E SEUS PRODUTOS MODIFICADOS

Fração	Equação da reta	CN2APTT ($\mu g.mL^{-1}$)	$\Delta T.\mu g^{-1}$ de polissacarídeo (s)
UF	$y = 0,0593x + 42,417$ $R^2 = 0,5951$	633,8	0,06
F	$y = 0,2583x + 39,653$ $R^2 = 0,89941$	156,2	0,26
ULT	$y = 0,0311x + 51,731$ $R^2 = 0,6697$	909,0	0,03
6R	$y = 0,0899x + 39,077$ $R^2 = 0,9959$	455,2	0,09
9R	$y = 0,0747x + 41,907$ $R^2 = 0,8303$	509,9	0,07
PC-UF	$y = 0,0436x + 39,435$ $R^2 = 0,9632$	930,4	0,04
PD-UF	$y = 0,0231x + 40,587$ $R^2 = 0,6007$	1706,2	0,02
UF-P	$y = 0,025x + 41,178$ $R^2 = 0,903$	1552,9	0,025
UF-P1	$y = 0,008x + 43,788$ $R^2 = 0,7889$	4526,5	0,008
UF-P2	$y = 0,0208x + 44,545$ $R^2 = 0,909$	1704,6	0,021
UF-P3	$y = 0,0027x + 43,908$ $R^2 = 0,6528$	13367,4	0,0027
GB	$y = 2,8996x + 28,877$ $R^2 = 0,9989$	17,8	2,9
GBM	$y = 0,0212x + 43,105$ $R^2 = 0,9975$	1740,3	0,021
UFM	$y = 0,1288x + 50,029$ $R^2 = 0,7896$	232,7	0,12
Heparina	$y = 9,096x + 24,79$ $R^2 = 0,7896$	2,0	9,09

A partir do coeficiente angular da equação da reta é possível determinar a variação no tempo de aPTT (ΔT) que é provocada pela adição de $1,0 \mu g.mL^{-1}$ de polissacarídeo. As frações UF, F e ULT apresentaram ΔT de 0,06, 0,26 e 0,03, respectivamente a fração F apresentou atividade a partir de $156,2 \mu g.mL^{-1}$, já as frações UF e ULT apresentaram atividade a partir de $633,8$ e $909,0 \mu g.mL^{-1}$. Com relação atividade obteve-se a seguinte ordem para as frações de ulvanas que $F > UF > ULT$.

A adição dos grupos fosfato ocasionou uma pequena alteração no ΔT de 0,06 s da fração UF para 0,09 e 0,07 s para as frações modificadas 6R e 9R respectivamente. Para os produtos modificados quimicamente PC-UF e PD-UF o ΔT foi de 0,04 e 0,02 s respectivamente.

No ensaio de aPTT as frações de ulvanas e seus produtos modificados quimicamente apresentam baixa atividade anticoagulante quando comparadas a heparina com atividade que apresenta atividade inicial a partir de 2,0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. A fração UF desempenhada atividade anticoagulante a partir de 633,8 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de 455,2 e 509,9 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para as produtos modificados 6R e 9R, respectivamente. Para as frações PC-UF e PD-UF foi de 930,4 e 1706,2 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectivamente. Para as frações modificadas fosforiladas quimicamente em meio aquoso a obteve-se a seguinte ordem 6R>9R>PC-UF>PD-UF.

Deste modo os resultados indicam que a adição de grupos fosfato não é suficiente para reverter a redução da atividade anticoagulante ocasionada pela conversão de unidades de ácidos urônicos em seus correspondentes monossacarídeos neutros (PC-UF) ou pelo processo de dessulfatação química (PD-UF). Assim podemos concluir que a presença de grupos sulfato, carboxila e fosfato potencializaram a atividade anticoagulante das frações 6R e 9R.

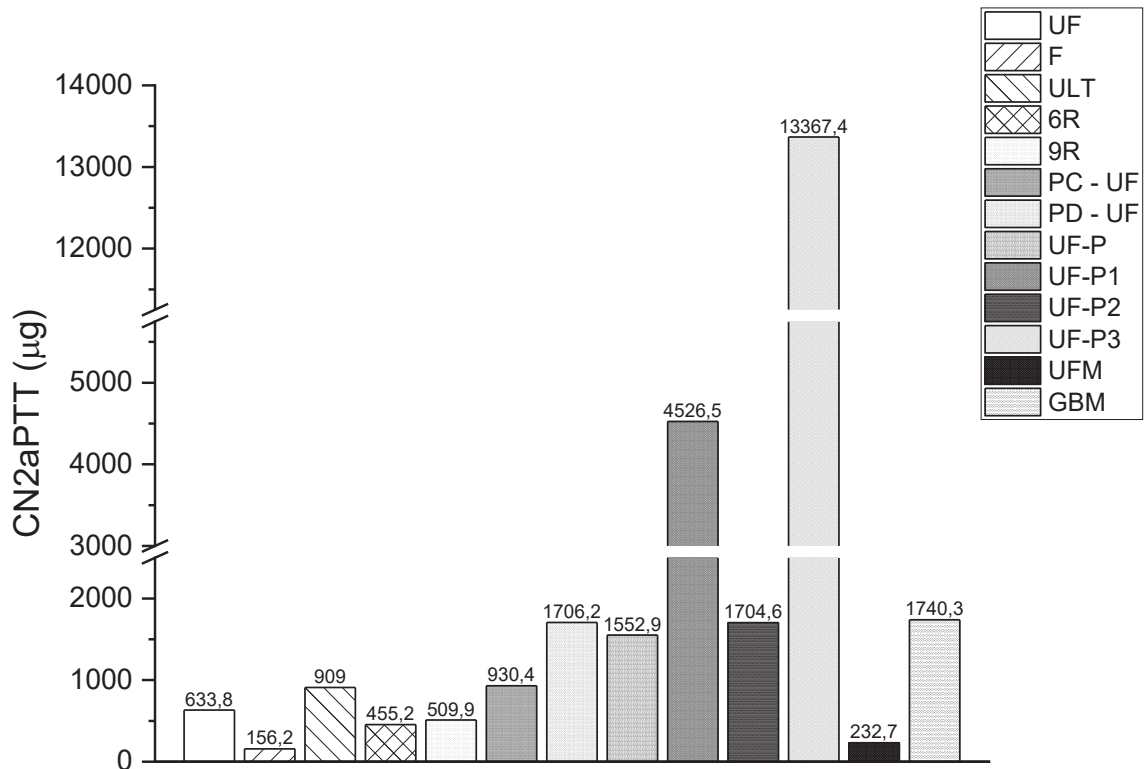
Adicionalmente as frações UF-P, UF-P1, UF-P2 e UF-P3 apresentaram valores de CN₂aPTT variando de 1552,9 a 13367,4 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, com um coeficiente de angular (ΔT) entre 0,0027 a 0,025 s para a fração com maior e menor atividade. Os valores encontrados para essas frações são menores que os encontrados para frações fosforiladas em meio aquoso, sendo que a fração que apresentou a menor atividade foi a fração UF-P3, as frações apresentaram a seguinte ordem de atividade UF-P>UF-P2>UF-P1>UF-P3, as frações fosforiladas quimicamente em meio orgânico apresentam atividade menor que a fração PD-UF. Essa perda de atividade pode ser atribuída a redução de grupos sulfato que ficou evidenciada na redução de até 50 % nos teores encontrados nas dosagens de sulfato.

As frações UFM e GBM obtidas através da reação de metacrilção tiveram sua atividade anticoagulante avaliada. A fração UFM foi obtida através da metacrilção da fração UF. Após a metacrilção essa fração apresentou um ΔT de 0,12 s e sua atividade tem início a partir de 232,7 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, esses valores são 63,3% maiores que a fração de origem indicando uma melhora na atividade anticoagulante devido a adição de grupos metacrilato.

Para a fração GBM obtida pela metacrilção da fração GB (extraída de *Gayralia brasiliensis*), apresentando de ΔT de 0,0021 s, sua atividade tem início a partir de 1740,3 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ esse valor é 98,9 % menor do que o encontrado na fração de origem GB (ΔT de 2,9 s e atividade inicial de 17,8 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Quando comparada a fração GB a fração GBM apresenta

uma perda da atividade anticoagulante, o que pode estar relacionada com a redução da massa molar observada nas análises de HPSEC.

FIGURA 43 - GRÁFICO DE CN2aPTT DE ULVANAS UF, F E ULT E SEUS PRODUTOS MODIFICADOS



Os valores de CN2aPTT (fig. 42) para ulvanas fosforiladas quimicamente 6R e 9R, foram de 28,2 % e 19,5 % menores que a observada para ulvana UF. As frações 6R e 9R, contem 1,3% e 1,1% de grupos fosfato respectivamente e apresentaram e uma maior atividade que a ulvana UF quando avaliados os valores de CN2aPTT (455,2 e 509,9 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Já as frações as ulvanas fosforiladas UF-P, UF-P1, UF-P2 e UF-P3 apresentaram uma baixa atividade anticoagulante com valores de atividade de 3 a 21 vezes menor que a fração UF. Uma das possibilidades para a perda da atividade está relacionada com a redução da massa molar ocasionado pela ação agente fosforilante utilizado, promovendo a perda de unidades que apresentam grupos com sulfato e carboxila na sua estrutura

As frações UFM e GBM tiveram um comportamento distinto entre si, uma das possibilidades dessa mudança ocorre pela alteração da massa molar da fração GBM em relação a fração de origem GB, enquanto para a fração UFM isso não ocorre. Outro fato que pode ter ocasionado um aumento na atividade anticoagulante da fração UFM nas análises de aPTT, é o fato que a inserção de adição de um grupo apolar, metacrilato, ocasionou uma maior exposição dos grupos carregados como sulfato e carboxila as proteínas presentes na cascata de coagulação.

4.7.2 Teste de tempo de trombina (PT)

O teste de PT é usado para avaliar a via extrínseca da cascata de coagulação. Para este ensaio, UF, F, ULT, 6R, 9R, UF-P, UF-P1, UF-P2, UF-P3, UFM, GB e GBM. Assim como para o teste de aPTT as frações PC-UF (fração carboxireduzida e fosforilada) e PD-UF (fração dessulfata e fosforilada) com o objetivo de avaliar a influência da fosforilação química diante da ausência dos grupos aniônicos carboxila e sulfato, respectivamente. Para a avaliação da atividade anticoagulante foram utilizadas concentrações crescentes das frações citadas (10 - 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Como controle positivo (valores normais de coagulação) e negativo de coagulação foram utilizadas a salina e a heparina (20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), respectivamente. Os resultados dos ensaios foram expressos como médias PT (s) \pm DPM estão listados na tabela 14.

TABELA 14 - TESTE DE PT DAS ULVANAS UF, F E ULT E SEUS PRODUTOS MODIFICADOS

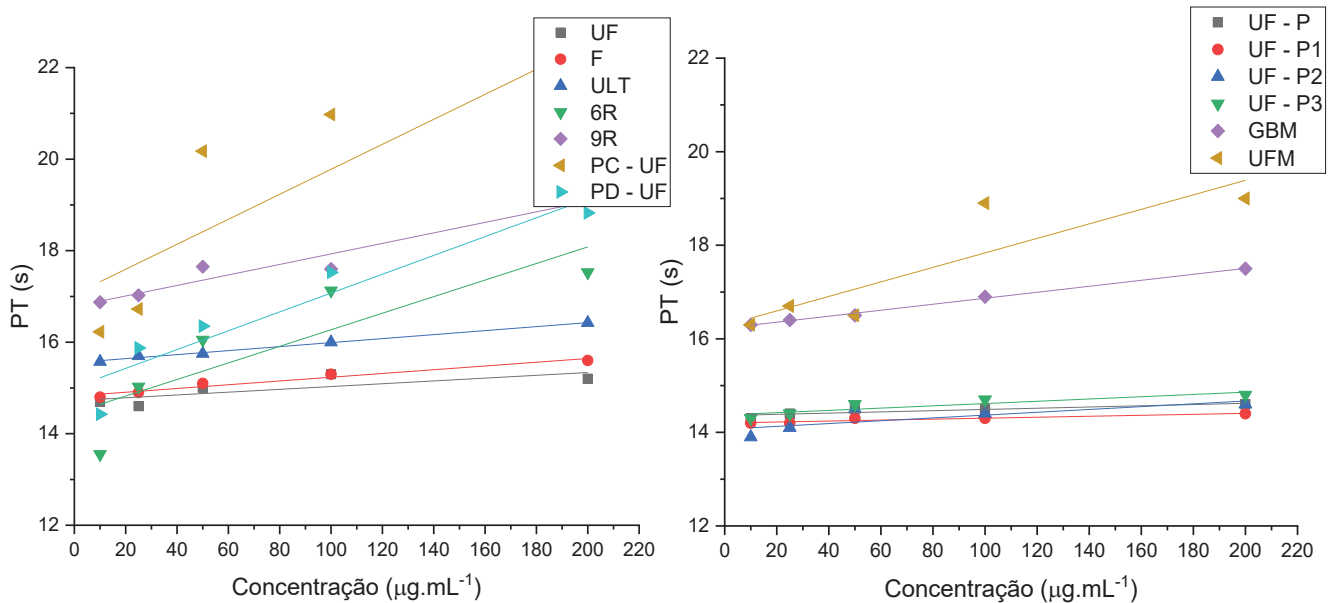
Fração	Polissacarídeo ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)				
	10	20	50	100	200
UF	14,7 \pm 0,5	14,6 \pm 0,4	15,0 \pm 0,4	15,3 \pm 0,5	15,2 \pm 0,4
F	14,8 \pm 0,8	14,9 \pm 0,7	15,1 \pm 0,4	15,3 \pm 0,5	15,6 \pm 0,3
ULT	15,6 \pm 0,3	15,7 \pm 0,4	15,8 \pm 0,3	16,0 \pm 0,6	16,4 \pm 0,2
6R	13,6 \pm 0,6	15,0 \pm 0,8	16,1 \pm 0,3	17,1 \pm 1,0	17,5 \pm 0,7
9R	16,9 \pm 0,7	17,0 \pm 0,5	17,7 \pm 0,5	17,6 \pm 1,4	19,2 \pm 0,6
PC-UF	16,2 \pm 0,7	16,7 \pm 1,8	20,2 \pm 0,4	21,0 \pm 0,3	21,7 \pm 0,4
PD-UF	14,5 \pm 0,5	15,9 \pm 0,4	16,4 \pm 0,3	17,5 \pm 0,8	18,8 \pm 0,8
UF-P	14,3 \pm 0,2	14,4 \pm 0,4	14,5 \pm 0,1	14,5 \pm 0,6	14,6 \pm 0,3
UF-P1	14,2 \pm 0,2	14,2 \pm 0,5	14,3 \pm 0,6	14,3 \pm 0,3	14,4 \pm 0,1
UF-P2	13,9 \pm 0,1	14,1 \pm 0,3	14,5 \pm 0,1	14,4 \pm 0,2	14,6 \pm 0,3
UF-P3	14,3 \pm 0,2	14,4 \pm 0,3	14,6 \pm 0,4	14,7 \pm 0,9	14,8 \pm 0,1
UFM	16,3 \pm 2,3	16,7 \pm 0,9	16,5 \pm 0,7	18,9 \pm 0,5	19,0 \pm 0,9
GB	14,2 \pm 0,2	14,3 \pm 0,6	17,7 \pm 1,0	29,9 \pm 2,1	42,8 \pm 2,0
GBM	16,3 \pm 0,8	16,4 \pm 0,8	16,5 \pm 1,1	16,9 \pm 0,7	17,5 \pm 1,6
HEPARINA	18,2 \pm 1,1	77,4 \pm 2,9	>150	-	-

Nota: Resultados expressos em tempo médio (s) \pm SEM. Salina (14,5 \pm 0,4 s) como controle positivo de coagulação.

Na análise de tempo de trombina (PT) da fração UF e seus produtos modificadas mostrou que essas frações apresentaram uma atividade menor que a apresentada pela heparina. No gráfico da figura 43 estão apresentados os resultados PT da relação das variações nos tempos

de coagulação em relação às concentrações, a partir desses dados é possível traçar uma reta e estimar os valores de CN2PT para cada uma das frações. Ainda é possível confirmar a diferença entre a atividade da heparina e das frações analisadas, possibilitando uma melhor compreensão da ação das frações na via extrínseca da cascata de coagulação nas diferentes concentrações testadas. Quando comparada a heparina as frações testadas apresentaram atividade anticoagulante muito baixa, entretanto com esses dados pode-se observar a diferença de ação entre as frações analisadas.

FIGURA 44 - GRÁFICO DE PT EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ULVANAS UF, F E ULT E SEUS PRODUTOS MODIFICADOS



Através do gráfico da concentração pelo tempo de PT é possível obter-se o coeficiente angular da equação da reta (tabela 14), determinando assim a variação no tempo de PT (ΔT), que é resultante da variação provocada pela adição de $1,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de polissacarídeo. As ulvanas UF, F e ULT apresentaram ΔT de 0,0036, 0,0041 e 0,0043 s, respectivamente. A ulvana UF apresentou atividade a partir de $3984,2 \mu\text{g.mL}^{-1}$, já as ulvanas F e ULT apresentaram atividade a partir de $3455,6$ e $3125,1 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Com relação atividade obteve-se a seguinte ordem para as frações de ulvanas que $\text{ULT} > \text{F} > \text{UF}$.

As ulvanas fosforiladas em meio aquoso 6R, 9R, PC-UF e PD-UF, apresentaram ΔT variando de 0,011 a 0,027 s, com atividade anticoagulante inicial de $438,1$ a $1070,1 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Esse resultados demonstram que as frações analisadas apresentam baixa atividade anticoagulante quando comparadas a heparina com atividade inicial a partir de $9,6 \mu\text{g.mL}^{-1}$. A ulvana UF

desempenhada a partir atividade anticoagulante nesta via a partir de 3984,2 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de 810,2 e 1070,1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para as ulvanas fosforiladas 6R e 9R respectivamente. Para as frações PC-UF e PD-UF foi de 686,7 e 438,1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectivamente. Para as frações modificadas fosforiladas a obteve-se a seguinte ordem PD-UF>PC-UF>6R>9R, a fração fosforilada após a dessulfatação foi a fração que apresentou maior atividade indicando que a perda de grupos sulfato ocasionou não afeta a atividade, o mesmo efeito foi observado para grupos carboxila.

TABELA 15 - EQUAÇÃO DA RETA, CN2APT E $\Delta\text{T}\cdot\text{MG}^{-1}$ DE ULVANAS UF, F E ULT E SEUS PRODUTOS MODIFICADOS

Fração	Equação da reta	CN2PT ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	$\Delta\text{T}\cdot\mu\text{g}^{-1}$ de polissacarídeo (s)
UF	$y = 0,0036x + 14,657 R^2 = 0,8401$	3984,2	0,0036
F	$y = 0,0041x + 14,832 R^2 = 0,9625$	3455,6	0,0041
ULT	$y = 0,0043x + 15,562 R^2 = 0,9903$	3125,1	0,0043
6R	$y = 0,0179x + 14,497 R^2 = 0,7379$	810,2	0,018
9R	$y = 0,0114x + 16,801 R^2 = 0,8303$	1070,1	0,011
PC-UF	$y = 0,0203x + 15,06 R^2 = 0,8902$	686,7	0,02
PD-UF	$y = 0,0272x + 17,083 R^2 = 0,7117$	438,1	0,02
UF-P	$y = 0,00139x + 14,362 R^2 = 0,7761$	10530,9	0,0014
UF-P1	$y = 0,001x + 14,202 R^2 = 0,8961$	14798,0	0,001
UF-P2	$y = 0,003x + 14,073 R^2 = 0,6321$	4975,7	0,003
UF-P3	$y = 0,0024x + 14,377 R^2 = 0,8165$	6092,9	0,002
GB	$y = 0,2096x + 9,9469 R^2 = 0,9989$	90,9	0,2
GBM	$y = 0,0063x + 16,24 R^2 = 0,9948$	2025,4	0,0063
UFM	$y = 0,03x + 16,4 R^2 = 0,8052$	420,0	0,03
Heparina	$y = 2,5813x + 4,275 R^2 = 0,8684$	9,6	2,6

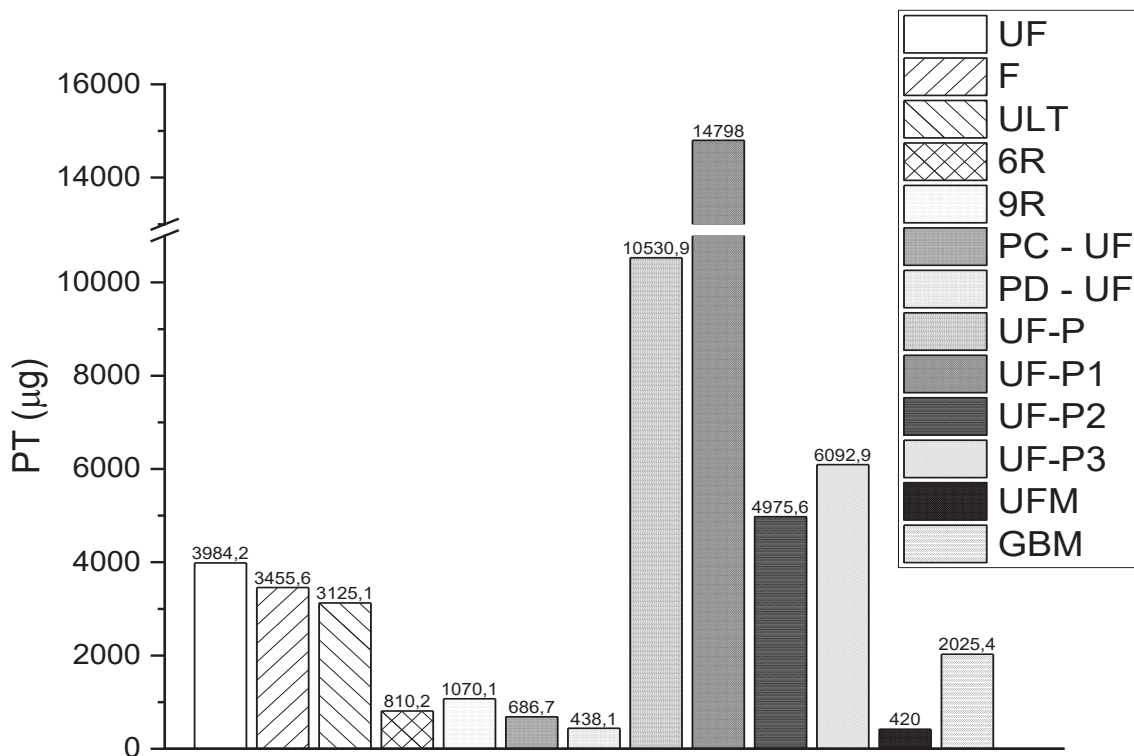
As frações UF-P, UF-P1, UF-P2 e UF-P3 apresentaram valores de CN2PT variando de 4945,7 a 14798,0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, com um coeficiente de angular (ΔT) entre 0,001 a 0,003 s entre a fração com maior e menor atividade. Esses valores encontrados são muito menores que os encontrados para frações fosforilados em meio aquoso, sendo que a fração com menor atividade anticoagulante encontrada foi a fração UF-P1, as frações apresentaram a seguinte ordem de atividade UF-P2>UF-P3>UF-P>UF-1.

As frações UFM e GBM obtidas através da reação de metacilação tiveram sua atividade anticoagulante avaliada por análises de PT. A fração UFM foi obtida através da

metacrilção da fração UF, após a metacrilção essa fração apresentou um ΔT de 0,03 s e sua atividade tem início a partir de $420,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, esses valores são aproximadamente 9 vezes menores que a fração de origem indicando uma melhora na atividade anticoagulante na via extrínseca devido a adição de grupos metacrilato.

Para a fração GBM obtida pela metacrilção da fração GB (extraída de *Gayralia brasiliensis*), apresentou ΔT de 0,0063 s e sua atividade tem início a partir de $2025,4 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ esse valor é aproximadamente 22 vezes maior do que o encontrado na fração de origem GB (ΔT de 0,2 s e atividade inicial de $90,9 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Assim como na via intrínseca a redução da massa molar nesta fração ocasionou uma redução significativa na atividade anticoagulante em comparação com a fração de origem GB.

FIGURA 45 - GRÁFICO DE CN2PT PARA ULVANAS UF, F E ULT E SEUS PRODUTOS MODIFICADOS



As frações fosforiladas em meio aquoso 6R, 9R, PC-UF e PD-UF, assim como ulvanas metacriladas UFM foram apresentaram um aumento na atividade de 2 a 21 vezes, quando comparadas a ulvanas UF. Essas frações apresentaram uma melhora nos tempos de coagulação, esse aumento foi correlacionado com a adição de grupos fosfato e metacrilato. Destaca-se que a atividade observada para essas frações é inferior as observadas para heparina e para fração GB, que apresentam um melhor desempenho nessa via.

4.8 CONCLUSÕES

- Heteropolissacarídeos sulfatados denominados de ulvanas foram obtidos da macroalga verde *Ulva fasciata* por meio de extração aquosa. No presente trabalho diferentes lotes de coleta de *U. fasciata* foram utilizados (frações F e UF). As ulvanas foram caracterizadas química e espectroscopicamente;
- Ulvanas foram obtidas da macroalga verde *Ulva laetevirens* por extração aquosa (fração ULT). A caracterização química e espectroscópica destes polissacarídeos foi de forma inédita realizada no presente trabalho;
- Ulvanas obtidas de *Ulva fasciata* são constituídas pelas díades A_{3S}, B_{3S} e U_{3S}, enquanto ulvanas obtidas de *Ulva laetevirens* contém adicionalmente a díade U_{2'S_{3S}};
- Ulvanas UF foram modificadas por fosforilação química, em meio aquoso utilizando STPP-STMP como agentes fosforilantes. Ulvanas fosforiladas (teores de fósforo de 0,1 a 1,3%) foram caracterizadas química e espectroscopicamente por FT-IR e RMN de ¹H, ³¹P, HSQC e HMBC;
- Ulvanas UF foram fosforiladas em meio orgânico utilizando diferentes agentes fosforilantes e posteriormente caracterizadas química e espectroscopicamente por FT-IR e RMN de ¹H, ³¹P e HSQC;
- Ulvanas (UF) e heteroramnanas sulfatadas (GB) foram modificadas quimicamente pela reação de metacrililação utilizando anidrido metacrílico. Os produtos de metacrililação foram caracterizados espectroscopicamente por análises de FT-IR e RMN de ¹H;
- Análises por HPSEC demonstraram que o processo de fosforilação em meio aquoso produziu ulvanas com massa molar similar a fração de origem enquanto ulvanas fosforiladas em meio orgânico apresentaram uma maior redução na sua massa molar em relação a ulvana nativa;
- Análises por dicroísmo circular demonstraram diferentes padrões dicroicos para as ulvanas UF e F. A ulvana UF apresentou padrão helicoidal enquanto a ulvana F um padrão aleatório. Esta diferença pode ser atribuída a diferença nos teores de grupos sulfato e unidades de ácido urônicos e/ou decorrente de coletas em regiões diferentes;
- Ulvanas fosforiladas 6R (STMP:STPP – 100 °C – pH 7 – 7 horas) e 9R (STMP:STPP – 30 °C – pH 7 – 6 horas) obtidas a partir fosforilação em meio aquoso da ulvana UF apresentaram padrão dicroico aleatório e helicoidal, respectivamente. O padrão helicoidal da ulvana fosforilada 9R foi similar à da ulvana UF;

- Ulvanas fosforiladas XP1, XP2, XP3 e XP4 obtidas a partir de ulvanas UF apresentaram diferentes padrões dicróicos conforme o agente fosforilante utilizado STPP para XP1 e XP3 e STMP para XP2 e XP4;
- Ulvanas fosforiladas UF-P e UF-P3 apresentaram padrão dicróico com conformação aleatória, enquanto ulvanas fosforiladas UF-P2 e UF-P1 apresentaram padrão dicróico com conformação helicoidal. Essas frações foram obtidas a partir da fosforilação da fração UF em meio orgânico tendo como agente fosforilante o ácido fosfórico em diferentes concentrações;
- Ulvanas fosforiladas apresentaram padrões dicróicos dependentes da redução da massa molar, do solvente utilizado e dos agentes fosforilantes;
- A atividade anticoagulante das ulvanas nativas foi avaliada *in vitro* através dos testes de aPTT (via intrínseca da cascata de coagulação) e a PT (via extrínseca e comum da cascata de coagulação). Em relação a via intrínseca da cascata de coagulação a ordem de atividade foi F>UF>ULT. De modo diferente para a via extrínseca a ordem de atividade foi ULT>F>UF.
- Com relação a via intrínseca da cascata de coagulação ulvanas fosforiladas em meio orgânico apresentaram a seguinte ordem de atividade 6R>9R>PC-UF (fração carboxireduzida e fosforilada)>PD-UF (fração dessulfatada fosforilada), enquanto para a via extrínseca a ordem de atividade foi de PD-UF>PC-UF>6R>9R;
- A modificação química por metacrilção da ulvana UF ocasionou um aumento de atividade. A fração de ulvanas metacriladas (UFM) apresentou CN2aPTT de 232,7 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ enquanto que a fração de ulvanas nativas (UF) apresentam um CN2aPTT de 632,8 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, indicando uma maior atividade na via intrínseca;
- A ulvana metacrilada UFM apresentou CN2PT de 420,0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ enquanto que ulvanas nativas apresentaram CN2PT de 3984,2 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, ou seja uma diferença positiva de aproximadamente 9 vezes;
- O produto de metacrilção (fracção GBM) apresentou CN2aPTT e CN2 PT de 1740,3 e 2025,2 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectivamente. Uma redução de mais de 100 vezes na atividade na via extrínseca e 20 vezes menor na via extrínseca em comparação a fração de origem (heteroramnana sulfatada nativa GB).
- Deste modo no presente trabalho foram avaliados diferentes processos de fosforilação e metacrilção química utilizando dois tipos estruturais distintos de polissacarídeos sulfatados obtidos de macroalgas verdes (ulvanas e heteroramnanas);
- De modo inédito as ulvanas de *U. laetevirens* foram estruturalmente caracterizadas as quais são diferentes, em termos de díades constituintes em relação as ulvanas de *Ulva fasciata*;

- Tipos de díades constituintes e processo de modificação química podem ser estar correlacionados com as diferenças de atividade anticoagulante e conformação dos polissacarídeos nativos e modificados investigados no presente trabalho;
- Estes polissacarídeos modificados representam novos biomateriais com potencial aplicação biotecnológica.

REFERÊNCIAS

- ADRIEN, A. et al. Anticoagulant Activity of Sulfated Ulvan Isolated from the Green Macroalga *Ulva rigida*. **Marine Drugs**, v. 17, n. 5, p. 291, 14 maio 2019.
- AHMAD, M. M. Recent trends in chemical modification and antioxidant activities of plants-based polysaccharides: A review. **Carbohydrate Polymer Technologies and Applications**, v. 2, n. January, p. 100045, 2021.
- ALVES, A.; SOUSA, R. A.; REIS, R. L. In Vitro Cytotoxicity Assessment of Ulvan , a Polysaccharide Extracted from Green Algae. v. 1148, n. August 2012, p. 1143–1148, 2013.
- AMER, H. et al. Synthesis and Characterization of Periodate-Oxidized Polysaccharides: Dialdehyde Xylan (DAX). **Biomacromolecules**, v. 17, n. 9, p. 2972–2980, 12 set. 2016.
- ANDISKA, P. W.; YANG, M. Y.; KIM, M. S. New record of *Gayralia kuroshiensis* (Ultrichales: Chlorophyta) in Korea based on morphological and molecular analyses. **Journal of Asia-Pacific Biodiversity**, p. S2287884X23000857, ago. 2023.
- BARAKAT, K. M. et al. Chemical characterization and biological activities of ulvan extracted from *Ulva fasciata* (Chlorophyta). **Rendiconti Lincei. Scienze Fisiche e Naturali**, v. 33, n. 4, p. 829–841, dez. 2022a.
- BARAKAT, K. M. et al. Chemical characterization and biological activities of ulvan extracted from *Ulva fasciata* (Chlorophyta). **Rendiconti Lincei. Scienze Fisiche e Naturali**, v. 33, n. 4, p. 829–841, dez. 2022b.
- BARROWCLIFFE, T. W. New approaches for measuring coagulation. **Haemophilia**, v. 12, n. SUPPL. 3, p. 76–81, 2006.
- BIGGS, R.; DOUGLAS, A. S.; MACFARLANE, R. G. The initial stages of blood coagulation. **The Journal of Physiology**, v. 122, n. 3, p. 538–553, dez. 1953.
- BÖRJESSON, M. et al. Periodate oxidation of xylan-based hemicelluloses and its effect on their thermal properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 202, n. June, p. 280–287, 2018.
- BRADING, J. W. E.; GEORG-PLANT, M. M. T.; HARDY, D. M. The polysaccharide from the alga *Ulva lactuca*. Purification, hydrolysis, and methylation of the polysaccharide. **Journal of the Chemical Society (Resumed)**, p. 319, 1954.
- CAGNIN, C. et al. Hydrogels of starch/carboxymethyl cellulose crosslinked with sodium trimetaphosphate via reactive extrusion. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 138, n. 15, p. 50194, 2021.
- CAO, Y. Y. et al. Effects of sulfated, phosphorylated and carboxymethylated modifications on the antioxidant activities in-vitro of polysaccharides sequentially extracted from *Amana edulis*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 146, p. 887–896, 2020.

CARVALHO, M. M. et al. Modification of ulvans via periodate-chlorite oxidation: Chemical characterization and anticoagulant activity. **Carbohydrate Polymers**, v. 197, p. 631–640, 2018.

CHEN, F.; HUANG, G.; HUANG, H. Preparation, analysis, antioxidant activities in vivo of phosphorylated polysaccharide from *Momordica charantia*. **Carbohydrate Polymers**, v. 252, n. September 2020, p. 117179, 2021.

CHEN, X. et al. Chain conformation and anti-tumor activities of phosphorylated (1→3)- β -d-glucan from *Poria cocos*. **Carbohydrate Polymers**, v. 78, n. 3, p. 581–587, out. 2009.

CIANCIA, M.; QUINTANA, I.; CEREZO, A. S. Overview of Anticoagulant Activity of Sulfated Polysaccharides from Seaweeds in Relation to their Structures , Focusing on those of Green Seaweeds. p. 2503–2529, 2010.

COLEMAN, R. J. et al. Phosphorylation of alginate: Synthesis, characterization, and evaluation of in vitro mineralization capacity. **Biomacromolecules**, v. 12, n. 4, p. 889–897, 2011.

COLODI, F. G. et al. Semi-synthesis of hybrid ulvan-kappa-carrabiose polysaccharides and evaluation of their cytotoxic and anticoagulant effects. **Carbohydrate Polymers**, v. 267, n. May, 2021.

COSTE, O.; CALLEJO, J.; FERNÁNDEZ-DÍAZ, C. Production of sulfated oligosaccharides from the seaweed *Ulva* sp . using a new ulvan-degrading enzymatic bacterial crude extract. **ALGAL**, v. 10, p. 224–231, 2015.

CUI, Q. ? et al. **D_glucose_6_phosphate**. Biological Magnetic Resonance Bank, , 2006. Disponível em: <https://bmr.bioinformatics.org/metabolomics/mol_summary/show_data.php?id=bmse000016>. Acesso em: 26 nov. 2023

DACE, R. et al. Comparison of the anticoagulant action of sulfated and phosphorylated polysaccharides. **Thrombosis Research**, 1997.

DACRORY, S. et al. Evaluation of biocompatible amino acid-functionalized cellulose composites: Characterizations, molecular modeling, anticoagulant activity, and cytocompatibility. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre**, v. 30, p. 100372, nov. 2023.

DANTAS, P.; SOUSA, F. D. ESTUDO DA CASCATA DE COAGULAÇÃO SANGÜÍNEA E SEUS. p. 49–55, 2007.

DASH, M. et al. Ulvan-chitosan polyelectrolyte complexes as matrices for enzyme induced biomimetic mineralization. **Carbohydrate Polymers**, v. 182, p. 254–264, fev. 2018.

DAVIE, E. W.; RATNOFF, O. D. Waterfall Sequence for Intrinsic Blood Clotting. **Science**, v. 145, n. 3638, p. 1310–1312, set. 1964.

DE BORBA, M. C.; DE FREITAS, M. B.; STADNIK, M. J. Ulvan enhances seedling emergence and reduces Fusarium wilt severity in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Crop Protection**, v. 118, p. 66–71, abr. 2019.

DE CARVALHO, M. M. et al. Conformational analysis of ulvans from *Ulva fasciata* and their anticoagulant polycarboxylic derivatives. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 162, p. 599–608, nov. 2020.

DODGSON, K.; PRICE, R. A note on the determination of the ester sulphate content of sulphated polysaccharides. **Biochemical Journal**, v. 84, n. 1, p. 106–110, 1962.

DUBOIS, MICHEL. et al. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350–356, 1 mar. 1956.

FASMAN, D. G. **Circular Dichroism and the Conformational Analysis of Biomolecules**. [s.l.: s.n.].

FENG, H. et al. Antiviral activity of phosphorylated *Radix Cyathulae officinalis* polysaccharide against Canine Parvovirus in vitro. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 99, p. 511–518, jun. 2017.

FRANCO, R. F. **FISIOLOGIA DA COAGULAÇÃO, ANTICOAGULAÇÃO E FIBRINOLISE OVERVIEW OF COAGULATION, ANTICOAGULATION AND FIBRINOLYSIS**. [s.l.] Medicina, 2001a.

FRANCO, R. F. Fisiologia da coagulação, anticoagulação e fibrinólise. **Medicina (Ribeirão Preto)**, v. 34, n. 3/4, p. 229–237, 30 dez. 2001b.

FREITAS, M. B. D. et al. Ulvans induce resistance against plant pathogenic fungi independently of their sulfation degree. **Carbohydrate Polymers**, v. 133, p. 384–390, 2015.

GARCÍA-MÁRQUEZ, J. et al. In Vitro and In Vivo Effects of Ulvan Polysaccharides from *Ulva rigida*. **Pharmaceuticals**, v. 16, n. 5, p. 660, 28 abr. 2023.

GOGOI, D. et al. Anticoagulant mechanism, pharmacological activity, and assessment of preclinical safety of a novel fibrin(ogen)olytic serine protease from leaves of *Leucas indica*. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–17, 2018.

GREENFIELD, L. J.; KALBER, F. A. Inorganic Phosphate Measurement in Sea Water. **Bulletin of Marine Science**, v. 4, n. 4, p. 323–335, 1954.

HAQUE, M. A. et al. Application of circular dichroism spectroscopy in studying protein folding, stability, and interaction. Em: **Advances in Protein Molecular and Structural Biology Methods**. [s.l.] Elsevier, 2022. p. 213–224.

HOFFBRAND, A. V.; MOSS, P. A. H. **Victor Hoffbrand - Fundamentos em Hematologia, 6ª Edição**. [s.l.: s.n.].

HOOGEN, B. M. VAN DEN et al. A Microtiter Plate Assay for the Determination of Uronic Acids. **Analytical Biochemistry**, v. 257, n. 2, p. 107–111, 1998.

INAGAKI, N. et al. Phosphorylation of cellulose with phosphorous acid and thermal degradation of the product. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 20, n. 10, p. 2829–2836, out. 1976.

INOUE, K. et al. Chemical modification and antitumor activity of a d-manno-d-glucan from *Microcellobosporia grisea*. **Carbohydrate Research**, v. 115, n. C, p. 199–208, 1983.

JIANG, N. et al. The antioxidant and antihyperlipidemic activities of phosphorylated polysaccharide from *Ulva pertusa*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 145, p. 1059–1065, fev. 2020.

JONGPRASITKUL, H. et al. Photocross-linkable Methacrylated Polypeptides and Polysaccharides for Casting, Injecting, and 3D Fabrication. **Biomacromolecules**, v. 22, n. 2, p. 481–493, 8 fev. 2021.

KIDGELL, J. **The structure and bioactivity of ulvan, a sulfated polysaccharide from *Ulva* (chlorophyta)**. [s.l: s.n.].

KRISTIANSEN, K. A.; POTTHAST, A.; CHRISTENSEN, B. E. Periodate oxidation of polysaccharides for modification of chemical and physical properties. **Carbohydrate Research**, v. 345, n. 10, p. 1264–1271, 2010.

KRISTIANSEN, K. A.; TOMREN, H. B.; CHRISTENSEN, B. E. Periodate oxidized alginates: Depolymerization kinetics. **Carbohydrate Polymers**, 2011.

LAHAYE, M. NMR spectroscopic characterisation of oligosaccharides from two *Ulva rigida* ulvan samples (*Ulva*, Chlorophyta) degraded by a lyase. **Carbohydrate Research**, v. 314, n. 1–2, p. 1–12, 1998.

LAHAYE, M.; AXELOS, M. A. V. Gelling properties of water-soluble polysaccharides from proliferating marine green seaweeds (*Ulva* spp.). **Carbohydrate Polymers**, v. 22, n. 4, p. 261–265, jan. 1993.

LAHAYE, M.; BRUNEL, M.; BONNIN, E. Fine chemical structure analysis of oligosaccharides produced by an ulvan-lyase degradation of the water-soluble cell-wall polysaccharides from *Ulva* sp. (*Ulva*, Chlorophyta). **Carbohydrate Research**, v. 304, n. 3–4, p. 325–333, 1997.

LAHAYE, M.; RAY, B. Cell-wall polysaccharides from the marine green. v. 283, p. 161–173, 1996.

LARKIN, P. Introduction. Em: **Infrared and Raman Spectroscopy**. [s.l.] Elsevier, 2011. p. 1–5.

LI, Q. et al. Photocrosslinkable polysaccharides based on chondroitin sulfate. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 68A, n. 1, p. 28–33, 1 jan. 2004.

LIU, X. et al. Structural Characteristics and Anticoagulant Property In Vitro and In Vivo of a Seaweed Sulfated Rhamnan. **Marine Drugs**, v. 16, 2018.

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of biological chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265–75, 1951.

MACFARLANE, R. G. An Enzyme Cascade in the Blood Clotting Mechanism, and its Function as a Biochemical Amplifier. **Nature**, v. 202, n. 4931, p. 498–499, maio 1964.

MANSUR, H. S. et al. FTIR spectroscopy characterization of poly (vinyl alcohol) hydrogel with different hydrolysis degree and chemically crosslinked with glutaraldehyde. **Materials Science and Engineering: C**, v. 28, n. 4, p. 539–548, maio 2008.

MARIA, L.; MURAKAMI, Z. Uso da técnica de dicroísmo circular para avaliação de proteínas com aplicações biotecnológicas. 2016.

MARÍLIA, M. et al. **ESTUDO DA CASCATA DE COAGULAÇÃO SANGÜÍNEA E SEUS VALORES DE REFERÊNCIA [Study of blood coagulation cascade and the reference values]**. [s.l: s.n.].

MAZEPA, E. et al. Chemical structure of native and modified sulfated heterorhamnans from the green seaweed *Gayralia brasiliensis* and their cytotoxic effect on U87MG human glioma cells. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 187, p. 710–721, set. 2021.

MIHAILA, S. M. et al. Photocrosslinkable kappa-carrageenan hydrogels for tissue engineering applications. **Advanced Healthcare Materials**, v. 2, n. 6, p. 895–907, 2013.

MING, K. et al. Phosphorylated *Codonopsis pilosula* polysaccharide could inhibit the virulence of duck hepatitis A virus compared with *Codonopsis pilosula* polysaccharide. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 94, p. 28–35, jan. 2017.

MOREIRA, A. et al. The underexplored potential of green macroalgae in aquaculture. **Reviews in Aquaculture**, v. 14, n. 1, p. 5–26, jan. 2022.

MORELLI, A. et al. Design, preparation and characterization of ulvan based thermosensitive hydrogels. **Carbohydrate Polymers**, 2016.

MORELLI, A.; CHIellini, F. Ulvan as a New Type of Biomaterial from Renewable Resources: Functionalization and Hydrogel Preparation. **Macromolecular Chemistry and Physics**, v. 211, n. 7, p. 821–832, 1 abr. 2010.

NISHI, N. et al. Preparation and characterization of water-soluble chitin phosphate. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 6, n. 1, p. 53–54, fev. 1984.

NYPELÖ, T. et al. Review: Periodate oxidation of wood polysaccharides—Modulation of hierarchies. **Carbohydrate Polymers**, v. 252, p. 117105, jan. 2021.

PARADOSSI, G. et al. A physico-chemical study on the polysaccharide ulvan from hot water extraction of the macroalga *Ulva*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 25, n. 4, p. 309–315, 1999.

PARADOSSI, G.; CAVALIERI, F.; CHIESSI, E. A conformational study on the algal polysaccharide ulvan. **Macromolecules**, v. 35, n. 16, p. 6404–6411, 2002.

PAULERT, R. et al. Effects of sulfated polysaccharide and alcoholic extracts from green seaweed *Ulva fasciata* on anthracnose severity and growth of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Journal of Plant Diseases and Protection**, v. 116, n. 6, p. 263–270, dez. 2009.

QUEMENER, B.; LAHAYE, M. Sugar determination in ulvans by a chemical-enzymatic method coupled to high performance anion exchange chromatography. p. 179–188, 1997.

RED, C.; MEMORIAL, C. Periodate Oxidation of Acid Polysaccharides. v. 161, p. 155–161, 1969.

ROBIC, A. et al. Seasonal variability of physicochemical and rheological properties of ulvan in two ulva species (chlorophyta) from the brittany coast. **Journal of Phycology**, v. 973, n. 45, p. 962–973, 2009a.

ROBIC, A. et al. Ultrastructure of Ulvan: A polysaccharide from green seaweeds. **Biopolymers**, v. 91, n. 8, p. 652–664, 2009b.

ROUILLARD, A. D. et al. Methods for Photocrosslinking Alginate Hydrogel Scaffolds with High Cell Viability. **Tissue Engineering Part C: Methods**, v. 17, n. 2, p. 173–179, fev. 2011.

SCHUURMANS, C. C. L. et al. Hydrolytic (In)stability of Methacrylate Esters in Covalently Cross-Linked Hydrogels Based on Chondroitin Sulfate and Hyaluronic Acid Methacrylate. **ACS Omega**, v. 6, n. 40, p. 26302–26310, 12 out. 2021.

SHEFER, S. et al. Fighting SARS-CoV-2 with green seaweed *Ulva* sp. extract: Extraction protocol predetermines crude ulvan extract anti-SARS-CoV-2 inhibition properties in in vitro Vero-E6 cells assay. **PeerJ**, v. 9, nov. 2021.

SILVA, P. H. D. et al. **Hematologia Laboratorial**. [s.l.] Artmed, 2016.

SIRVIO, J. et al. Periodate oxidation of cellulose at elevated temperatures using metal salts as cellulose activators. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, n. 3, p. 1293–1297, 2011.

SUFLET, D. M.; CHITANU, G. C.; DESBRIRES, J. Phosphorylated polysaccharides. 2. Synthesis and properties of phosphorylated dextran. **Carbohydrate Polymers**, v. 82, n. 4, p. 1271–1277, 2010.

Ulva fasciata Delile :: AlgaeBase. Disponível em: <https://www.algaebase.org/search/species/detail/?species_id=1065&sk=10>. Acesso em: 28 nov. 2023.

VELHO, A. C. et al. Defense responses induced by ulvan in wheat against powdery mildew caused by *Blumeria graminis* f. sp. *tritici*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 184, p. 14–25, ago. 2022.

- WAHLSTRÖM, N. et al. Ulvan dialdehyde-gelatin hydrogels for removal of heavy metals and methylene blue from aqueous solution. **Carbohydrate Polymers**, v. 249, dez. 2020.
- WANG, J. et al. Synthesis and characterization of phosphorylated galactomannan: The effect of DS on solution conformation and antioxidant activities. **Carbohydrate Polymers**, v. 113, p. 325–335, nov. 2014.
- WANG, R. et al. Analysis of Polyphosphate during the Enhanced Biological Phosphorus Removal process using Fourier Transform Infrared (FTIR) spectroscopy. **E3S Web of Conferences**, v. 145, p. 02077, 2020.
- WHISTLER, R. L.; TOWLE, G. A. Preparation and characterization of polysaccharide phosphates. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 135, p. 396–401, 1969.
- XIE, L. et al. Preparation, characterization, antioxidant activity and protective effect against cellular oxidative stress of phosphorylated polysaccharide from *Cyclocarya paliurus*. **Food and Chemical Toxicology**, v. 145, p. 111754, nov. 2020.
- XIONG, X.; HUANG, G.; HUANG, H. The antioxidant activities of phosphorylated polysaccharide from native ginseng. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 126, p. 842–845, abr. 2019.
- XU, Y. et al. International Journal of Biological Macromolecules Sulfated modification of the polysaccharide from *Sphallerocarpus gracilis* and its antioxidant activities. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 87, p. 180–190, 2016.
- YE, M. et al. Phosphorylation and anti-tumor activity of exopolysaccharide from *Lachnum YM120*. **Carbohydrate Polymers**, v. 97, n. 2, p. 690–694, 2013.
- YOKOYA, N. S. et al. Mangrove Macroalgal Communities. Em: SCHAEFFER-NOVELLI, Y.; ABUCHAHLA, G. M. D. O.; CINTRON-MOLERO, G. (Eds.). **Brazilian Mangroves and Salt Marshes**. Brazilian Marine Biodiversity. Cham: Springer International Publishing, 2023. p. 131–154.
- ZHANG, H. et al. Sulfated modification, characterization and property of a water-insoluble polysaccharide from *Ganoderma atrum*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 79, p. 248–255, ago. 2015.
- ZHANG, M. et al. Phosphorylation and antiaging activity of polysaccharide from *Trichosanthes peel*. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 25, n. 4, p. 976–983, 2017.
- ZHANG, Z. et al. In vitro antioxidant activities of acetylated, phosphorylated and benzoylated derivatives of porphyran extracted from *Porphyra haitanensis*. **Carbohydrate Polymers**, v. 78, n. 3, p. 449–453, 2009.
- ZHAO, X.; WANG, Y.; ZHAO, D. Chapter 3 - Structural analysis of biomacromolecules using circular dichroism spectroscopy. Em: SAUDAGAR, P.; TRIPATHI, T. (Eds.). **Advanced Spectroscopic Methods to Study Biomolecular Structure and Dynamics**. [s.l.] Academic Press, 2023. p. 77–103.