

1. INTRODUÇÃO

1.1 ASPECTOS GERAIS

A vida, como todos nós sabemos, começou nos oceanos, e as algas certamente estão entre os mais antigos organismos vivos, com registros de fósseis datando cerca de 3 bilhões de anos (SCHOPF¹, apud PAINTER 1983, v. 2, p. 196).

A classificação das algas, com respeito a sua escala evolutiva, é um assunto que tem sido constantemente revisado. No entanto, todos concordam que as algas azuis (Cyanophyta) são filogeneticamente as mais antigas, seguidas pelas algas vermelhas (Rhodophyta), e que as algas pardas (Phaeophyta) são as mais recentes (PAINTER 1983).

As algas vermelhas e as pardas são em sua grande maioria macroalgas de habitat marinho (RAVEN; EVERT; ELCHHORN, 2001). Elas são amplamente distribuídas no oceano, ocorrendo do nível da maré a consideráveis profundidades, flutuando livremente ou ancoradas a outras algas ou rochas (SCHAEFFER; KRYLOV, 2000). As algas verdes (Chlorophyta) crescem em diversos ambientes, sendo a maioria de água doce e microscópica, apesar de algumas espécies marinhas como a *Codium magnum*, por exemplo, atingirem 25 cm de largura por 8 m de comprimento (RAVEN; EVERT; ELCHHORN, 2001).

Todas as algas possuem cloroplastos e realizam fotossíntese similar as outras plantas, mas diferente destas, não possuem raízes, caules e folhas verdadeiros (SCHAEFFER; KRYLOV, 2000).

Assim como as plantas superiores, as algas multicelulares, ou macroalgas, apresentam uma parede celular que pode ser entendida como um sistema de duas fases: uma cristalina (esqueleto) embebida em uma fase mais amorfa (a matriz). Diferentemente das plantas terrestres, nas algas há uma abundância dos componentes de matriz em relação aos componentes do esqueleto, e há também uma prevalência dos polissacarídeos polianiônicos sobre os polissacarídeos neutros. Além disso, as algas marinhas sintetizam polissacarídeos sulfatados, os quais não são encontrados em plantas terrestres ou mesmo nas de água doce. Isto sugere que

¹ SCHOPF, J. W. **Scientific American**, v. 239, n. 3, p. 84-103, 1978.

os polissacarídeos de matriz têm funções específicas em relação ao ambiente marinho, sendo comumente postulado que eles estão especificamente envolvidos com a regulação mecânica, osmótica ou iônica (KLOAREG; QUATRANO, 1988).

Alguns fatores como sazonalidade, habitat, profundidade de imersão (luminosidade), fase de desenvolvimento celular e espécie, podem influenciar o conteúdo e as características estruturais desses polímeros (HONYA et. al., 1999; ZVYAGINTSEVA et. al., 2003).

As algas podem apresentar polissacarídeos característicos, por exemplo: a presença de galactanas sulfatadas em algas vermelhas e as ramnanas sulfatadas em Chlorophyta (ASPINALL, 1983). Entre os principais polissacarídeos produzidos pelas algas pardas estão os ácidos algínicos, as laminaranas e as fucanas sulfatadas (ZVYAGINTSEVA et. al., 1999), sendo as últimas o objetivo de estudo do presente trabalho.

1.2. POLISSACARÍDEOS DE ALGAS PARDAS

1.2.1. Ácidos Algínicos

O termo alginato é utilizado para designar uma família de polissacarídeos lineares constituídos por ácido α -L-gulurônico (G) e ácido β -D-manurônico (M) (1 \rightarrow 4)-ligados. A percentagem de unidades G e M, bem como a distribuição destas ao longo do polímero (blocos MG, blocos M, blocos G) variam de acordo com a espécie investigada (PAINTER, 1983).

Os alginatos são os principais polissacarídeos do esqueleto das algas pardas, podendo atingir 40% do peso seco (BLACK², STEINER; MCNEELY³, apud PAINTER, 1983, v.2, p. 264).

Os alginatos são encontrados como uma mistura de sais de todos os cátions encontrados na água do mar, sendo os principais Na⁺, Mg²⁺, e Ca²⁺ (PAINTER, 1983). Na forma de sais de Na⁺ e Mg²⁺ os alginatos são solúveis em

² BLACK, W. A. P. *J. Mar. Biol. Assoc.*, U.K, v. 29, p. 45-72, 1950.

³ STEINER, A. B.; MCNEELY, W. H. *Adv. Chem. Ser.*, v. 11, p. 68-82, 1954.

água, mas em seu estado nativo se apresentam principalmente como um gel insolúvel devido às ligações cruzadas com os íons Ca^{2+} e com as pequenas quantidades de Sr^{2+} presentes no ambiente marinho (HAUG⁴, SMIDSRÖD; HAUG⁵, HAUG; SMIDSRÖD⁶, ANDRESSEN et. al.⁷, apud PAINTER, 1983, v.2, p. 264). Essas ligações cruzadas são responsáveis pela rigidez que o esqueleto oferece a parede celular (ANDRESSEN et. al.⁷ apud PAINTER, 1983, v.2 p.264).

Por sua capacidade de formar gel, os ácidos algínicos são amplamente utilizados em várias áreas na indústria. Na indústria farmacêutica podem ser utilizados como base para comprimidos e cápsulas, como enteroabsorventes para remover toxinas, e na cosmetologia para preparação de unguentos não oleosos (LEWIS et. al., 1988; SKJAK-BRAK, 1992) .

FUJIK et al. (1994) extraíram de *Undaria pinnatifida* um ácido algínico de baixa massa molecular (Mw 45 KDa) com uma razão de 0,8 para os blocos M/G. Este polissacarídeo ácido demonstrou um efeito imunoestimulante e uma ação protetora contra infecções em peixes, diferentemente de um ácido algínico de alto massa molecular (Mw 146-264 KDa) extraído de *Macrocystis pirifera* e com uma razão M/G similar (0,9). O ácido algínico de *Lessonia nigrescens* (Mw 177-290), com uma razão de 1,3 para os blocos M/G também não apresentou essa atividade. Neste caso, provavelmente a atividade biológica do ácido algínico de *U. pinnatifida* foi determinada pela razão dos blocos M/G no polímero (ZVYAGINTSEVA et al., 2005) e por sua baixa massa molecular (KULICKE et. al., 1997; SOEDA et. al., 1995).

1.2.2 Laminaranas

As laminaranas são polissacarídeos de reserva das algas pardas. Em regiões frias, elas são ausentes durante a fase de crescimento rápido, que ocorre na

⁴ HAUG, A. **Acta Chem. Scand.**, v. 15, p. 1794-1795, 1961.

⁵ SMIRÖD, O.; HAUG, A. **Acta Chem. Scand.**, v. 22, p. 1989-1997, 1968.

⁶ HAUG, A.; SMIRÖD, O. **Acta Chem. Scand.**, v. 24, p. 843-854, 1970.

⁷ ANDRESSEN, I. -L.; SKIPNES, O.; SMIRÖD, O.; OSTGAARD, K.; HEMMER, P. C. **ACS Symp. Ser.**, v. 48, p. 361-381, 1977.

primavera, e no outono e inverno podem representar até 35% do peso seco das frondes (HANDA; NISIZAWA, 1961).

As laminaranas de algas pardas são β -D-glucanas (1 \rightarrow 3); (1 \rightarrow 6)-ligadas com baixa massa molecular (cerca de 5 KDa). Conforme a espécie investigada, as unidades de β -D-glucose (1 \rightarrow 6)-ligadas podem estar presentes na cadeia principal ou como ramificações (PERCIVAL; MCDOWELL, 1967; ZVYAGINTSEVA et al., 1994).

Como muitos outros polissacarídeos as laminaranas são polidispersas, revelando certa heterogeneidade estrutural, como por exemplo, no grau de ramificação e polimerização (comprimento da cadeia principal de glucose (1 \rightarrow 3)-ligada). Uma pequena proporção das cadeias de laminarana possui um terminal redutor formado por uma unidade de Glcp 3-O-ligada, sendo designadas de cadeias G. A maioria das outras cadeias possui como terminal redutor D-manitol 3-O-ligado, sendo designadas de cadeias M. As laminaranas de diferentes espécies de algas pardas podem variar na razão M:G, sendo que em alguns casos as cadeias M estão ausentes (CHIZHOV et al., 1998).

CARDOSO (2003) purificou de *Pocockiella variegata* (antiga descrição de *Lobophora variegata*) uma laminarana que apresentou proporções significativas de manitol (M) como constituinte natural. Desta forma, esta alga parda produz uma laminarana formada principalmente por cadeias M, onde não foram observadas unidades de β -D-glucose (1 \rightarrow 6)-ligadas intracadeias como as presentes nas laminaranas isoladas das algas *Ecklonia radiata* e *Cystophora scalaris*, que foram relatadas por RAM et al. (1981).

As laminaranas têm sido extensivamente estudadas por apresentarem atividades radioprotetoras e antitumorais, pois estimulam a imunidade em plantas e peixes (PATCHEN et al., 1987; SAITO et al., 1992). As atividades biológicas destas β -D-glucanas são devidas às peculiaridades de sua estrutura primária e espacial (SHARP et al., 1984; KULICKE et al., 1997).

Por serem substâncias com massa molecular reduzida, as laminaranas não apresentam uma atividade imunoestimulante significativa em mamíferos, mas podem servir como material de partida para a preparação de β -D-glucanas para serem utilizadas como imunoestimulantes não tóxicos nestes organismos (ZVYAGINTSEVA et al., 1995; ZVYAGINTSEVA et al., 2003).

1.2.3. Fucanas Sulfatadas

As fucanas representam uma família de homo e heteropolissacarídeos sulfatados. As homofucanas são constituídas essencialmente por unidades de α -L-fucose e grupos sulfato, enquanto que as heterofucanas, além destes constituintes, podem apresentar diferentes proporções de unidades de D-galactose, D-manose, D-xilose, L-ramnose, e/ou ácido D-glucurônico, além de grupos acetil (PAINTER, 1983; NAGUMO; NISHINO, 1996; TAKO et. al., 2000).

Poucas homofucanas têm sido descritas para as algas pardas, podendo ser citadas como exemplo as de *Chorda filum* (CHIZHOV et. al., 1999), *Laminaria saccharina* (USOV et al., 1998) e *Leathesia difformis* (CARDOSO, 2003).

A homofucana sulfatada isolada da alga parda *C. fillum*, após dessulfatação solvolítica e análises de metilação do polissacarídeo em sua forma nativa e dessulfatada, mostrou ser composta por uma cadeia principal de α -L-fucose 3-ligada com um alto grau de ramificação por unidades simples de α -L-fucose ligadas em C-2 das unidades da cadeia principal. Alguns resíduos de fucose mostraram-se O-sulfatados em C-4 (principalmente) e em C-2. A presença de grupos acetil também foi confirmada pelos autores através das análises de RMN ^1H ^{13}C HMQC (CHIZHOV et. al., 1999).

A homofucana que foi descrita em *Laminaria saccharina* por USOV et. al. (1998) é semelhante à de *C. fillum*, pois também apresenta uma cadeia principal formada por de α -L-fucose (1 \rightarrow 3)-ligada sulfatada predominantemente na posição C-4. Diferentemente das fucanas de *C. fillum* que são altamente ramificadas, estas apresentaram apenas algumas ramificações e grupos sulfato na posição C-2.

CARDOSO (2003) descreveu a fração de homofucanas de *Leathesia difformis* como sendo composta por uma estrutura linear formada majoritariamente por α -L-fucose (1 \rightarrow 3)-ligada 2-sulfatada. Foi descrito ainda, para esta fração, que algumas poucas unidades de α -L-fucose se apresentavam glicosiladas em C-4 por unidades simples de xilose ou por unidades de fucose sem substituição.

As algas pardas não são as únicas fontes naturais de fucanas sulfatadas. Estas podem ser encontradas também em equinodermos, que são conhecidos por produzirem homofucanas sulfatadas com cadeias lineares e regulares padrões de sulfatação (MULLOY et. al., 2000). Diferentemente dos equinodermos, as algas

pardas produzem, em sua grande maioria, fucanas ramificadas que são usualmente heterogêneas em sua composição monossacarídica e com um padrão de sulfatação irregular (BILAN et. al., 2004).

Recentemente tem sido relatado que algumas espécies pertencentes à ordem Chordariales e Laminariales (classe Phaeosporophyceae) apresentam polissacarídeos com uma cadeia principal constituída por unidades de α -L-fucose (1→3) ligadas (USOV et al., 1998; CHIZHOV et al., 1999). De modo diferente, representantes da ordem Fucales (classe Cyclosporophyceae), apresentam cadeias principais constituídas de unidades de α -L-fucose (1→3) e (1→4)-ligadas (CHEVOLOT et al., 1999; CHEVOLOT et al., 2001; BILAN et al., 2002).

É muito provável que a diferença entre as cadeias principais das fucanas pertencentes às classes Phaeosporophyceae e Cyclosporophyceae reflita uma diferença fundamental na biossíntese destas fucanas, mas esta afirmação requer que exemplos adicionais de fucanas com a estrutura química elucidada sejam confirmados (BILAN et. al., 2002).

Com o objetivo de elucidar a estrutura química das fucanas de mais um exemplar de alga parda pertencente a ordem Fucales, BILAN et. al. (2002) estudaram as fucanas sulfatadas de *Fucus evanescens* (Cyclosporophyceae, Phaeophyta). Este estudo foi realizado mediante análises de RMN (^1H 1D e 2D e ^{13}C) das frações dessulfatadas e desacetiladas, sendo que os dados obtidos foram confirmados por análises de metilação do polissacarídeo em sua forma nativa e dessulfatada. Sendo assim, a fucana isolada de *F. evanescens* foi descrita como tendo uma cadeia principal linear alternando unidades de α -L-fucopiranosose 3-O- e 4-O-ligadas. Os grupos sulfato ocupam a posição C-2 das unidades de fucose. Segundo os autores a estrutura básica deste polissacarídeo é mascarada por sulfatação parcial em C-4 das unidades de α -L-fucose 3-ligadas e por acetilação ao acaso dos grupos -OH remanescentes.

Visto que as fucanas de *F. evanescens*, assim como as de outros representantes de Fucales, apresentam uma cadeia principal constituída por unidades alternantes de α -L-fucose (1→3)- e (1→4)-ligadas, BILAN et. al. (2004) investigaram também as fucanas de *Fucus distichus*, um outro representante do gênero *Fucus*. As fucanas de *F. distichus* apresentaram uma estrutura essencialmente regular formada por unidades dissacarídicas trissulfatadas. Devido a

esta regularidade, estas fucanas puderam ter sua estrutura elucidada por espectroscopia de RMN do polissacarídeo nativo, não sendo necessárias modificações químicas do polímero (dessulfatação, desacetilação). Como em muitos representantes da ordem Fucales, a cadeia principal das fucanas de *F. distichus* também é formada por unidades alternadas de fucose 3- e 4-ligadas, sendo a estrutura proposta para estas fucanas como: $\rightarrow 3)-\alpha\text{-L-fucp-(2,4-di-SO}_3^-)-(1\rightarrow 4)-\alpha\text{-L-fucp-(2SO}_3^-)-(1\rightarrow$.

BILAN et al. (2006) obtiveram ainda uma fração (F4) da alga parda *Fucus serratus* por cromatografia de troca iônica em DEAE-Sephacel. O polissacarídeo descrito é diferente das fucanas conhecidas em muitos aspectos. Como muitos outros polissacarídeos obtidos de Fucales, este contém uma cadeia principal alternando unidades de $\alpha\text{-L-fucose 3- e 4-ligadas}$, mas as ligações (1 \rightarrow 4) prevalecem sobre as ligações (1 \rightarrow 3), e, portanto algumas cadeias são constituídas apenas por $\alpha\text{-L-fucose (1}\rightarrow 4)$ ligadas. Aproximadamente metade das unidades 3-O-ligadas da cadeia principal estão substituídas em C-4 por três unidades de fucose. Fragmentos curtos de uma $\beta\text{-xilana}$ também estão presentes como cadeia lateral. Os grupos sulfato esterificam principalmente C-2 e os grupamentos acetil C-4 nas unidades de $\alpha\text{-L-fucose 3-O-ligadas}$ e C-3 nas unidades de $\alpha\text{-L-fucose 4-O-ligadas}$.

As fucanas presentes nas algas pardas são usualmente polissacarídeos irregulares muito complexos (DUARTE et. al., 2001; PONCE et. al., 2003). Sendo assim, apesar de em alguns casos existir certa regularidade no padrão de ligações glicosídicas, essa pode ser mascarada pelo padrão de sulfatação não regular apresentado por estas fucanas (BILAN et. al., 2004).

Apesar dos numerosos estudos realizados, a estrutura química fina da maioria das fucanas permanece não esclarecida. Devido a grande complexidade apresentada por estes polímeros, as análises estruturais de fucanas nativas por métodos químicos, bem como por espectroscopia de RMN, fornecem apenas informações parciais sobre suas estruturas (MULLOY; MOURÃO; GRAY, 2000).

As fucanas de *S. stenophyllum*, descritas por DUARTE et. al. (2001), podem ser citadas como um exemplo da complexidade da estrutura destes polissacarídeos. No estudo envolvendo estas fucanas foram obtidas seis frações que puderam ser divididas em dois grupos distintos. O primeiro foi caracterizado por apresentar altas percentagens de ácido $\alpha\text{-D-glucurônico}$ e baixo conteúdo de grupos O-sulfato, sendo

composto principalmente por unidades de fucose, xilose e galactose. Este grupo apresentou atividade anticoagulante muito baixa, como observado para outras fucanas sulfatadas com características químicas similares (NAGUMO; NISHINO, 1996). A cadeia principal de uma das fucanas de *S. Stenophyllum*, que é representativa deste primeiro grupo, é formada por unidades de β -D-manose (1 \rightarrow 2)-ligadas juntamente com unidades de β -D-galactose (1 \rightarrow 6), (1 \rightarrow 4) e (1 \rightarrow 3)-ligadas. As ramificações são constituídas principalmente por unidades de α -L-fucose (1 \rightarrow 4)-ligadas e unidades de ácido glucurônico. Em menor percentagem foram observadas unidades de fucose (1 \rightarrow 3) e (1 \rightarrow 2)-ligadas, unidades de glucose (1 \rightarrow 4)-ligadas e unidades terminais de xilose substituídas em C-3 nas unidades de fucose. Os principais pontos de ramificação estão em C-3 e C-4 das unidades de manose (1 \rightarrow 2)-O-ligadas (na cadeia principal) e em C-3 das unidades de ácido α -D-glucurônico (1 \rightarrow 4)-ligadas e/ou de glucose nas ramificações. A maioria dos grupos sulfato ocupa a posição C-3 das unidades de fucose (1 \rightarrow 4)-ligadas, diferentes carbonos das unidades de galactose e C-3 e C-6 das unidades de manose dissulfatadas (1 \rightarrow 2)-ligadas.

O segundo grupo de fucanas isoladas de *S. stenophyllum*, foi caracterizado por apresentar baixa percentagem de ácido α -D-glucurônico e alta percentagem de grupos sulfato, localizados nas unidades de fucose. Fucose e galactose foram os principais componentes monossacarídicos desta fração. Este grupo, apesar de apresentar alto teor de grupos sulfato, apresentou baixa atividade anticoagulante, sendo demonstrado que o conteúdo de grupos sulfato é apenas um dos fatores requeridos para esta atividade. Este tipo de fucana mostrou-se menos ramificado que o primeiro, sendo a cadeia principal formada principalmente por unidades de galactose (1 \rightarrow 6)-ligadas juntamente com quantidades menores de unidades de galactose (1 \rightarrow 4), (1 \rightarrow 3) e (1 \rightarrow 2)-ligadas, além de unidades de manose (1 \rightarrow 4)-ligadas. As ramificações são formadas principalmente por unidades de fucose (1 \rightarrow 3)-ligadas com menores quantidades de fucose 4- e 2-ligadas e ácido glucurônico. Muitos dos grupos sulfatos das ramificações estão em C-2 e C-4 das unidades de fucose dissulfatadas (1 \rightarrow 3)-ligadas e em C-4 ou C-2 das unidades de fucose (1 \rightarrow 3) e (1 \rightarrow 4)-ligadas, respectivamente. As unidades de galactose dissulfatadas da cadeia principal contêm grupos sulfatos em C-2, C-3 e C-3, C-4 das

unidades de galactose (1→6)-ligadas. Unidades monossulfatadas de galactose podem ter seus grupos sulfato em qualquer uma das posições.

Como outro exemplo de complexidade pode-se citar as fucanas obtidas de *Hizikia fusiforme*, onde uma fração (F32) foi obtida por cromatografia de troca iônica em DEAE Sepharose CL-6B seguida de cromatografia de gel-filtração em Sepharose CL-6B. Esta fração foi submetida à degradação de Smith, dessulfatação e, visto a grande complexidade ainda apresentada pelo polissacarídeo, à hidrólise ácida parcial. As principais frações obtidas a partir da hidrólise, bem como os polissacarídeos na sua forma nativa e dessulfatada, foram submetidas a análises de metilação e espectroscopia de RMN. Nesse estudo observou-se que a alga parda *H. fuziforme* produz um tipo de fucana em que o *core* é constituído por unidades alternantes de →2)-α-D-Man(1→ e →4)-β-D-GlcA(1→, com menores proporções de unidades de →4)-β-D-Gal(1→. Os pontos de ramificação estão em C-3 das unidades de →2)-Man(1→, em C-2 de →4)-Gal(1→ e em C-2 de →6)-Gal(1→. Cerca de dois terços das unidades da fucose estão como terminais não redutores, e o remanescente destas unidades se apresentam (1→4)-ligadas. A maioria das unidades de manose se apresentam (1→2)-ligadas, e dois terços delas apresentam ramificações em C-3. As unidades de galactose estão principalmente (1→6)-ligadas e os grupos sulfato estão localizados em C-6 das unidades de →2,3)-Man-(1→, em C-4 e C-6 das unidades de →2)-Man-(1→, C-3 de →6)-Gal-(1→, C-2, C-3 ou C-4 de fucose, sendo que algumas unidades de fucose se apresentam di-sulfatadas. Não foi determinada a presença de grupos sulfato nas unidades de xilose e ácido glucurônico. As configurações absolutas das unidades monossacarídicas foram α-D-manp, α-L-Fucp, α-D-Xylp, β-D-Galp e , β-D-GlcpA (LI et. al., 2006).

Além da heterogeneidade e polidispersidade, a dificuldade da extração e do isolamento das fucanas em sua forma pura são fatores que limitam seu estudo estrutural (MABEAU; KLOAREG; JOSELEAU, 1990; DANIEL et. al., 1999).

Nos últimos anos novas técnicas cromatográficas têm sido aplicadas com o objetivo de se obter frações de fucanas purificadas provenientes de algas pardas. O emprego de cromatografia de troca iônica combinada com a cromatografia de partição centrífuga, ou cromatografia de contracorrente, tem apresentado resultados promissores. Como exemplo pode ser citado as fucanas extraídas de *Ascophyllum nodosum* foram fracionadas com base na sua massa molecular e conteúdo de

grupos sulfato, sendo a eficiência deste método confirmada por cromatografia de exclusão molecular de alta performance (HPSEC) (CHEVOLOT et. al., 1998).

Em outro trabalho, CHEVOLOT et. al. (1999) empregam esta mesma técnica cromatográfica e conseguem, eficazmente, purificar fucanas de baixa massa molecular de *A. nodosum*. Uma fração em particular foi obtida por hidrólise ácida seguida de cromatografia de partição centrífuga e foi analisada por RMN de ^1H 1D e 2D. As demais frações foram obtidas por métodos que envolviam a degradação por radicais HO^\bullet , sendo algumas submetidas ainda a uma etapa sucessiva de purificação por cromatografia de troca iônica a baixa pressão. Posteriormente, CHEVOLOT et. al. (2001) verificaram que uma destas frações é constituída por um oligossacarídeo com massa molecular de 3090 Da, consistindo aproximadamente de 8-14 unidades de fucose. Esta fração, que é representativa de fragmentos da cadeia principal da fucana de *A. nodosum*, é formada por um dissacarídeo repetitivo, composto por $[\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-L-Fuc}(2\text{SO}_3^-)\text{-(1}\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-L-Fuc}(2,3\text{diSO}_3^-)\text{-(1)}_n$, estabelecido através de análises de metilação e espectroscopia de RMN. Essa mesma estrutura foi reconhecida para uma fração de fucanas de *Fucus vesiculosus*.

A composição química da maioria das preparações de fucanas obtidas de *A. nodosum* sugere que esta alga sintetiza uma significativa proporção de fucanas do tipo xilofucoglucuronana (MABEAU; KLOAREG; JOSELEAU, 1990). No entanto a estrutura exata de fucanas puras de *A. nodosum*, bem como seu padrão de sulfatação, é ainda bastante incerta, visto que somente partes da estrutura tem sido claramente estabelecidas (DANIEL et. al., 1999; CHEVOLOT, 1999; CHEVOLOT, 2001).

MARAIS e JOSELEAU (2001) obtiveram a partir de *A. nodosum* uma fração pura de fucanas, a qual era constituída por uma homofucana sulfatada. A análise de composição monossacarídica demonstrou que esta fração é composta por L-fucose (95%) e menores proporções de xilose (5%). A dosagem total de sulfato indicou a presença de um grupo sulfato para cada dois resíduos de fucose. A combinação de análises, como degradação de Smith, análise de metilação, dessulfatação e espectroscopia de RMN e FT-IR, revelou que os polissacarídeos desta fração apresentam uma cadeia principal constituída por unidades de $\alpha\text{-L-fucose}$ (1 \rightarrow 3)-ligadas em sua grande maioria, além de outras poucas unidades de $\alpha\text{-L-fucose}$ (1 \rightarrow 4)-ligadas. Essa cadeia se apresenta altamente ramificada, sendo que os

principais pontos de ramificação são em C-2 das unidades internas 3-ligadas, onde a elevada proporção de unidades de fucose como terminais não redutores indicam que grande parte destas unidades compõe cadeias laterais curtas que são formadas apenas por unidades simples ou múltiplas deste monossacarídeo. As substituições por grupos sulfato ocorrem principalmente nas posições C-2 e/ou C-4, tanto na cadeia principal quanto nas unidades laterais.

Diferentes técnicas têm sido usadas para a extração de fucanas livres de contaminantes (como por exemplo, laminaranas e alginatos) (BERNARDI; SPRINGER, 1962; MIAN; PERCIVAL, 1973). Estas incluem a utilização de solventes contendo cálcio, extração em meio ácido, ou simplesmente água (MIAN; PERCIVAL, 1973; DUARTE et. al., 2001; MARAIS; JOSELEAU, 2001).

1.2.4 Estrutura X Atividade Biológica das Fucanas Sulfatadas

PONCE et. al. (2003) descrevem os estudos de estrutura e atividade biológica (antiviral) dos polissacarídeos obtidos a partir da alga parda *Adenocystis utricularis*. Várias frações foram obtidas através de extrações independentes empregando água, CaCl_2 a 2% e HCl pH 2, sendo todas as extrações realizadas inicialmente à temperatura ambiente, e posteriormente, de forma exaustiva a 70° C. Estas extrações foram realizadas subseqüentemente a um tratamento com etanol 80%, com o intuito de remover manitol, sais e outros produtos contaminantes de baixa massa molecular. Apenas uma destas frações, uma galactofucana, mostrou alta atividade contra o vírus Herpes simplex (HSV) e ausência de atividade citotóxica. Os dados obtidos quanto à estrutura do polissacarídeo sugerem a presença de um esquema complexo, no qual há presença de unidades de fucopiranosose 3-ligadas com presença de grupos sulfato em C-4, ramificações em C-2, ou ambos em conjunto. Os dados obtidos através da análise de metilação indicam a presença de unidades de fucofuranose como terminais destituídos de grupos sulfato. Uma alta dispersão das unidades de galactose foi encontrada, semelhante à descrita por DUARTE et. al. (2001). As unidades de galactopiranosose, pertencentes à série D, estão principalmente (1→3)- e (1→6)-ligadas, com grupos sulfato na posição C-4.

Muitos estudos envolvendo as fucanas de algas pardas têm sido desenvolvidos devido às diversas atividades biológicas apresentadas por estes

polissacarídeos, tais como, atividade anticoagulante (NAGUMO; NISCHINO, 1996; CHAUBET et. al., 2000), antitumoral (ITOH et al., 1993) e antiviral (BABA et. al., 1988; MCCLURE et. al., 1992). Dentre outras atividades, estes polissacarídeos podem agir ainda como ligantes para selectinas (YOSHIDA et. al., 1994; PREOBRAZHENSKEYA et. al., 1997) e como protetores da mucosa gástrica contra a atividade proteolítica do ácido clorídrico estomacal (SHIBATA et. al., 2000).

As atividades biológicas das fucanas têm sido relacionadas ao elevado grau de sulfatação desses polímeros, embora estas atividades dependam da estrutura química fina e do peso molecular (USOV et. al., 1998).

Em um trabalho desenvolvido por BLONDIN et. al. (1996) foram estudadas as relações entre as características estruturais e a atividade de inibição do sistema complemento exibida pelas fucanas. Para tal foram utilizadas as fucanas sulfatadas obtidas da alga parda *Ascophyllum nodosum*, que após hidrólise ácida parcial e purificação por cromatografia de gel-filtração (Sephacryl S-300HR), deram origem a 20 frações de fucanas com massa molecular variando de 4.100 a 214.000Da. Essas frações apresentaram, além de pesos moleculares diferentes, variações nos constituintes monossacarídicos e no conteúdo de grupos sulfato. Neste estudo foi verificado que o grau de sulfatação não é um requerimento suficiente para a atividade anti-complemento, e que o aumento do conteúdo de galactose e ácido glucurônico nestas fucanas acompanha o aumento desta atividade. Tendo verificado que o peso molecular também acompanhou o aumento da atividade, os autores não puderam determinar qual dos fatores (composição monossacarídica ou peso molecular) está envolvido na variação da atividade anticomplemento.

Muitos inibidores sintéticos do sistema complemento têm sido descritos (DOLL; BAKER, 1976; HONG et. al., 1979; MAUZAC et. al., 1985), mas muitos destes compostos são tóxicos e a maioria deles é requerida em altas concentrações para inibirem a ativação do complemento *in vitro* e *in vivo* (ASGHAR, 1984).

A heparina também apresenta atividade inibidora de lise dos eritrócitos por inibir o sistema complemento, mas altas concentrações são exigidas para que ocorra uma inibição significativa *in vivo* (WEILER et. al., 1992). Estas altas concentrações constituem um obstáculo para a administração de heparina devido à atividade anticoagulante exercida por esta substância. Sendo assim, as fucanas são uma boa

alternativa para este caso, visto que são muito mais potentes e por isso promovem a inibição do complemento em quantidades muito menores (BLONDIN et. al. 1996).

ZVYANTSEVA et. al. (2000) também estudaram a atividade apresentada pelas fucanas como inibidoras da ativação do complemento. A partir das algas pardas *Laminaria cichorioides*, *Laminaria japonica* e *Fucus evanescens*, foram obtidas as fucanas utilizadas neste trabalho, que diferiam apreciavelmente entre si quanto à composição monossacarídica e grau de sulfatação. Uma fração de uma homofucana pura de *L. cichorioides* apresentou 100% de α -L-fucose como constituinte monossacarídico, além de um excepcional grau de sulfatação (38%), supondo que praticamente cada resíduo de fucose contem dois grupos sulfato. As outras frações de fucanas utilizadas se apresentaram como heterofucanas e com um menor conteúdo de grupos sulfato. A homofucana foi a que apresentou a melhor atividade de inibição do complemento, sendo que as concentrações requeridas para promover 50% da inibição foram de 0,5-0,7mg/ml, enquanto que as frações de heterofucanas foram requeridas em concentrações de 6 a 20mg/ml para promover a mesma inibição. A comparação da atividade da homofucana com as heterofucanas utilizadas no trabalho, demonstrou que o decréscimo no teor de grupos sulfato não foi refletido na concentração necessária para causar os mesmos 50% de inibição. Desta forma, os autores concluíram que o grau de sulfatação não influencia a atividade destas fucanas no processo de inibição do complemento. As fucanas que se apresentaram altamente heterogêneas em seus conteúdos monossacarídicos, diferiram entre si quanto à atividade biológica. Provavelmente a perda dos grupos sulfato seja compensada por algumas outras peculiaridades estruturais, como por exemplo, diferenças no conteúdo monossacarídico ou tipo de ligações glicosídicas. A influência positiva das unidades de fucose na estrutura dos polissacarídeos é óbvia quando é comparada a atividade exercida pelas heterofucanas com a das homofucanas, e também quando estas são comparadas às galactanas. Os dados obtidos neste trabalho se mostraram coerentes com os obtidos por BLONDIN et. al. (1996).

Dentre as diversas atividades biológicas apresentadas pelas fucanas tanto *in vitro* como *in vivo* (BABA et. al., 1988; NAGUMO; NISHINO, 1996), particularmente a atividade anticoagulante tem sido amplamente estudada (NAGUMO; NISHINO, 1996).

MOURÃO e PEREIRA (2000), com o intuito de buscar alternativas para o uso de heparina, realizaram um trabalho onde são avaliadas as atividades anticoagulantes exercidas por polissacarídeos sulfatados. Neste trabalho os autores fazem uma comparação entre a atividade exercida pelas fucanas obtidas de equinodermos e de algas pardas. Estas últimas são as candidatas para futuros estudos de atividade anticoagulante *in vivo*, visto que são mais potentes. Ainda neste trabalho a comparação entre as fucanas obtidas de três espécies de algas mostrou a mesma atividade para as fucanas de *Fucus vesiculosus* e *Ascophyllum nodosum*, sendo que *Laminaria brasiliensis* expressou uma atividade muito mais forte. Após o processo de dessulfatação a atividade anticoagulante exercida por estas espécies foi abolida totalmente. É difícil estabelecer uma exata correlação entre a estrutura e atividade biológica destas fucanas, visto que estas não apresentam sua estrutura química completamente elucidada, mas algumas correlações podem ser estabelecidas visto que as fucanas de *F. vesiculosus* e *A. nodosus* apresentam estruturas químicas similares, diferentemente de *L. brasiliensis*. O motivo exato pelo qual *L. brasiliensis* apresentou a maior atividade não é claro, mas o conteúdo de grupos de sulfato apresentado por esta fucana é menor do que o das fucanas de *F. vesiculosus*. Sendo assim os autores concluíram que a atividade biológica não é devida meramente ao efeito da densidade de cargas apresentada pelo polissacarídeo.

MULLOY, MOURÃO e GRAY (2000) afirmam que o efeito biológico exercido pelos polissacarídeos sulfatados é dependente de um padrão exato de substituição destes grupos sulfato na estrutura polissacarídica, visto que as funções biológicas dependem da ligação altamente específica da estrutura do carboidrato a uma proteína. Os autores comentam ainda que a razão pela qual fucanas complexas obtidas de algas pardas apresentam uma alta atividade anticoagulante ainda não é bem esclarecida, mas esta razão pode residir no padrão de sulfatação exibido pelas unidades de fucose presentes nas ramificações destes polissacarídeos, visto que estas ramificações não estão presentes nas fucanas sulfatadas de invertebrados marinhos.

As fucanas obtidas de algas marinhas, mesmo que apresentem algumas regularidades estruturais, não são facilmente deduzidas por métodos clássicos de determinação de estrutura de carboidratos (MOURÃO; PEREIRA, 2000).

Diferentemente, devido à linearidade das cadeias polissacarídicas e ao padrão regular de sulfatação, as fucanas sulfatadas obtidas de equinodermos podem ser determinadas por espectroscopia de RMN, e assim a correlação entre estrutura e atividade biológica pode ser estabelecida (MULLOY; MOURÃO; GRAY, 2000). Uma variedade de polissacarídeos sulfatados obtidos destes invertebrados marinhos apresenta uma estrutura química regular e bem definida, sendo estes polissacarídeos utilizados como ferramentas usuais para a elucidação dos detalhes estruturais responsáveis por tais atividades (MOURÃO; PEREIRA, 2000).

Atualmente, as peculiaridades da estrutura química fina das fucanas têm sido utilizadas para, além de estabelecer a correlação entre estrutura-atividade biológica, o desenvolvimento de projetos de drogas farmacêuticas. Como exemplo, pode ser citado a unidade dissacarídica repetitiva nas fucanas de *Ascophillum nodosum* e *Fucus vesiculosus*, onde considerações nas posições dos grupos sulfato são críticas para a atividade anticoagulante (CHEVOLOT et al. 2001).

As funções dos polissacarídeos sulfatados em sistemas biológicos têm atraído a atenção dos pesquisadores nas últimas décadas, sendo os polissacarídeos sulfatados extraídos de algas marinhas uma fonte de compostos com potenciais aplicações na área médica (NARDELLA et al., 1996).

NISHINO et. al. (1999) relataram que uma fração de fucanas de *E. kurome* (C-II) apresentou atividade antitrombótica, sendo esta devida tanto a aceleração do cofator II da heparina na inibição da trombina quanto a inibição da geração de trombina por bloquear a formação de protrombina. Em um outro trabalho, a fração C-II de *E. kurome* foi descrita por NISHINO et.al. (1991) como sendo um novo tipo de fucana constituída por uma cadeia principal formada por unidades de L-fucose (1→3)-ligadas com os grupos sulfato ocupando principalmente a posição C-4 destas unidades. Esta fucana se apresenta altamente ramificada, com terminais não redutores de fucose tanto na forma piranosídica quanto furanosídica. Unidades de fucose e galactose piranosídicas 2,3-di- e 2,3,4-tri-substituídas também estão presentes.

Outra fração de *E. kurome* (C-I) apresenta atividade trombolítica, mas o mecanismo pelo qual é exercida esta atividade deve-se ao fato de que estas fucanas promovem um aumento da ativação do plasminogênio, que é convertido a plasmina (enzima do sistema fibrinolítico) (RIJKEN; WIJNGAARDS; WELBERGEN, 1981).

Em um trabalho desenvolvido por ANDREWS et. al. (2005), foi visto que assim como outros polissacarídeos sulfatados, as fucanas isoladas de *Fucus vesiculosus* apresentam atividade antimalárica, pois inibem a invasão dos eritrócitos humanos por merozoítos de *Plasmodium falciparum*, assim como a citoaderência de eritrócitos parasitados aos receptores celulares do hospedeiro. Neste trabalho os autores citam as fucanas de *F. vesiculosus* como sendo formada principalmente por unidades de α -L-fucose (1 \rightarrow 2)-ligadas com grupos sulfato ocupando a posição C-4, estrutura que foi proposta por CONCHIE e PERCIVAL⁸, citado por CHIZHOV et al., 1999. Esta estrutura foi aceita por muitos anos, mas recentemente foi revisada e as análises de RMN em conjunto com os resultados de metilação (obtidos por CLG-EM), indicaram que a cadeia principal deste polissacarídeo é formada por α -L-fucose (1 \rightarrow 3)-ligada com algumas ramificações O-2 ou O-4-ligadas, sendo algumas unidades sulfatadas em C-4 (PATANKAR et. al., 1993).

A maioria dos estudos biológicos tem sido realizada com preparações comerciais de fucanas obtidas de *F. vesiculosus* (CHIZHOV et al., 1999), visto que estes polissacarídeos têm sido caracterizados em detalhes quanto à sua estrutura química.

Por dividir algumas propriedades biológicas com a heparina, as fucanas sulfatadas constituem moléculas polianiónicas alternativas com perfis farmacológicos semelhantes (MOURÃO; PEREIRA, 2000).

Alguns polissacarídeos aniônicos, como a heparina, têm mostrado a capacidade de neutralizar as fosfolipases presentes no veneno de serpentes (LOMONTE et. al., 1994). A partir destes dados, ÂNGULO e LOMONTE (2003) decidiram investigar a capacidade de fucanas sulfatadas para inibir as atividades tóxicas promovidas por estas fosfolipases. Neste trabalho foram utilizadas as fucanas da alga parda *F. vesiculosus*, sendo demonstrado que estas fucanas sulfatadas inibiram eficientemente tanto os efeitos citotóxicos (*in vitro*) quanto os efeitos miotóxicos (*in vivo*) produzidos por um grupo de fosfolipases miotóxicas purificadas de diferentes serpentes venenosas. O mecanismo de inibição das fucanas contra estas fosfolipases parece ser a capacidade de uma rápida formação de complexos, provavelmente mediada por interações eletrostáticas entre os sulfatos

⁸ CONCHIE, J.; PERCIVAL, E. G. V. **Chem. Soc.**, p. 827-832, 1950.

aniônicos do polissacarídeo e os numerosos resíduos de aminoácidos catiônicos presentes na toxina.

KOYANAGI et. al. (2003) relataram as propriedades antitumorais apresentadas pelas fucanas de *F. vesiculosus*. Neste trabalho foram utilizadas as fucanas em sua forma nativa e na forma sulfatada, sendo observado que o aumento do grau de sulfatação pode potencializar a atividade antitumoral exercida por estas fucanas. O efeito inibitório apresentado por estes polissacarídeos é devido à sua potência anti-angiogênica, levando o tumor a ficar sem nutrientes e sem oxigênio. Essa atividade anti-angiogênica é devida à inibição da ligação do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF₁₆₅) aos receptores presentes na superfície das células (KOYANAGI et. al., 2003).

Em uma revisão sobre compostos com atividade anti-HIV, SHAEFFER & KRYLOV (2000) comentam que, assim como outros polissacarídeos sulfatados, as fucanas apresentam atividade contra o vírus HIV, visto que algumas frações de fucanas isoladas de *F. vesiculosus* foram eficientes na inibição do vírus sem apresentar citotoxicidade. Os autores citam também as fucanas obtidas de *Sargassum horneri*, que apresentaram uma potente atividade contra HSV-1, citomegalovírus humano e HIV-1, sendo que neste último a fucana foi capaz de inibir tanto os estágios iniciais da infecção viral (ataque e penetração do vírus à células hospedeiras) quanto os estados de replicação viral.

A caracterização química das fucanas depende do grau de pureza destes polissacarídeos. Sendo assim, a correta extração e purificação são imprescindíveis para que a estrutura química fina seja determinada, e assim correlacionada com as atividades biológicas exercidas por estes compostos.

Deste modo, destaca-se a importância do estudo de fucanas sulfatadas obtidas de diferentes espécies de algas pardas, uma vez que a estrutura química fina destes polissacarídeos foi investigada em relativamente poucas espécies, apesar das várias aplicações nas áreas biomédica e industrial.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Estudo da estrutura química fina dos polissacarídeos solúveis em meio aquoso extraídos da alga marinha *Lobophora variegata*.

2.1.1 Objetivos Específicos

- Extração e purificação dos polissacarídeos de *L. variegata* solúveis em meio aquoso (~96 °C).
- Determinação da estrutura química fina das principais frações polissacarídicas de *L. variegata*, empregando métodos químicos e espectroscópicos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAL

Neste trabalho foram estudados os polissacarídeos da alga parda *L. variegata*. Segue abaixo a foto e a classificação da alga.

FIGURA 1 – FOTO DA ALGA PARDA *Lobophora variegata*



Divisão: Phaeophyta (atualmente denominada Heterokontophyta)

Classe: Phaeophyceae

Ordem: Dictyotales

Família: Dictyotaceae

Gênero: *Lobophora*

Espécie: *Lobophora variegata* (J.V. Lamour.) Womersley ex E.C. Oliveira 1977:217

3.2 COLETA E PROCESSAMENTO

Os exemplares da alga parda *L. variegata* foram coletados na praia Mirante da Sereia, Maceió, Alagoas, em 2000. A espécie foi classificada pela Dra. Silvia Maria Pita de Beuclair Guimarães do Instituto de Botânica de São Paulo-SP.

Os exemplares desta espécie foram lavados com água doce, secos ao sol e moídos em moinho de faca (WILLEY MILL).

3.3 MÉTODOS ANALÍTICOS GERAIS

3.3.1 As dosagens de açúcares totais foram realizadas pelo método do fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS et al., 1956), utilizando fucose para a construção de curva padrão.

3.3.2 As dosagens de proteínas foram realizadas pelo método de LOWRY et al. (1951), utilizando-se o reativo de Folin-Ciocalteu e solução de soro-albumina bovina cristalina para a construção de curva padrão.

3.3.3 O teor de grupos sulfato foi determinado pelo método de DODGSON (1961), após hidrólise das amostras com HCl 1,0M, 5 horas, 105° C. Sulfato de sódio foi utilizado para a construção da curva padrão.

3.3.4 A determinação da rotação óptica específica ($[\alpha]_D^{25}$) foi realizada em polarímetro RUDOLPH RESEARCH, modelo Autoplol III, a 20° C, onde a concentração das amostras foi de 0,2 g% em água.

3.3.5 As dosagens de ácidos urônicos foram realizadas pelo método *m*-hidroxibifenil (FILISSETTI-COZZI; CARPITA, 1991). Ácido glucurônico foi utilizado para a construção da curva padrão.

3.3.6 As pesagens foram realizadas em balança analítica METTLER TOLEDO, modelo AB204 e balança semi-analítica ACCULAB modelo V-1200.

3.3.7 As evaporações e concentrações das soluções foram realizadas em rotaevaporador FISATOM, modelo 802, sob pressão reduzida, com temperaturas não superiores a 60°C.

3.3.8 As liofilizações das soluções foram feitas em aparelho EDWARDS.

3.3.9 As centrifugações foram realizadas em centrífuga HITACHI, modelo Himac CR21E (8.000 rpm, a 25°C, durante 20 minutos).

3.3.10 Os reagentes e solventes que foram utilizados apresentam grau de pureza P.A.

3.4 EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DAS FUCANAS DA ALGA PARDA *L. variegata*.

A alga seca e moída (184,5g) foi submetida à extração aquosa (10g/%) a 25° C, sob agitação mecânica por 12 horas. Este processo de extração a frio foi realizado três vezes, e o resíduo foi submetido à extração aquosa a ~96° C, por 12 horas, sob agitação mecânica. Em ambos os processos de extração, a 25 e a ~96° C, após centrifugação, a 8000 r.p.m. por 20 min. a 25° C, os sobrenadantes foram tratados com três volumes de etanol e os precipitados foram ressolubilizados em água destilada e liofilizados, originando a fração de fucanas obtidas da extração aquosa a 25° C (LV) e a fração obtida da extração aquosa a ~96° C (LVQ).

A fração obtida da extração aquosa a ~96° C foi submetida a processos de purificação por métodos cromatográficos (cromatografia de troca iônica e de gel filtração). Após a purificação, as principais frações foram analisadas por métodos químicos e espectroscópicos.

3.5 CARBOXIRREDUÇÃO

O processo de carboxirredução foi realizado pelo método de TAYLOR e CONRAD (1972), onde o polissacarídeo foi solubilizado em tampão MES 0,2M (pH 4,75). Em seguida foi adicionada carbodiimida na proporção de 1,0 milimol de carbodiimida : 50µEq de carboxila. Após agitação por 1 hora e ajuste do pH a 7,0

pela adição de tampão TRIS 2,0 M, foi adicionado NaBH_4 (ou NaBD_4) até a obtenção de uma solução 2,0 M. Após 12 horas a 30°C e neutralização com HCl, o material foi dialisado contra água destilada e liofilizado.

3.6 DESSULFATAÇÃO POR TRATAMENTO SOLVOLÍTICO

3.6.1 Preparo do Sal de Piridônio

O processo de solvólise foi conduzido com os polissacarídeos na forma de sal de piridônio. Para formação deste sal as frações foram solubilizadas em água e a elas foi adicionada resina catiônica DOWEX 50X8 na forma H^+ , sob agitação magnética à temperatura ambiente por 30 minutos. O pH do sobrenadante ficou entre 1,0-2,0. O filtrado (obtido por filtração à pressão reduzida) foi neutralizado com piridina até pH 7,0 e liofilizado (STEVENSON, FURNEAUX, 1991).

3.6.2 Solvólise

Os polissacarídeos (nativos ou carboxireduzidos) na forma de sal de piridônio, foram solubilizados em uma mistura de dimetilsulfóxido, metanol e piridina, que segue a proporção de 89:10:1, respectivamente, respeitando-se a relação de 10,0 mg de polissacarídeo para 3,0 ml da mistura (NAGASAWA et al., 1979).

A solução resultante foi mantida a 100°C durante 4 horas. Após o resfriamento, as frações solvolisadas foram submetidas à diálise exaustiva contra água destilada e liofilizadas.

3.7 METILAÇÃO

O processo de metilação do polissacarídeo na forma de sal de trietilamônio foi conduzido de acordo com o método de CIUCANU e KEREK (1984). Após solubilização em DMSO (15,0 mg de polissacarídeo para cada 1,0 ml) foi adicionado NaOH pulverizado (30,0 mg), sendo esta mistura sob agitação por 20 minutos. Em seguida, foi adicionado iodometano (1,0 ml) e mantida a agitação por mais 1 hora. Após repouso de 16 horas à temperatura ambiente, as frações foram acidificadas (ácido acético 50%) até pH 5,0, dialisadas contra água destilada, liofilizadas e hidrolisadas (ácido fórmico 45%, 16 horas, 100°C). Os acetatos de alditóis parcialmente metilados, obtidos após derivatização das frações hidrolisadas, foram analisados por CLG-EM.

3.8 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

3.8.1 Cromatografia de Troca Iônica

No processo de purificação das fucanas obtidas da alga parda *L. variegata* foi utilizada a cromatografia de troca iônica em coluna contendo DEAE-SEPHACEL na forma Cl⁻. Os polissacarídeos foram eluídos inicialmente com água e posteriormente com soluções de NaCl em diferentes concentrações.

A detecção dos açúcares foi feita pelo método de fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS et al., 1956) entre uma eluição e outra.

Todas as frações obtidas após o fracionamento foram concentradas, dialisadas contra água destilada e liofilizadas.

A coluna utilizada apresenta 30,0 cm de altura por 5,0 cm de diâmetro.

3.8.2 Cromatografia Líquido-Gasosa (CLG)

As análises por cromatografia líquido-gasosa (CLG) foram realizadas em cromatógrafo HEWLETT PACKARD 5890, com detector de ionização de chama (300° C), injetor (250° C), sendo utilizado nitrogênio como gás de arraste (fluxo de 1,0ml/min) e coluna capilar de sílica fundida (30m x 0,25 mm d.i.), revestida com DB-225 (0,25µm). Foi utilizado também o cromatógrafo do fabricante Thermo electron corporation, modelo Trace GC Ultra, com detector de ionização de chama (250° C) e injetor (280° C), utilizando nitrogênio como gás de arraste e coluna capilar de sílica fundida (30m x 0,25 mm d.i.), revestida com OV-225 (0,25µm).

As análises dos acetatos de alditóis foram realizadas inicialmente na temperatura de 100° C com um aumento de 60° C/min até 220° C.

3.8.3 Cromatografia Líquido-Gasosa acoplada à Espectroscopia de Massa (CLG-EM)

As análises cromatográficas em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa foram realizadas em um cromatógrafo a gás "VARIAN", modelo Saturn 2000R, 3800, acoplado a um espectrômetro de massa também da marca VARIAN, modelo 2000R (tipo ion trap), equipado com coluna capilar de sílica fundida (30 m x 0,25 d.i.) modelo DB-23, marca J & W Scientific. Outra coluna utilizada foi a de sílica fundida (30 m X 0,25 d.i.) revestida com DB-225MS, também da marca J & W Scientific. As injeções nas colunas foram feitas mantendo-se a temperatura inicial em 50 °C, seguido de aumento de acordo com a programação de temperatura em um gradiente de 40° C por minuto, até 230° C, mantendo-se constante a partir deste valor. Foi utilizado hélio como gás de arraste, com fluxo de 1,0mL/min. As áreas dos picos de interesse foram determinadas por integração em software. Os espectros de massa foram obtidos por impacto de elétrons a 70 eV, repetidamente a cada 1/8 de segundo, abrangendo fragmentos com relação massa/carga (m/z) variando de 40 a 300. Este método foi utilizado para quantificação de acetatos de alditóis (SLONEKER, 1972), sendo identificados por meio de seus tempos de retenção e

perfis característicos de fragmentação por impacto de elétrons comparados com padrões descritos na literatura (JANSSON et al., 1976, CARPITA; SHEA, 1989).

3.8.4 Cromatografia de Gel Permeação (GPC - HPSEC-MALLS) – Análise de Homogeneidade e Massa Molecular

As análises por GPC foram realizadas em cromatógrafo de exclusão estérica de alta pressão (HPSEC) WATERS, equipado com um detector de índice de refração diferencial WATERS modelo 2410 e com detector de espalhamento de luz em multiângulos (MALLS) WAYTT TECHNOLOGY modelo DAWN DSP com 18 detectores dispostos ao redor da fotocélula em diferentes ângulos. Foram utilizadas 4 colunas de gel permeação WATERS, modelo ULTRAHYDROGEL 2000, 500, 250 e 100, com limites de exclusão de 7×10^6 , 4×10^5 , 8×10^4 e 5×10^3 , respectivamente, conectadas em série. A fase móvel utilizada foi uma solução de nitrito de sódio (NaNO_3 0,1M) contendo azida de sódio (200 ppm), a 20°C .

Para análise de homogeneidade foram preparadas soluções de amostra 1,0 mg/ml em nitrito de sódio (NaNO_3 0,1M). Essas soluções foram filtradas em membranas Millipore (acetato de celulose) com diâmetro de poro de 0,45 e 0,22 μm . A análise foi realizada utilizando-se injeções de 100 μl de solução em HPLC acoplado a detector de espalhamento de luz, com fluxo de 0,6 ml/min. Para determinação da massa molecular ponderal média (M_w) foi utilizado o valor de dn/dc obtido juntamente à análise de homogeneidade.

Para a determinação da variação do índice de refração com relação à concentração (dn/dc), foram preparadas soluções de 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1,0 mg das amostras em 1,0 ml de nitrito de sódio (NaNO_3 0,1M) e azida de sódio (200 ppm). As amostras foram filtradas em membranas Millipore 0,45 μm e armazenadas em frascos viais rigorosamente limpos. As análises foram realizadas utilizando-se injeções de 100 μl de cada solução em HPLC acoplado a detector de índice de refração.

Foi utilizado o programa ASTRA (WAYTT TECHNOLOGY) para análise dos dados obtidos. Para cada amostra pode se efetuar uma medida do espalhamento do

feixe luminoso em função da concentração do polímero e em função do ângulo. A relação que permite calcular M_w é:

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

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

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

λo = comprimento de onda da luz incidente

N = número de Avogadro

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

c = concentração do polímero

θ = ângulo do feixe de luz espalhado

A_2 = segundo coeficiente virial

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

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

R_θ = fator de Rayleigh, calculado através da seguinte equação

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

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

3.9 MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS - RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)

Os espectros de ressonância magnética nuclear foram obtidos em espectroscópio da marca BRUKER, modelo DRX 400, série Avance, incorporado à Transformada de Fourier. Empregaram-se tubos de 5 mm com as amostras dissolvidas em D₂O (99,9%), sendo as análises realizadas à temperatura de 50°C. Os deslocamentos químicos, expressos em δ (ppm), foram determinados utilizando acetona como padrão interno ($\delta = 30,2$).

3.9.1 Técnica de RMN Monodimensional: RMN de ¹³C

Os espectros de RMN de ¹³C foram obtidos na frequência base de 100,61 MHz, com intervalo de aquisição de sinal de 0,6 segundos, sendo feitas, em média, de 30.000 – 70.000 aquisições, utilizando-se um intervalo de 0,1 segundo entre os pulsos.

3.9.2 Técnica de RMN Bidimensional: HMQC

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

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

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 EXTRAÇÃO DAS FUCANAS DA ALGA PARDA *L. variegata*

As fucanas da alga parda *L. variegata* foram obtidas a partir da alga seca e moída, seguida de extração aquosa a 25° C sob agitação mecânica (12 horas). Após centrifugação, o sobrenadante (cujo volume foi reduzido por evaporação sob pressão reduzida) foi precipitado com etanol (3 vol.), ressolubilizado em água destilada e liofilizado, originando a fração polissacarídica denominada LV (7,4% de rendimento em relação à alga seca e moída) (ESQUEMA 1).

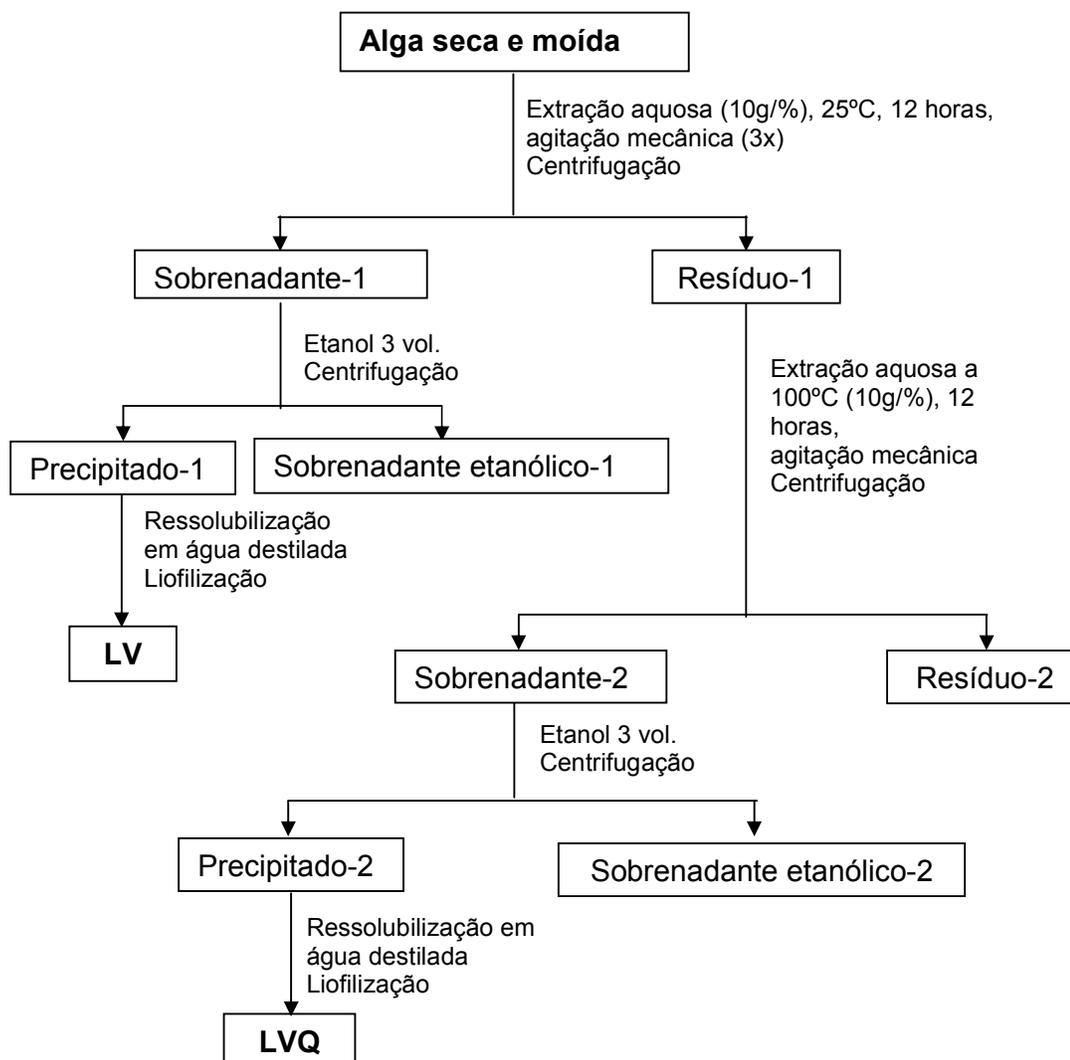
Sequencialmente a alga residual foi submetida à extração aquosa a quente (banho-maria de água fervente, 12 horas) sob agitação mecânica. Após centrifugação, o sobrenadante foi tratado de maneira idêntica a descrita anteriormente para o sobrenadante da extração á frio. A fração polissacarídica obtida a quente denominada LVQ apresentou rendimento de 3,2% em relação a alga seca e moída (ESQUEMA 1) e foi o objeto de estudo deste trabalho.

A composição monossacarídica de LVQ (TABELA 1) apresenta, além de outros monossacarídeos (fucose, xilose, manose, galactose, arabinose), glucose como principal constituinte (53,0%).

A presença de grande quantidade de glucose na fração LVQ pode ser devida à presença tanto da glucose constituinte das fucanas quanto da que compõe os polissacarídeos de reserva das algas pardas, as laminaranas. O espectro de RMN de ¹³C desta fração (FIGURA 2) confirma que pelo menos em parte a glucose é proveniente da laminarana, visto que os sinais correspondentes a este tipo de polissacarídeo se sobressaem quando comparados aos outros sinais presentes no espectro. São observados sinais em 102,8 e 102,6 ppm correspondentes ao C-1 de unidades de β-D-glucose 3- e 3,6-di-O-substituídas, representativos da estrutura de uma laminarana. São observados ainda os sinais em 73,2; 84,6; 68,2; 75,7 e 60,8 ppm, correspondentes ao C-2, C-3, C-4, C-5 e C-6 das unidades de glucose (1→3)-ligadas, respectivamente. Sinais em 73,6 e 69,7 ppm podem ser atribuídos a C-2 e C-4 das unidades de β-D-glucose não substituídas e em 74,6 e 68,8 ppm a C-5 e C-

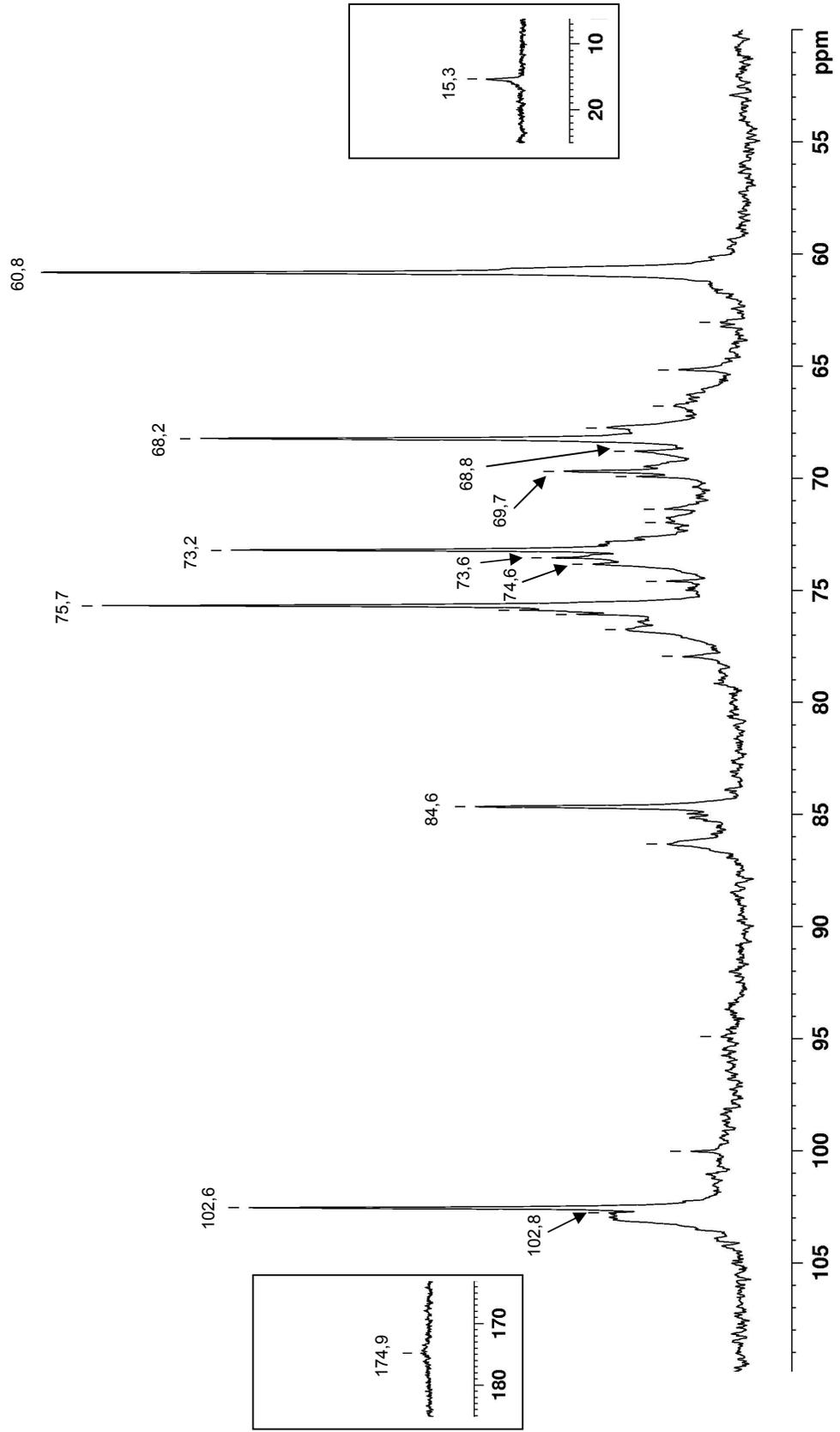
6 das unidades de β -D-glucose 3,6-di-O-substituídas (YAMADA, 1984; KIM, 2000; BORRISS et al., 2003).

ESQUEMA 1 – EXTRAÇÃO DAS FUCANAS DA ALGA PARDA *L. variegata*



CARDOSO (2003) estudou as laminaranas de *Pocockiella variegata* (atualmente descrita como *Lobophora variegata*), que apresentaram um espectro de RMN de ^{13}C com os mesmos deslocamentos químicos citados acima. Ainda neste trabalho, foi observado que se tratava de uma laminarana formada principalmente por cadeias M, visto que foi confirmada a presença de D-manitol como terminal redutor em proporções significativas nas cadeias de Glcp 3-O-substituídas.

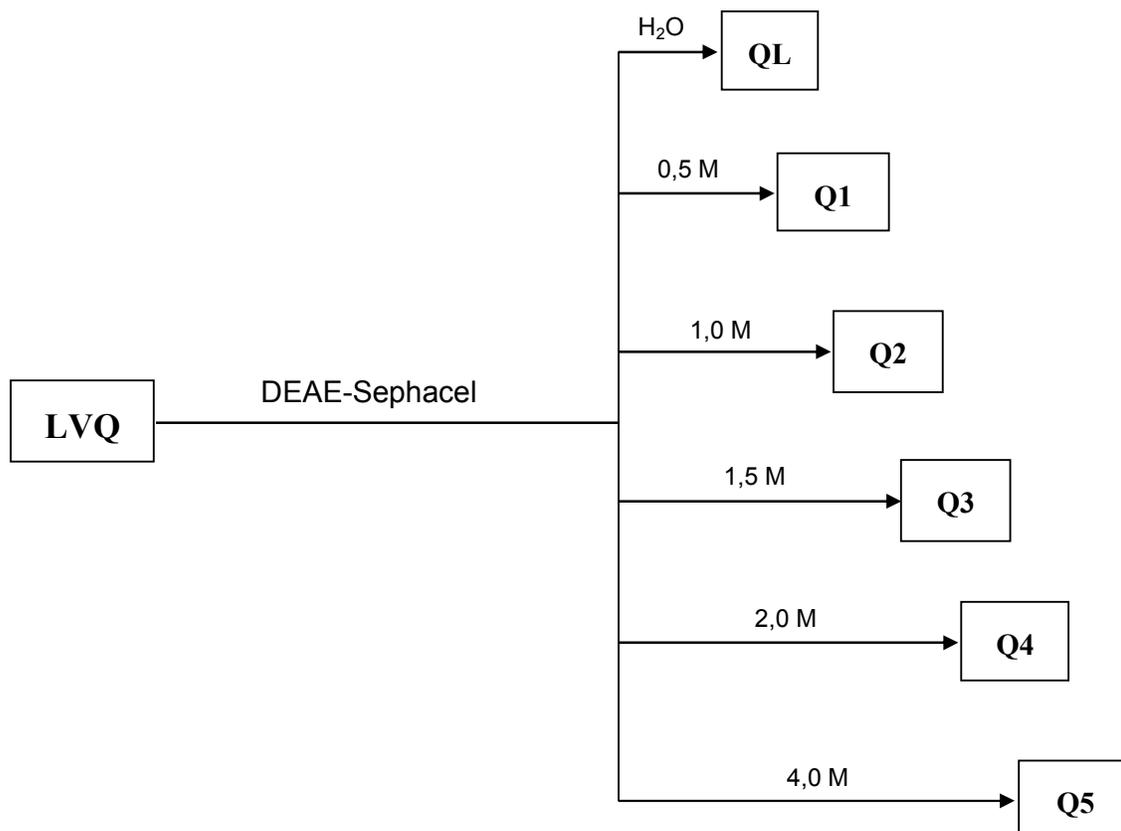
FIGURA 2- ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DA FRAÇÃO LVQ



4.2 - PURIFICAÇÃO E FRACIONAMENTO DAS FUCANAS DA ALGA PARDA *L. variegata*

Com a finalidade de obter fucanas sulfatadas, a fração LVQ foi fracionada por cromatografia de troca iônica em DEAE-SEPHACEL. A coluna foi inicialmente eluída com água destilada para a remoção dos polissacarídeos neutros, que neste caso são as laminaranas (fração QL), e com concentrações crescentes de NaCl (0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e 4,0 M), originando após diálise e liofilização as frações Q1 - Q5, respectivamente (ESQUEMA 2).

ESQUEMA 2 - PURIFICAÇÃO DE LVQ POR CROMATOGRÁFIA DE TROCA IÔNICA EM DEAE-SEPHACEL



A fração QL, como pode ser observada pela análise de composição monossacarídica (TABELA 1), é constituída principalmente por glucose (91,0%). Fucose, xilose, manose e galactose aparecem apenas como traços (1,2 a 3,8%), que são certamente provenientes de fucanas presentes nesta fração. O valor obtido para a rotação óptica da fração QL ($-8,0^\circ$) é condizente com os valores observados para polímeros de β -D-glucanas com ligações do tipo (1 \rightarrow 3) e (1 \rightarrow 6) (OLAFSDOTTIR et al., 2003, WOLSKI et al., 2005). Como pode ser observado na tabela 1, a fração QL foi a que apresentou o maior rendimento (33,5%). Deste modo o processo cromatográfico foi eficiente para a remoção da laminarana contaminante.

O espectro de RMN de ^{13}C da fração Q1 (FIGURA 3), assim como os das outras frações obtidas após a purificação e fracionamento, apresentou um aumento relativo do sinal em 15,3 ppm (correspondente ao C-6 de fucose), quando comparado ao espectro de RMN de ^{13}C da fração bruta (LVQ). Foi observado também um grupo de sinais em torno de 174,9 ppm correspondentes a grupos carboxilas, indicando a presença de ácidos urônicos.

Com a retirada das laminaranas, os espectros de RMN das frações obtidas, agora representativos das fucanas sulfatadas de *L. variegata*, mostraram-se totalmente diferentes do espectro de RMN de ^{13}C de LVQ e altamente complexos devido ao grande número de sinais que apresentam.

Todas as frações obtidas após a purificação (Q1 – Q5) são constituídas majoritariamente por carboidratos (14,5 a 49,3%) (TABELA 1). Ressalta-se que a percentagem de açúcar total foi determinada pelo método fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS, 1956), sendo a fucose utilizada como padrão.

A presença de ácidos urônicos indicada nos espectros de RMN de ^{13}C (sinais centrados em 174,9 ppm) foi confirmada pela determinação do teor destes ácidos por método fotocolorimétrico, utilizando a metodologia descrita por FILISETTI-COZZI e CARPITA (1991).

A fração de fucanas de maior rendimento, Q1 (22,5%), apresentou 28,1% de ácidos urônicos, 16,4% de grupos O-sulfato e o menor conteúdo protéico (3,2%).

A fração Q2, embora tenha apresentado um rendimento de apenas 6,0%, foi a que se mostrou mais sulfatada (23,4%) e com 7,2% de ácidos urônicos. O conteúdo protéico desta fração foi de 6,4%.

FIGURA 3 - ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DA FRAÇÃO Q1

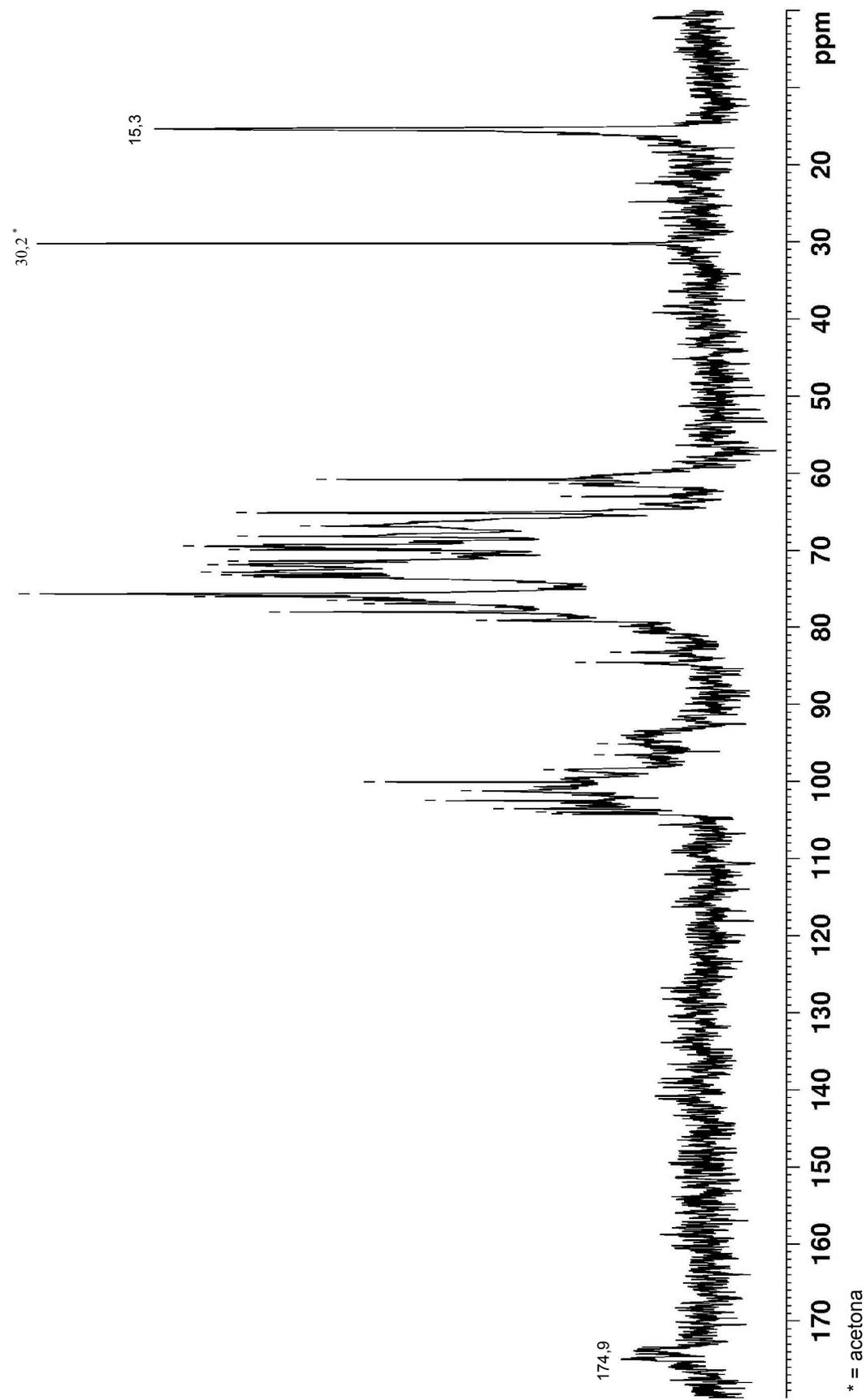


TABELA 1 – ANÁLISES QUÍMICAS E DE COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DE LVQ (FRAÇÃO BRUTA) E QL a Q5

Análises	Frações						
	L,VQ	QL	Q1	Q2	Q3	Q4	Q5
Químicas							
Rendimento (%) ^a	nd	33,5	22,5	6,0	0,8	0,6	2,8
Proteínas (%) ^b	7,2	nd	3,2	6,4	8,6	12,0	3,6
Açúcar total (%) ^c	38,7	nd	49,3	40,0	41,3	27,9	14,5
Ácidos urônicos (%) ^d	17,6	-	28,1	7,2	4,6	3,7	tr
Sulfato (%) ^e	14,7	-	16,4	23,4	19,6	16,7	8,1
$[\alpha]_D^{25}$ (°) ^f	-25,5	-8,0	-35,0	-60,0	+2,0	-9,5	-16,5
Monossacarídeos (mol %)^g							
Ramnose	tr	-	1,3	tr	tr	1,3	4,5
Fucose	15,0	3,8	29,8	29,4	9,4	8,4	15,2
Arabinose	4,4	tr	1,7	1,6	-	1,3	2,2
Xilose	15,9	2,1	30,4	38,0	13,6	15,5	31,7
Manose	3,4	1,2	8,8	1,3	-	11,3	3,6
Galactose	8,2	1,9	12,1	21,2	64,2	39,4	28,0
Glucose	53,0	91,0	15,9	7,8	13,0	22,7	14,7

a = rendimento em relação à fração bruta (LVQ)

b = LOWRY et al., 1951

c = DUBOIS et al., 1956

d = TAYLOR; CONRAD, 1972

e = DODGSON, 1961

f = rotação óptica produzida pelo polissacarídeo ao passar pela linha D de uma lâmpada de sódio ($\lambda = 589,6$ nm) a 25° C

g = monossacarídeos quantificados na forma de acetatos de alditois por CLG-EM

tr = traços

nd = não determinado

- = não detectado

Os valores de rotação óptica obtidos para Q1 e Q2 (-35,0 e -60,0, respectivamente) são típicos de fucanas sulfatadas, indicando a presença de unidades de α -L-fucose (PONCE et al., 2003).

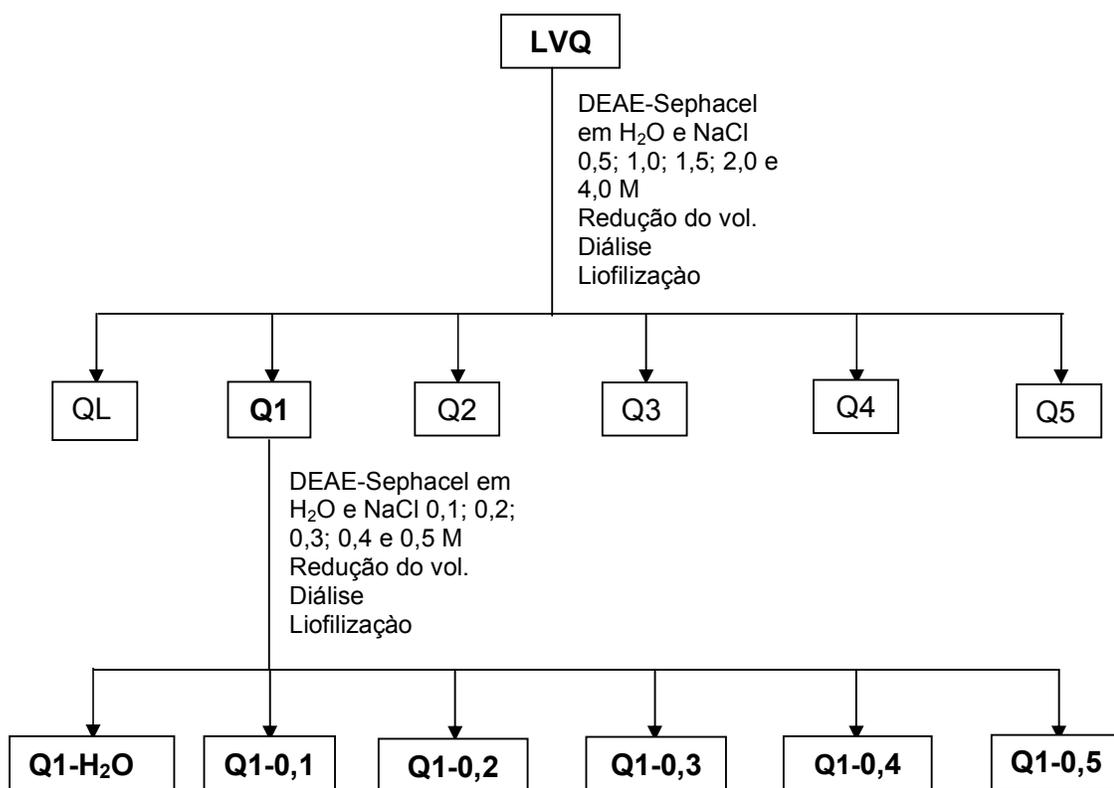
A análise de composição monossacarídica das frações Q1-Q5 (TABELA 1) mostra que estas frações apresentam principalmente xilose, fucose, galactose e glucose em percentagens variáveis. Q1 e Q2 são notavelmente ricas em xilose e fucose, enquanto que em Q3 e Q4 galactose é o monossacarídeo neutro majoritário.

A fração Q3 (64,2% de galactose) apresenta um espectro de RMN de ^{13}C (FIGURA EM ANEXO) onde são observados os sinais em 102,0; 69,2; 78,3; 73,5; 74,3 e 69,0 ppm, que podem ser atribuídos a C-1 – C-6 de unidades de β -D-galactose 4-sulfatadas. Nota-se ainda a presença dos sinais em 94,6; 69,5; 78,7; 77,8; 76,3 e 69,0 ppm, correspondentes a C-1 – C-6 das unidades α -D-3,6-anidrogactose (VAN DE VELDE et al., 2002). Estes dados em conjunto indicam que a fração Q3 é composta majoritariamente por uma galactana sulfatada, mais especificamente por uma kappa-carragenana. Sendo as carragenanas produzidas por algas da divisão Rhodophyta (PAINTER, 1983), estas estão presentes como contaminantes nas frações de fucanas obtidas da alga parda *L. variegata*. A natureza desta contaminação não foi esclarecida, podendo ser atribuída ao processamento (liofilização, por exemplo) ou à presença de outras algas nas frondes de *L. variegata*. No entanto deve ser ressaltado que os espécimes desta última foram limpos manualmente e não apresentavam sinais visíveis (em lupa) de contaminação. Com o processo de purificação por cromatografia de troca iônica (DEAE-SEPHACEL), as carragenanas contaminantes foram eluídas com concentrações de NaCl a partir de 1,5 M, sendo encontradas principalmente na fração Q3.

A fração Q1 (22,5% de rendimento) apresentou um espectro de RMN de ^{13}C muito complexo (FIGURA 3) e um perfil heterogêneo na análise por HPSEC-MALLS (figura não mostrada). Devido a estes fatos, Q1 foi submetida à nova purificação por cromatografia de troca iônica em DEAE-SEPHACEL, sendo utilizada água destilada para a remoção das laminaranas co-eluídas nesta fração durante o primeiro fracionamento. Em seguida foram feitas eluições com soluções de NaCl de concentrações crescentes em uma faixa de 0,1 a 0,5 M, conforme apresentado no esquema 3.

Com este refractionamento foram obtidas as frações Q1-H₂O (eluída com água) e Q1-0,1 a Q1-0,5, eluídas com NaCl 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 e 0,5 M, respectivamente.

ESQUEMA 3 - PURIFICAÇÃO DA FRAÇÃO Q1 POR CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA EM DEAE-SEPHACEL



A análise de composição monossacarídica revelou um perfil de distribuição dos monossacarídeos bem diversificado entre as frações Q1-H₂O a Q1-0,5.

As frações Q1-H₂O e Q1-0,1 apresentam um teor significativo de glucose (41,3 e 38,3%, respectivamente), que pode ser atribuído, pelo menos em parte, às laminaranas contaminantes que ainda se encontram presentes nesta fração. Alternativamente, aliado também a presença de galactose (35,2 e 41,5%, respectivamente), estas frações podem corresponder a glucogalactanas e/ou

galactanas, mas devido ao baixo rendimento estes aspectos não foram investigados neste trabalho.

A fração Q1-0,2 apresentou xilose como constituinte majoritário (53,0%), além de fucose e galactose em percentagens consideráveis (13,7 e 10,5%, respectivamente).

TABELA 2 – ANÁLISES QUÍMICAS E DE COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES Q1-H₂O A Q1-0,5

Análises	Frações					
	Q1-H ₂ O	Q1-0,1	Q1-0,2	Q1-0,3	Q1-0,4	Q1-0,5
Químicas						
Rendimento (%) ^a	3,6	2,8	8,5	21,8	38,6	4,7
Proteínas (%) ^b	6,4	6,7	5,6	4,4	2,4	5,8
Ácidos urônicos (%) ^c	-	3,7	10,0	20,0	18,2	9,53
Sulfato (%) ^d	nd	6,5	6,9	7,8	16,1	20,9
Monossacarídeos (mol %) ^e						
Ramnose	-	4,2	2,0	-	-	-
Fucose	1,4	1,5	13,7	15,4	37,1	25,0
Arabinose	-	3,2	3,2	-	-	5,5
Xilose	14,2	2,7	53,0	30,0	31,2	19,8
Manose	7,9	2,0	3,4	20,9	9,7	21,2
Galactose	35,2	48,1	10,5	22,3	14,7	16,3
Glucose	41,3	38,3	2,2	11,4	7,3	12,2

a = rendimento em relação à fração de origem (Q1)

b = LOWRY et al., 1951

c = TAYLOR; CONRAD, 1972

d = DODGSON, 1961

e = monossacarídeos quantificados na forma de acetatos de alditois por CLG-EM

tr = traços

nd = não determinado

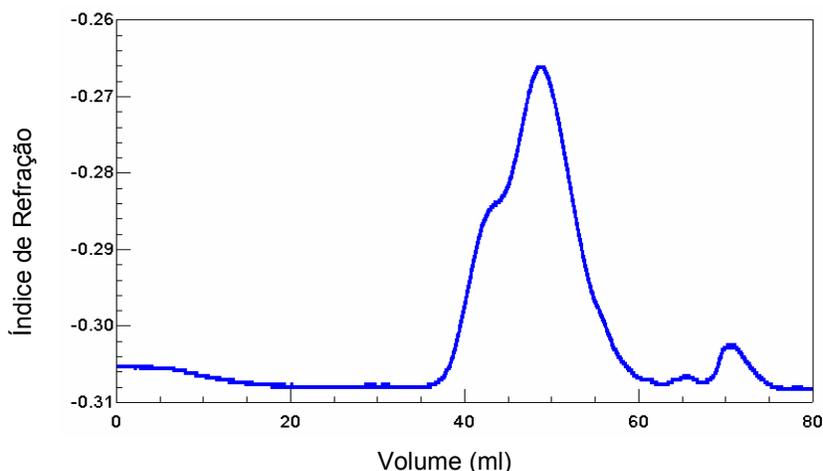
- = não detectado

As frações Q1-0,3 e Q1-04, que foram as de maior rendimento (totalizando cerca de 60%), apresentam significativa porcentagem de ácidos urônicos (20,0 e 18,2%, respectivamente) e são sulfatadas de maneira diferencial entre si (7,8 e 16,0%, respectivamente). Em relação a composição monossacarídica, apresentam os mesmos constituintes (fucose, xilose, manose, galactose e glucose) mas em percentagens distintas. O teor de fucose em Q1-0,4 foi praticamente o dobro que o observado em Q1-0,3 (37,1 e 15,4%, respectivamente), assim como o de grupos sulfato (7,8 e 16,1%, respectivamente). Estes resultados estão de acordo com a maior concentração de NaCl necessária para eluir Q1-0,4 (0,4 M) em relação a Q1-0,3 (0,3 M), bem como Q1-0,5 (0,5 M), e com o fato de que este processo de purificação foi direcionado principalmente pelo teor de grupos sulfato presentes nas amostras.

Considerando o rendimento e a análise composicional (presença de fucose, grupos sulfato e ácidos urônicos), a fração Q1-0,4 foi selecionada para o prosseguimento deste trabalho.

Com a finalidade de verificar a homogeneidade desta fração com relação a massa molecular, Q1-0,4 foi submetida à análise de cromatografia de exclusão estérica (HPSEC-MALLS) (FIGURA 4) .

FIGURA 4 – ANÁLISE DE HOMOGENEIDADE POR HPSEC-MALLS DA FRAÇÃO Q1-0,4



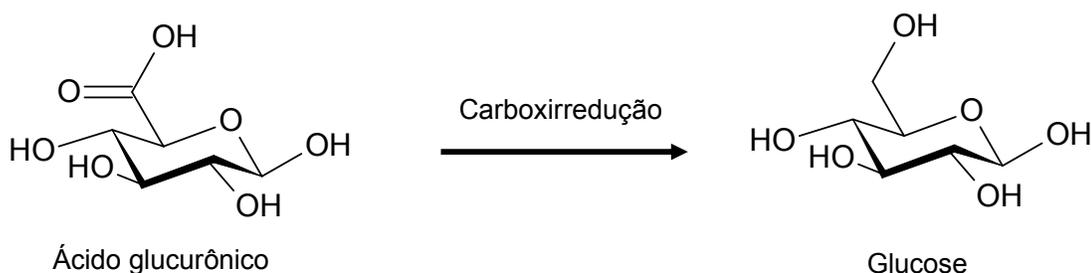
No cromatograma da análise por HPSEC-MALLS pode-se evidenciar o caráter polidisperso de Q1-0,4. Devido ao perfil apresentado, esta fração foi submetida ao processo de purificação por cromatografia de gel filtração em Sepharose-2B, que apresenta um limite de exclusão de 1×10^5 - 20×10^6 Da. A fração de maior rendimento obtida após esta purificação apresentou o mesmo perfil polidisperso de Q1-0,4. Visto que a cromatografia de gel filtração não foi eficiente para a obtenção de uma fração homogênea com relação à massa molecular, as subfrações obtidas nesta tentativa de purificação foram reunidas restabelecendo a fração original (Q1-0,4), que foi utilizada para as subseqüentes análises mesmo não estando homogênea.

Por apresentar 18,2% de ácidos urônicos em sua composição (TABELA 1), a fração Q1-0,4 foi submetida ao processo de carboxirredução.

4.3 CARBOXIRREDUÇÃO DE Q1-0,4

Com a finalidade de identificar o tipo de ácido urônico presente, a fração Q1-0,4 foi carboxirreduzida utilizando o método de TAYLOR e CONRAD (1972), estando o meio de reação adequadamente tamponado (STONE; ANDERSON, 1985). Neste processo o ácido urônico presente no polissacarídeo nativo é convertido ao seu respectivo açúcar neutro (FIGURA 5).

FIGURA 5 – ESQUEMA ILUSTRATIVO DO PROCESSO DE CARBOXIRREDUÇÃO



A fração Q1-0,4 foi submetida ao processo de carboxirredução por duas vezes. Após este processo a dosagem de ácidos urônicos, determinada pela metodologia descrita por FILISETTI-COZZI e CARPITA (1991), indicou que a conversão dos ácidos urônicos a monossacarídeos neutros foi de 93,9%. (TABELA 3).

Paralelamente, o processo de carboxirredução (também 2x) com a fração Q1-0,4 foi conduzido com NaBD₄, dando origem a fração denominada Q1-0,4CR*. O resultado final foi a carboxirredução de 91,2% dos ácidos urônicos presentes no polissacarídeo nativo.

Com o uso do NaBD₄ no processo de carboxirredução e redução, os monossacarídeos neutros originados a partir dos ácidos urônicos se apresentam com 2 unidades de massa a mais em C-6 quando comparados aos monossacarídeos neutros pré-existentes no polímero. Isto pode ser observado pelos perfis de fragmentação dos monossacarídeos nas análises de CLG-EM, onde é avaliada a presença dos íons 217 (referente a hexoses) e 219 (referente a hexoses provenientes de ácidos urônicos) (CARPITA; SHEA, 1989).

Os resultados obtidos através da composição monossacarídica da fração Q1-0,4 e suas respectivas frações carboxirreduzidas (Q1-0,4CR e Q1-0,4CR*) na forma de acetato de alditóis (TABELA 3) demonstram um aumento significativo no conteúdo de glucose após o processo de carboxirredução. É observado também um aumento, embora menor, no conteúdo de manose das frações carboxirreduzidas, sugerindo, além da presença de ácido glucurônico, a presença de ácido manurônico nestas frações. A fração Q1-0,4 apresenta um conteúdo maior de galactose em sua composição (14,7%) quando comparada às frações Q1-0,4CR (5,6%) e Q1-0,4CR* (5,8%), sendo necessária a confirmação destes valores.

A análise da fração Q1-0,4CR* (carboxirreduzida e reduzida com NaBD₄) referente ao perfil de fragmentação monossacarídico (CLG-EM) revelou, no pico correspondente a glucose, tanto o íon 217 quanto o íon 219, confirmando a presença de ácido glucurônico. A proporção dos íons 217:219 indicou que dos 16,7% de glucose observados na composição monossacarídica de Q1-0,4CR*, 10,3% é proveniente do ácido glucurônico presente no polissacarídeo em sua forma nativa.

O aumento do conteúdo de manose observado nas frações carboxirreduzidas poderia ser atribuído à presença de ácido manurônico proveniente de ácidos algínicos como contaminantes da fração de fucanas. No entanto, a análise do perfil de fragmentação do pico correspondente a manose (em Q1-0,4CR*) confirma que este aumento não é referente à presença de ácido manurônico, visto que apenas o íon 217, correspondente a manose, foi encontrado no perfil de fragmentação, e o íon 219, que corresponderia ao ácido manurônico, mostrou-se ausente.

TABELA 3 – COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DE Q1-0,4, Q1-0,4CR e Q1-0,4CR*

Análises	Fração		
	Q1-0,4	Q1-0,4CR	Q1-0,4CR*
Monossacarídica (mol %) ^a			
Fucose	38,7	30,7	26,5
Xilose	37,2	33,7	38,9
Manose	9,7	13,1	12,1
Galactose	7,1	5,6	5,8
Glucose	7,3	16,9	16,7
Química			
Ácido urônico (%) ^b	18,0	1,1	1,6
Carboxirredução (%) ^c	nd	93,9	91,2

a = monossacarídeos obtidos na forma de acetatos de alditóis por CLG-EM

b = TAYLOR; CONRAD, 1972

c = % de carboxirredução em relação à fração nativa (Q1-0,4)

nd = não determinado

Um fato que deve ser levado em consideração é que as ligações glicosídicas que envolvem ácidos urônicos são mais resistentes à hidrólise que as ligações glicosídicas entre açúcares neutros, e uma das formas para contornar o problema de

hidrólise é a carboxirredução dos ácidos urônicos (CARPITA; SHEA, 1989). Com isso pode-se concluir que provavelmente as unidades de manose tinham sua hidrólise dificultada por se encontrarem próximas às unidades de ácido glucurônico no polímero nativo e, após o processo de carboxirredução, essas unidades foram hidrolisadas mais facilmente, e conseqüentemente tiveram seu conteúdo aumentado na análise de composição monossacarídica.

A carboxirredução se faz necessária anteriormente ao processo de metilação, pois as unidades de ácidos urônicos, além de dificultarem a hidrólise dos polissacarídeos, não permitem a derivatização necessária à formação de unidades de acetatos de alditóis voláteis empregados na análise por CLG-EM.

4.4 ANÁLISE DE METILAÇÃO DA FRAÇÃO Q1-0,4CR

A técnica de metilação ocupa um lugar de destaque na determinação da estrutura de polissacarídeos, fornecendo informações que muitas vezes não podem ser obtidas por outros métodos. Isto ocorre especialmente quando se tratam de polissacarídeos complexos como as fucanas de algas pardas, onde é freqüente a presença de diferentes tipos de monossacarídeos constituintes, heterogeneidade no padrão de sulfatação e distintos tipos de ligações glicosídicas.

Além de identificar os tipos de ligações glicosídicas, as análises de metilação fornecem indicações quanto ao grau de polimerização, sendo possível identificar os pontos de ramificação e o comprimento médio das cadeias lineares (CORRÊA, 1971).

No desenvolvimento deste trabalho, a metilação das frações polissacarídicas foi realizada de acordo com a metodologia de CIUCANU e KEKEK (1984). Este método deve ser realizado em meio anidro e prevê o uso de dimetilsulfóxido (DMSO) como solvente, hidróxido de sódio (NaOH) pulverizado e iodeto de metila (CH_3I) como agente metilante. Por ser um solvente aprótico (sem hidrogênio ácido), o DMSO é apropriado para este tipo de reação, visto que a etapa inicial consiste na desprotonação das -OH presentes no polissacarídeo. Além disso, o DMSO solvata fortemente os cátions deixando os ânions relativamente livres para reagir, sendo

esta característica muito vantajosa no caso da metilação, visto que a etapa inicial é realizada por intermédio de uma base forte (OH⁻) (CORRÊA, 1971).

A metodologia de CIUCANU e KEKEK (1984) fornece bons resultados para a metilação de polissacarídeos neutros. No caso dos polissacarídeos sulfatados, os quais são altamente carregados, esta metodologia é pouco eficiente devido à baixa solubilidade destes em DMSO. Para contornar este problema, STEVENSON e FURNEAUX (1991) desenvolveram uma forma de converter os grupos sulfato dos polissacarídeos, que geralmente se encontram na forma de sal de sódio, em sal orgânico por meio de diálise contra uma solução de trietilamina. O polissacarídeo na forma de sal de trietilamônio torna-se solúvel em DMSO, o que é necessário para que o processo de metilação possa ser realizado de maneira eficiente.

A fração de fucana sulfatada Q1-0,4CR, na forma de sal de trietilamônio, foi submetida a uma série de metilações conforme descrito em materiais e métodos. Os derivados metilados foram analisados na forma de acetatos de alditóis por CLG-EM, sendo utilizada coluna capilar OV-225. Com o uso desta coluna, alguns derivados metilados são co-eluídos como 2,3,4-Me₃-Fuc + 2,3,4-Me₃-Xyl e 2,3-Me₂-Fuc + 2,4-Me₂-Fuc, sendo necessário o uso da coluna DB-23 para separação e quantificação destes.

Para verificar o padrão de substituição das unidades do ácido urônico previamente identificado (ácido glucurônico), a fração Q1-0,4CR* (carboxirreduzida com NaBD₄) também foi submetida ao processo de metilação, sendo analisados os perfis de fragmentação dos derivados metilados correspondentes à glucose (CLG-EM).

Como pode ser observado na tabela 4, um grande número de derivados metilados foi obtido para Q1-0,4.

Os principais derivados metilados observados para a fucose são 3,4-Me₂-Fuc, 4-Me-Fuc e 2-Me-Fuc (9,7, 6,9 e 6,4%, respectivamente). A presença de fucose não metilada (7,0%) pode ser indicativa de pontos de ramificação e/ou de unidades mono-, di- ou tri-sulfatadas. Embora seja conhecido que grupos ácidos como os grupos O-sulfato, que apresentam elevado grau de ionização e volume, possam dificultar a ionização das hidroxilas livres e conseqüentemente ocasionar submetilação, deve ser ressaltado que o polissacarídeo foi previamente transformado em seu correspondente sal de trietilamônio. Além do mais deve ser

ressaltado que o processo de metilação foi conduzido por três vezes, sem que a percentagem de fucose livre variasse significativamente. Deste modo a possibilidade de que as unidades de fucose livre sejam provenientes de submetilação é minimizada.

As unidades de xilose se apresentam principalmente na forma 2,3- e 3,4-di-O-metilada (10,5%), bem como na forma de unidades terminais não redutoras (8,9%).

Para as unidades de manose, nota-se uma variedade de derivados, sendo os principais 4,6-Me₂-, 2,3,6-Me₃- e 3,6-Me₂-Man (4,7; 3,4 e 3,2%, respectivamente). A galactose está presente no polissacarídeo principalmente na forma 6-O-substituída, ou seja, 2,3,4-Me₃-Gal (3,7%).

Observando-se os perfis de fragmentação correspondentes à glucose obtidos pelas análises de CLG-EM (fração Q1-0,4CR*), pode-se observar para o derivado 2,3,6-Me₃ o íon 233, que é correspondente à hexoses, e o íon 235, que é correspondente à hexoses provenientes de ácidos urônicos após carboxirredução com NaBD₄ (CARPITA; SHEA, 1989). Estes íons encontram-se em percentagens de 5,9% (glucose) e 7,6% (ácido glucurônico), respectivamente. Para as unidades terminais não redutoras desta hexose (2,3,4,6-Me₄), foram observados tanto o íon 205 quanto o íon 207, correspondentes às unidades de glucose (2,1%) e de ácido glucurônico (4,6%), respectivamente, presentes no polissacarídeo nativo (CARPITA; SHEA, 1989).

Para a determinação da posição dos grupos substituintes (sulfato) em fucanas isoladas de algas pardas, torna-se necessário proceder, previamente à análise de metilação, a remoção destes grupos para que posteriormente se realize a análise de metilação comparativa do polissacarídeo sulfatado e dessulfatado. Com este objetivo, Q1-0,4CR (16,1% de sulfato) foi submetida ao processo de dessulfatação solvolítica (solvólise) segundo NAGASAWA et. al. (1977), originando a fração Q1-0,4CRD.

Após dosagem do teor de grupos sulfato remanescentes na fração Q1-0,4CRD (1,6%), pode-se afirmar que a dessulfatação ocorreu quase totalmente (90,3% de remoção dos SO₃Na) com um rendimento de 74,6%. A análise de composição monossacarídica por CLG-EM (Fuc= 31,9; Xyl= 36,2; Man= 10,9; Gal= 6,0; Glc= 15,0) revelou que o polissacarídeo não sofreu degradação extensiva após o tratamento solvolítico, sendo, portanto, representativo da molécula original.

Quando comparada à fração Q1-0,4CR, a análise dos derivados metilados obtidos a partir de Q1-0,4CRD (TABELA 4) demonstra para a fucose o desaparecimento do derivado 2-Me-Fucose (6,4 para 0,0%) concomitantemente ao aumento do derivado 2,3-Me₂-Fucose (1,8 para 5,9%), sugerindo a presença de fucose 4-ligada e sulfatada em C-3. Foram observados ainda aumentos nas percentagens de 4-Me-Fucose (6,9 para 11,5%), relativos a unidades de fucose 4-sulfato 2,3-di-O-substituída, e de 2,3,4-Me₃-Fucose (4,9 para 9%), correspondente a unidades de fucose como terminais não redutores trissulfatadas. O aumento da percentagem destes últimos derivados está de acordo com a percentagem de fucose livre observada durante o processo de metilação do correspondente polímero sulfatado (Q1-0,4CR, 7,0%). Alterações significativas não são observadas para 2,4-Me₂-Fuc (3,4 para 3,2%) e 3,4-Me₂-Fuc (9,7 para 9,2%), confirmando a presença de fucose 3- e 2-ligada, respectivamente.

É comum para as fucanas, durante as análises de metilação, a obtenção de uma variedade de derivados parcialmente metilados para a fucose, pois até mesmo as que apresentam cadeias principais constituídas por unidades de fucose 3- e/ ou 4-ligadas (ordens Laminariales, Chordariales e Fucales) têm sua regularidade estrutural mascarada devido a presença de ramificações e grupos sulfato em diferentes posições no polissacarídeo nativo (BILAN, 2002). Após o processo de dessulfatação essas fucanas, por apresentarem certa regularidade estrutural, apresentam grande simplificação dos derivados obtidos por metilação. Diferentemente, a fucana da alga parda *L. variegata* apresenta um esquema mais complexo de substituição, pois, mesmo no polissacarídeo dessulfatado pode ser observado uma variedade de derivados parcialmente metilados para esta fração estudada (Q1-0,4). PONCE et al. (2003), semelhantemente à fucana de *L. variegata*, também observaram para o polissacarídeo nativo de *Adenocystis utricularis* significativa percentagem de fucose não metilada, bem como a presença de vários derivados em diferentes proporções. Com a dessulfatação do polissacarídeo essa variedade se mantém, sugerindo complexidade no padrão de substituição destas unidades de fucose.

Para as unidades de xilose, a dessulfatação promoveu um aumento do derivado 2,3,4-Me₃-Xilose (8,9 para 13,6%). Embora o perfil de fragmentação (CLG-EM) de Q1-0,4CR apresente os derivados di-metilados (2,3-Me₂-), majoritariamente,

e 3,4-Me₂-Xilose, 10,5%), na fração Q1-0,4CRD basicamente 3,4-Me₂-Xilose (5,9%) está presente. Esses dados em conjunto indicam que as unidades de xilose encontram-se como unidades simples não substituídas (8,9%), unidades simples sulfatadas em C-4 (cerca de 5,0%) e 2-ligadas (cerca de 5,9%).

DUARTE et al. (2001) descrevem as unidades de xilose presentes nas fucanas de *S. stenophyllum* como unidades simples ligadas em C-3 das unidades de fucose. Na alga parda *Hizikia fusiforme* 2/3 das unidades de xilose se apresentam como unidades terminais não redutoras, sendo as unidades restantes (1→4)-ligadas (LI et al., 2006). Para *F. serratus*, BILAN et al. (2006) reportam a presença de cadeias curtas de uma β-xilana (1→4)-ligada, as quais substituem o C-2 das unidades de fucose constituintes da cadeia principal.

Para as unidades de manose e galactose não foram observadas mudanças significativas após a dessulfatação do polissacarídeo, e a presença de derivados mono- e di-metilados para a manose sugerem que esta representa pontos de ramificação do polímero.

As unidades de manose 2,3-di-substituídas também foram reportadas para as fucanas de *H. fusiforme*, onde estas faziam parte do *core* do polímero, estando principalmente na forma 2-ligada com algumas unidades ramificadas em C-3 (LI et al., 2006). Os autores relatam ainda para as fucanas de *H. fusiforme* unidades de galactose principalmente 6-ligadas, mas estas apresentam algumas ramificações em C-2, pois juntamente com a manose fazem parte do *core* da fucana. Nas fucanas de *S. stenophyllum* a fração F3B apresenta um *core* constituído por manose (1→2)-ligada e galactose (1→6)-, (1→4)- e (1→3)-ligada, sendo C-3 e C-4 das unidades de manose os principais pontos de ramificação do polissacarídeo (DUARTE et al., 2001). De modo similar à estas fucanas previamente descritas, a fração Q1-0,4 de *L. variegata* apresenta unidades de galactose 6-ligadas, bem como unidades de manose como pontos de ramificação do polímero.

Glucose e ácido glucurônico também não tiveram, em Q1-0,4CRD, alterações relevantes em seus derivados quando comparados à fração Q1-0,4CR, e se apresentam como unidades 4-ligadas e na forma de terminais não redutores.

TABELA 4 – PRINCIPAIS DERIVADOS METILADOS OBTIDOS DAS FRAÇÕES Q1-0,4 CR E Q1-0,4CRD

Derivado metilado (mol %) ^a	Fração		Padrão de substituição
	Q1-0,4CR	Q1-0,4CRD	
2,3,4-Me ₃ -Fuc ^b	4,9	9,0	TNR
2,4-Me ₂ -Fuc ^b	3,4	3,2	3-L
2,3-Me ₂ -Fuc ^b	1,8	5,9	4-L
3,4-Me ₂ -Fuc	9,7	9,2	2-L
2-Me-Fuc	6,4	-	4-L / 3-S
4-Me-Fuc	6,9	11,5	2,3-L
Fuc	7,0	-	2,3-L / 4-S; 2,3,4-S
2,3,4-Me ₃ -Xyl ^b	8,9	13,6	TNR
2,3 + 3,4-Me ₂ -Xyl	10,5	5,9 ^c	4-S + 2-L
2,3,6-Me ₃ -Man	3,4	3,7	4-L
2,6-Me ₂ -Man	2,3	1,0	3,4-L e/ou S
3,6-Me ₂ -Man	3,2	3,2	2,4-L
4,6- Me ₂ -Man	4,7	5,0	2,3-L
3- + 4-Me-Man	2,5	2,5	2,4,6-L + 2,3,6-L
2,3,6-Me ₃ - Gal	1,7	1,1	4-L
2,3,4- Me ₃ - Gal	3,7	3,5	6-L
2,3,4,6-Me ₄ -GlcA	4,6	6,2	TNR
2,3,6-Me ₃ - GlcA	7,6	6,2	4-L
2,3,4,6-Me ₄ -Glc	2,1	2,3	TNR
2,3,6-Me ₃ - Glc	5,9	7,0	4-L

a = Derivados metilados na forma de acetatos de alditóis obtidos por CLG-EM

b = Separados e quantificados por CLG-EM utilizando coluna capilar DB-23

c = Apenas o derivado 3,4-Me₂-Xyl é observado para a fração dessulfatada

L = Ligação glicosídica

S = Grupo sulfato

TNR = Terminal Não Redutor

- = não detectado

O padrão de substituição das unidades de ácido glucurônico observado para as fucanas de *L. variegata*, ou seja, na forma de terminais não redutores ou de unidades 4-ligadas foram também relatadas para as fucanas de *S. stenophyllum*, onde estas se apresentam como unidades α -D-(1 \rightarrow 4)-ligadas, sendo este padrão de ligação glicosídica observado também para as unidades de glucose (DUARTE et al., 2001). Para as fucanas de *H. fusiforme*, embora as unidades de ácido glucurônico se apresentem (1 \rightarrow 4)-ligadas, estas são do tipo β -D (LI et al., 2006).

4.5 ANÁLISES DE RMN DE ^{13}C DAS FRAÇÕES Q1-0,4; Q1-0,4CR E Q1-0,4CRD

O espectro de RMN de ^{13}C Q1-0,4 (FIGURA 6) se mostrou menos complexo que o espectro da fração Q1 (FIGURA 3), da qual foi originada, mas ainda assim apresenta vários sinais alargados na região anomérica (104,2 - 93,8 ppm), indicativos da grande complexidade estrutural dos polissacarídeos presentes nesta fração. A partir da fração LVQ, que foi purificada com objetivo de remover as laminaranas, pode-se observar em Q1 e Q1-0,4 um aumento relativo dos sinais correspondentes ao grupo CH_3 das unidades de fucose e à carboxila de ácidos urônicos, em 15,3 e 174,9 ppm, respectivamente.

A fração Q1-0,4CR (obtida após carboxirredução) apresentou no espectro de RMN de ^{13}C o concomitantemente desaparecimento do sinal em 174,9 ppm e um aumento significativo dos sinais em 60,3 e 60,8 ppm, correspondentes ao C-6 livre de hexoses. Estas alterações no espectro ocorridas após a carboxirredução de Q1-0,4 estão de acordo com resultados obtidos pelas análises de composição monossacarídica (TABELA 3) e pelas dosagens de ácidos urônicos por método colorimétrico, confirmando que o processo de carboxirredução foi eficiente na conversão do ácido urônico (glucurônico, como já determinado) no seu respectivo monossacarídeo neutro (glucose). Após o processo de carboxirredução foi verificado também o desaparecimento do sinal em 83,4 ppm, que pode ser atribuído ao C-4 das unidades de ácido glucurônico 4-ligadas (HABIBI; VIGNON, 2005).

Tanto o espectro de RMN de ^{13}C de Q1-0,4 como o de Q1-0,4CR apresentam o sinal em 79,0 ppm e 76,4 ppm, que podem ser atribuídos ao C-4 e C-3 das unidades de fucose 4-ligadas sulfatadas em C-3 (DUARTE et al., 2001). No espectro

da fração dessulfatada (Q1-0,4CRD) houve o desaparecimento do sinal de 76,4 ppm (dessulfatação de C-3 das unidades de fucose) e o deslocamento do sinal de 79,0 ppm (C-4 de fucose 4-ligada 3-sulfatada) para 80,8 ppm (fucose 4-ligada). Esses dados estão de acordo com a análise de metilação, onde observa-se o desaparecimento do derivado 2-Me-fucose (fucose 3,4-di-substituída) após o processo de dessulfatação juntamente com o aumento do derivado 2,3-Me₂-fucose (fucose 4-ligada).

Os espectros de RMN de ¹³C tanto da fração nativa quanto dessulfatada apresentam na região anomérica grupos de sinais em 99,7-98,9 ppm que podem ser atribuídos a unidades de fucose 3- e 4-ligadas (JAIN; MATTA, 1990), em 96,6-96,3 ppm correspondentes a unidades de fucose 3,4-di-substituídas (DUARTE et al., 2001) e em 94,7-93,2 ppm devido a presença de fucose 2- e 2,3-di-substituída (CARDOSO, 2003).

A fração Q1-0,4CRD apresentou um espectro de RMN de ¹³C com sinais mais definidos devido à remoção dos grupos sulfato, o que promoveu uma simplificação estrutural do polímero.

No espectro de ¹³C da fração dessulfatada, foi possível observar os sinais em 103,9; 73,4; 75,7; 69,2 e 65,1 ppm, que podem ser atribuídos ao C-1-C-5 de unidades simples de xilose, respectivamente (USOV; BILAN; SHASHKOV, 1997). O sinal em 101,5 ppm pode ser atribuído ao C-1 das unidades de xilose 2-ligadas (HABIBI; VIGNON, 2005). Estes resultados estão de acordo com os obtidos pelas análises de metilação discutidos anteriormente.

No que diz respeito às unidades simples de xilose 4-substituídas, após o processo de dessulfatação observa-se o desaparecimento do sinal em 77,9 e em 63,0 ppm, correspondentes ao C-4 (KOVAC et al., 1980) e ao C-5 (VIANA, 2005) destas unidades. Concomitantemente, observa-se um aumento da intensidade dos sinais referentes aos C-4 (69,2 ppm) e ao C-5 (65,1 ppm), referentes a unidades simples de xilose não substituídas. Nota-se ainda o desaparecimento do sinal em 104,2 ppm, que pode ser atribuído ao C-1 de unidades de xilose 4-O-substituídas em ambiente químico sulfatado que, com a dessulfatação, foi deslocado para 103,9 ppm. Esses dados, em conjunto com as análises de metilação (TABELA 4), indicam a presença de unidades simples de xilose sulfatadas em C-4.

Sinais em 24,3 e 24,9 ppm são observados nos espectros de RMN de ^{13}C da fração Q1-0,4, sugerindo a presença de grupos acetato nesta fucanas.

Previamente, pequenos sinais de grupos acetato foram reportados para as fucanas de *F. vesiculosus* e *L. brasiliensis*, mas estes foram assinalados como sendo de acetato contaminante introduzido durante o processo de purificação do polissacarídeo (MULLOY et al., 1994). CHIZHOV et al. (1999) confirmaram pelo experimento de RMN HMQC a presença de grupos acetato como constituinte das fucanas de *Chorda filum*. Através de outros experimentos de RMN (COSY, ROESY, HMQC-TOCSY) os autores concluíram que os grupos acetil se apresentavam ligados ao C-2 das unidades de fucose.

O experimento de RMN HMQC foi realizado para a fração Q1-0,4CRD, mas devido à escassez de amostra e ao fato de os sinais correspondentes aos grupos acetatos se apresentarem relativamente pequenos, não foi possível determinar se estes grupos fazem parte da estrutura destas fucanas.

FIGURA 6 – ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DA FRAÇÃO Q1-O,4

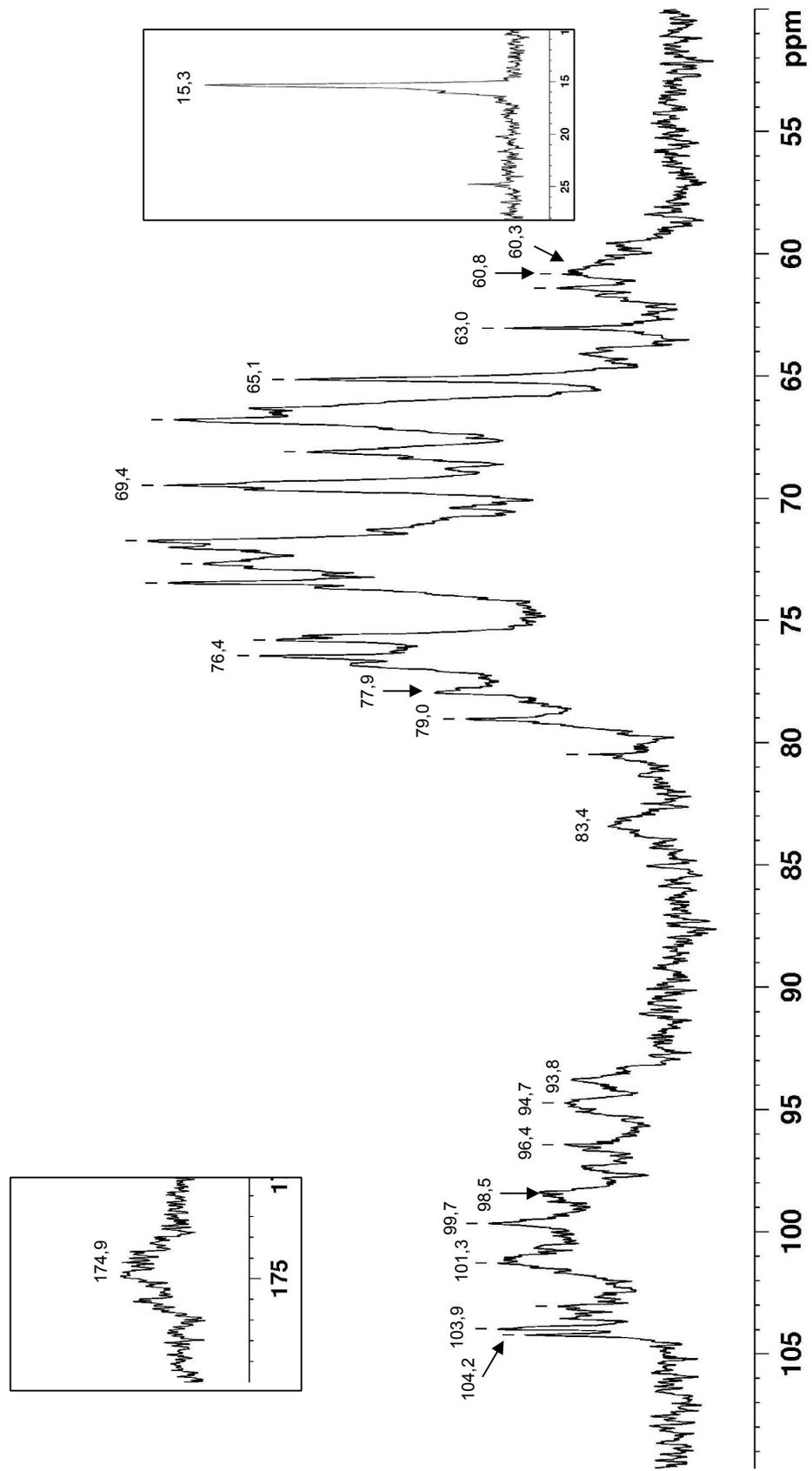


FIGURA 7 - ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DA FRAÇÃO Q1-0,4CR

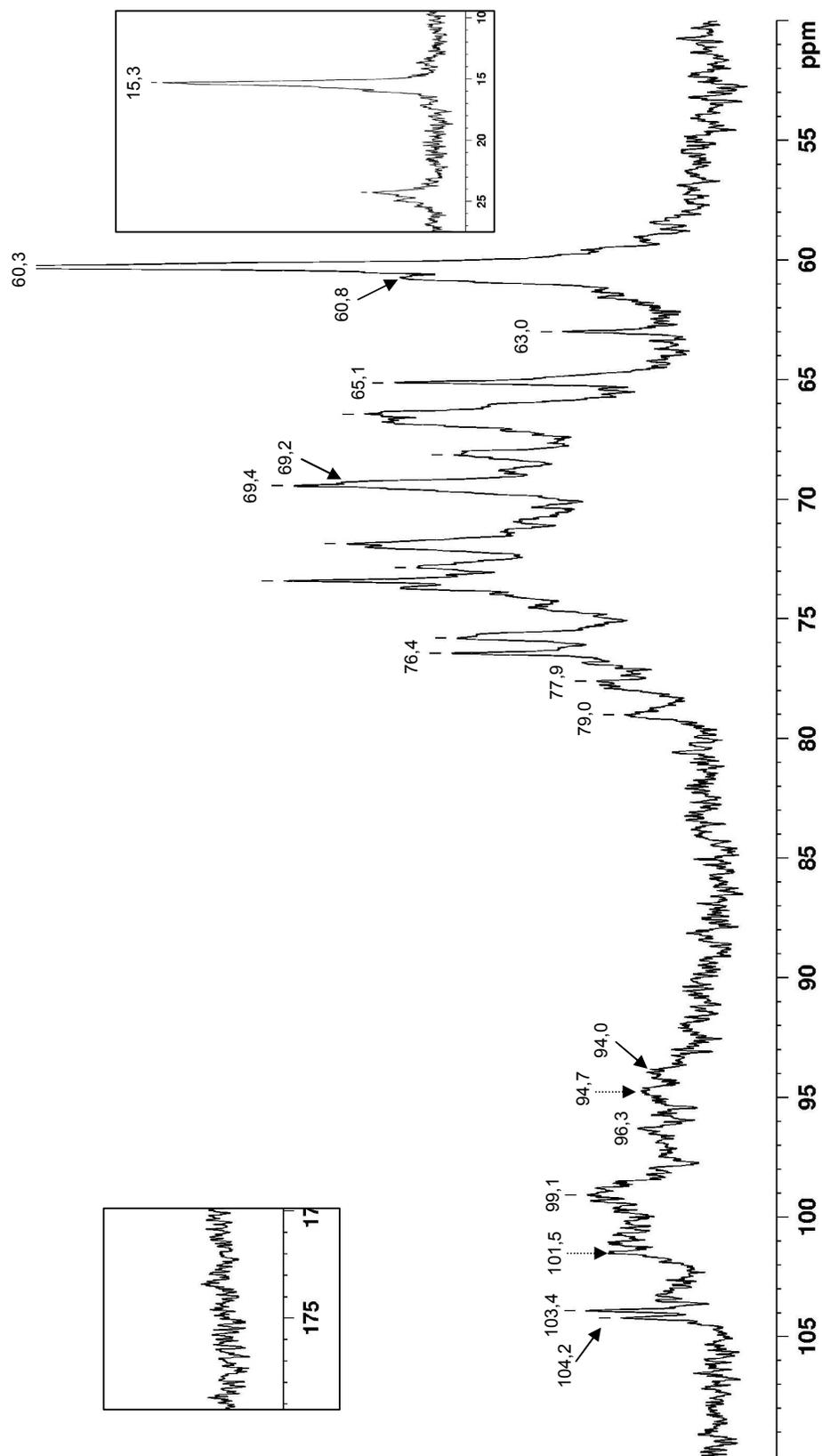
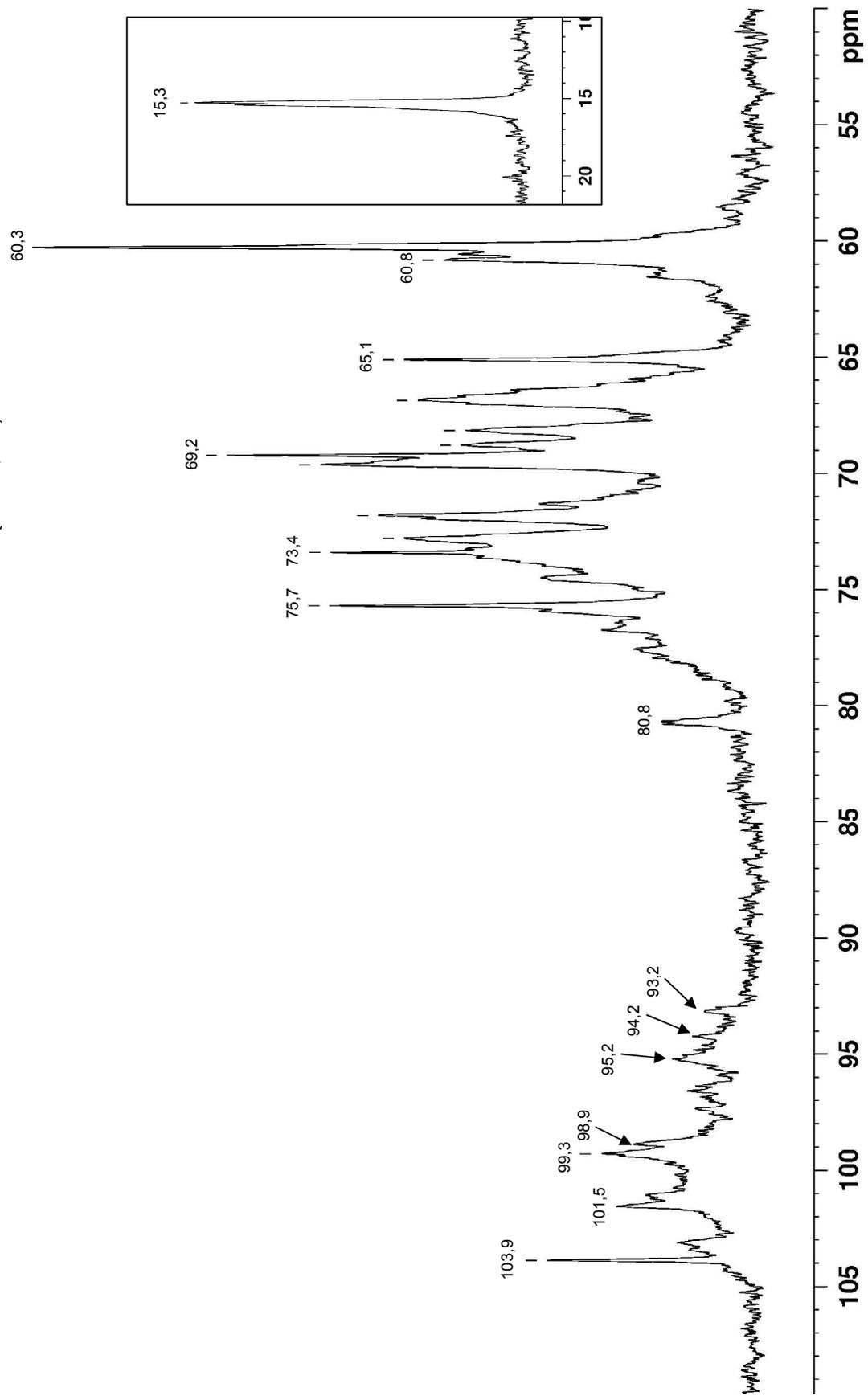


FIGURA 8 - ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DA FRAÇÃO Q1-0,4CRD

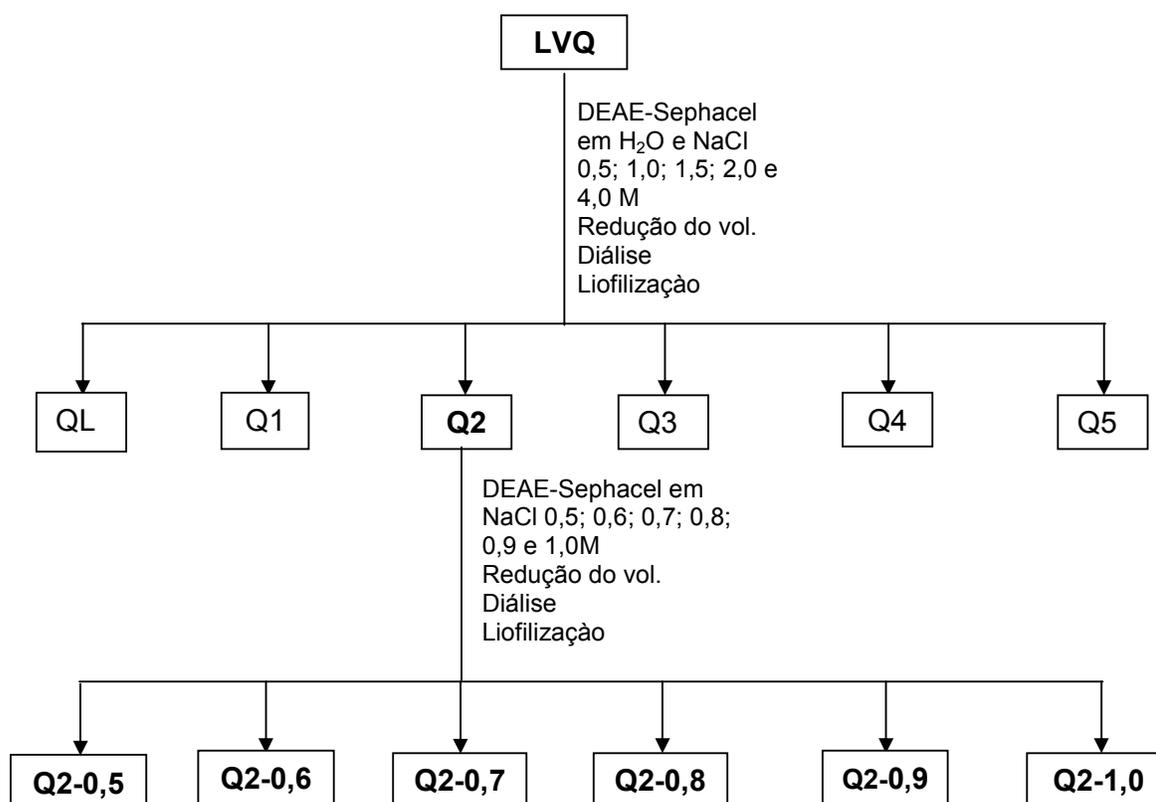


4.6 PURIFICAÇÃO DA FRAÇÃO Q2-0,6

Dando continuidade ao estudo das fucanas de *L. variegata* e com a finalidade de verificar se o padrão estrutural das fucanas presentes na fração Q1-0,4, de uma maneira geral, se estende para outras frações obtidas a partir do extrato bruto (LVQ), foi realizada a repurificação (ESQUEMA 4).

Embora Q-2 tenha sido obtida por fracionamento em DEAE-Sephacel (eluída com NaCl 1,0M), a repurificação, utilizando o mesmo tipo de coluna, foi realizada com soluções de NaCl em uma faixa de concentração de 0,5 a 1,0M. Com este processo foram obtidas 6 subfrações, Q2-0,5 a Q2-1,0, eluídas com NaCl nas concentrações 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 0,9 e 1,0M, respectivamente. (ESQUEMA 4).

ESQUEMA 4 – PURIFICAÇÃO DE LVQ E Q2 POR CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA EM DEAE-SEPHACEL



Como pode ser observado na tabela 5, as frações de maior rendimento obtidas da purificação de Q2 foram Q2-0,7 e Q2-0,6, (28,7 e 26,0%, respectivamente).

As frações que apresentam os maiores teores protéicos são Q2-0,5 e Q2-0,9, sendo este de 12,9% para ambas as frações. Q1-1,0M apresenta 8,2% de proteínas, estando este constituinte presente apenas como traços nas demais frações (1,8 a 2,2%).

Todas as frações (Q2-0,5 a Q2-1,0M) apresentam um alto teor de grupos sulfato (20,5 a 24,5%), e as percentagens de ácidos urônicos se apresentam relativamente baixas, sendo Q2-0,6 a fração que apresentou o maior conteúdo de ácidos urônicos (11,0%). Nas outras frações os teores de ácidos urônicos ficaram entre 1,1 e 7,7%.

De uma maneira geral pode-se notar que as frações obtidas a partir da purificação de Q1 se apresentam menos sulfatadas e com um maior conteúdo de ácidos urônicos, enquanto as frações obtidas da purificação de Q2 (eluída com uma maior concentração de NaCl) se apresentam mais sulfatadas e com menores teores de ácidos urônicos em sua composição. DUARTE et. al. (2001), obtiveram o mesmo perfil para as frações de fucanas purificadas de *Sargassum stenophyllum*. MIAN e PERCIVAL (1973) também observaram que nas frações onde foram requeridas maiores quantidades de sal para a eluição observaram-se os maiores teores de grupos sulfato, assim como os menores conteúdos de ácidos urônicos.

Pela análise de composição monossacarídica (TABELA 5), pode-se observar que as frações Q2-0,5 a Q2-0,8 são constituídas principalmente por fucose, xilose, manose, galactose e glucose, sendo que as quantidades destes apresentam variações nas diferentes frações.

As frações Q2-0,8 a Q2-1,0 apresentam galactose como componente majoritário, além de fucose e xilose em quantidades significativas. Q2-0,9 e Q2-1,0 apresentam ainda uma concentração do conteúdo de arabinose, que aparecia apenas como traços em Q2 e em suas subfrações. Isto é devido aos processos de purificação, onde houve a concentração desse monossacarídeo nestas frações.

Q2-0,7 apresenta-se constituída basicamente por fucose, galactose e xilose (38,0; 31,3 e 17,9%, respectivamente).

Fucose aparece como componente majoritário absoluto em Q2-0,6 (42,8%), seguida de xilose (24,9%) e galactose (18,9%). Glucose e manose aparecem em menores percentagens (7,4 e 5,9%), respectivamente.

TABELA 5 - RENDIMENTO E ANÁLISE QUÍMICA DE Q2-0,5 A Q2-1,0

Análises	Fração					
	Q2-0,5	Q2-0,6	Q2-0,7	Q2-0,8	Q2-0,9	Q2-1,0
Químicas						
Rendimento (%) ^a	13,4	26,0	28,7	3,3	6,9	9,2
Proteínas (%) ^b	12,9	1,8	2,2	12,9	2,2	8,2
Ácidos urônicos (%) ^c	7,7	11,0	3,6	1,1	3,0	6,0
Sulfato (%) ^d	22,9	23,0	23,1	20,5	22,6	24,5
Monossacarídica (mol %) ^e						
Ramnose	2,0	-	3,5	1,8	tr	2,2
Fucose	16,9	42,8	38,0	31,7	23,1	19,4
Arabinose	2,9	-	1,5	2,0	20,1	19,2
Xilose	15,1	24,9	17,9	13,0	12,0	19,3
Manose	10,1	5,9	3,2	4,9	2,5	3,4
Galactose	19,8	18,9	31,3	35,1	37,6	29,4
Glucose	33,2	7,4	4,6	11,5	4,7	7,1

a = rendimento em relação à fração de origem (Q2)

b = LOWRY et al., 1951

c = TAYLOR; CONRAD, 1972

d = DODGSON, 1961

e = monossacarídeos quantificados na forma de acetatos de alditois por CLG-EM

tr = traços

nd = não determinado

- = não detectado

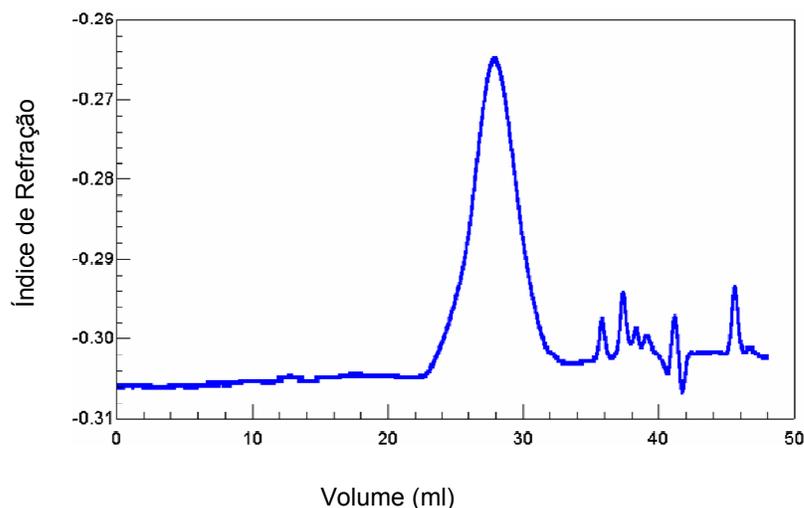
Q2-0,7 e Q2-0,6, por serem as frações de maior rendimento obtidas da purificação de Q2 (TABELA 5), foram submetidas a análise de cromatografia de

exclusão estérica por HPSEC-MALLS com a finalidade de verificar se estas se apresentavam homogêneas com relação à massa molecular dos polissacarídeos constituintes destas frações.

O perfil cromatográfico de Q2-0,7 (Figura não mostrada) mostrou-se polidisperso, indicando que esta fração de fucanas sulfatadas se apresenta heterogênea com relação à massa molecular.

No cromatograma obtido da análise de HPSEC-MALLS da fração Q2-0,6 (FIGURA 9), foi evidenciada a homogeneidade desta fração. A partir do valor obtido pela relação entre a resposta do índice de refração e a variação da concentração do polissacarídeo (dn/dc), que foi de 0,169 mL./g, pode-se calcular a massa molecular média das fucanas sulfatadas presentes em Q2-0,6, sendo esta de 106,0 KDa.

FIGURA 9 - ANÁLISE DE HOMOGENEIDADE DE Q2-0,6 POR HPSEC-MALLS

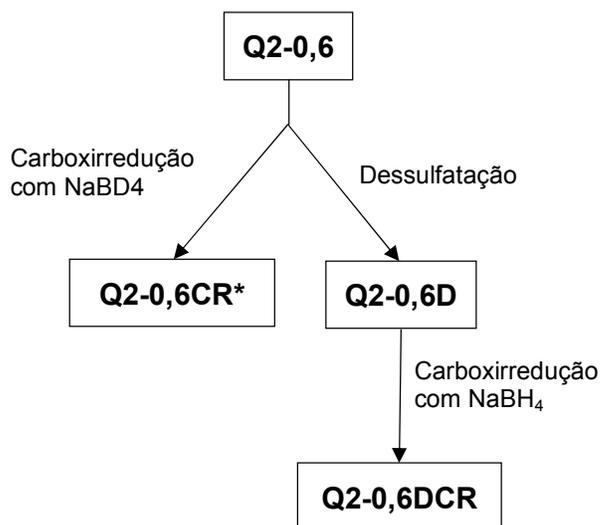


Devido ao perfil homogêneo apresentado pela análise de HPSEC-MALLS, bem como os resultados das análises químicas e monossacarídica, Q2-0,6 foi selecionada para posteriores análises estruturais. Destaca-se que esta fração apresentou o menor conteúdo protéico (1,8%) e um alto conteúdo de fucose (42,8%), que é acompanhado de um alto teor de grupos sulfato (23,0%).

4.7 CARBOXIRREDUÇÃO E ANÁLISES DE METILAÇÃO DA FRAÇÃO Q2-0,6

Para a análise estrutural da fucana Q2-0,6 foi utilizada metodologia similar a descrita para a fucana Q1-0,4, sendo no entanto, realizada em diferente seqüência: uma parte da amostra foi carboxirreduzida com NaBD_4 e outra dessulfatada e carboxirreduzida com NaBH_4 (ESQUEMA 5). Estas foram submetidas à análises de metilação como descrito para a fucana Q1-0,4.

ESQUEMA 5 – CARBOXIRREDUÇÃO E DESSULFATAÇÃO DA FRAÇÃO Q2-0,6



A carboxirredução com NaBD_4 , originando Q2-0,6CR^* foi realizada a fim de confirmar o tipo de ácido urônico constituinte desta fucana. Em apenas uma etapa de carboxirredução, a conversão dos ácidos urônicos a monossacarídeos neutros foi de 77,3% (TABELA 6).

A fucana Q2-0,6 foi submetida à dessulfatação solvolítica (HCl 1,0M, 4 horas, 100°C) anteriormente ao processo de carboxirredução com a finalidade de obter um bom espectro de RMN de ^{13}C . Posteriormente, com o polímero dessulfatado e carboxirreduzido com NaBH_4 , foram realizadas as análises de metilação. As dosagens de grupos sulfato indicaram que ocorreu uma dessulfatação parcial desta fração (65,0%) com um rendimento de 41,0%. Os resultados de composição

monossacarídica (TABELA 6) demonstraram que não houve degradação extensiva do polímero, sendo este representativo do polissacarídeo em sua forma nativa. DUARTE *et. al.*, (2001) relataram para as fucanas de *Sargassum stenophyllum* que uma solvólise de 3 horas promoveu uma redução dos resíduos de fucose com uma quase total dessulfatação do polissacarídeo. O tratamento solvolítico destas fucanas por 30 minutos, apesar de praticamente não ter promovido perda de unidades de fucose e xilose, não ocasionou a remoção dos grupos sulfato. Na solvólise por 4 ou 5 horas houve degradação das unidades mais sensíveis (fucose e xilose) concomitantemente à dessulfatação.

A fração Q2-0,6D foi também submetida à carboxirredução (com NaBH_4), que foi também realizada em apenas uma etapa. A conversão do ácido urônico ao respectivo açúcar neutro foi de 70,0% (TABELA 6).

TABELA 6 – COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA E ANÁLISE DE ÁCIDOS URÔNICOS DE Q2-0,6, Q2-0,6CR*, Q2-0,6D E Q2-0,6DCR

Análises	Fração			
	Q2-0,6	Q2-0,6CR*	Q2-0,6D	Q2-0,6DCR
Monossacarídeos (mol %) ^a				
Fucose	42,8	39,9	48,1	35,9
Xilose	24,9	12,6	24,1	14,0
Manose	5,9	11,1	5,7	14,1
Galactose	18,9	16,3	13,4	16,0
Glucose	7,4	20,1	8,7	20,0
Química				
Ácido urônico (%) ^b	11,0	2,5	nd	3,3
Carboxirredução (%) ^c	nd	77,3	nd	70,0

a = monossacarídeos obtidos na forma de acetatos de alditois por CLG-EM

b = TAYLOR; CONRAD, 1972

c = % de carboxirredução em relação à fração nativa (Q2-0,6)

nd = não determinado

Como pode ser observado na tabela 6, o processo de carboxirredução promoveu um aumento significativo tanto no teor de glucose quanto no teor de manose nas frações Q2-0,6CR* e Q2-0,6DCR. Assim como a fração Q1-0,4, previamente descrita neste trabalho, a análise por CLG-EM empregando a fração carboxirreduzida com NaBD₄ demonstrou que apenas as unidades de glucose são provenientes de ácidos urônicos, sendo o aumento relativo das unidades de manose provenientes da hidrólise facilitada após o processo de carboxirredução.

Destaca-se ainda o decréscimo significativo das unidades de xilose após o processo de carboxirredução, sendo este de aproximadamente 50,0% tanto para Q2-0,6CR (24,9 para 12,6%) quanto para Q2-0,6DCR (24,1 para 14,0%).

Para verificar o padrão de substituição das unidades monossacarídicas que constituem a fração Q2-0,6, a fração carboxirreduzida com NaBD₄ (Q2-0,6CR*) e a fração dessulfatada e carboxirreduzida (Q2-0,6DCR) foram submetidas à análises de metilação.

Como pode ser observado na tabela 7, um grande número de derivados metilados foi obtido para Q2-0,6CR* e Q2-0,6DCR, confirmando a grande complexidade estrutural desta fucana.

A fração Q2-0,6CR* apresenta uma grande variedade de derivados para a fucose, sendo os principais fucose na forma livre, 3,4-Me₂-Fucose e 4-Me-Fucose (7,9; 8,5 e 6,5%, respectivamente). A relativamente elevada percentagem de fucose livre pode ser devido a um processo de submetilação provocado pela presença de grupos sulfato, como já discutido para Q1-0,4. São observados ainda os derivados 2-Me-fucose, 2,3,4-Me₃-Fucose, 2,4-Me₂-Fucose e 2,3-Me₂-Fucose nas proporções de 5,5; 4,2; 3,6 e 3,3%, respectivamente. De forma semelhante à fração Q1-0,4, após o processo de dessulfatação (para Q2-0,6DCR) houve a diminuição do derivado 2-Me-Fucose (5,5 para 1,0%) concomitantemente ao aumento do derivado 2,3-Me₂-Fucose (3,3 para 7,6%). Este resultado demonstra que parte das unidades de fucose 4-ligadas são sulfatadas em C-3. Observa-se também o desaparecimento das unidades de fucose livres (7,9 para 0,0%) e um aumento dos derivados 4-Me-fucose (6,5 para 8,2%) e 2,3,4-Me₃-Fucose (4,2 para 9,0%), demonstrando que estas unidades são pontos de ramificação (em C-2 e C-3) sulfatados em C-4 e terminais não redutores trissulfatados, respectivamente. Os derivados 2,4-Me₂-Fucose (3,6 para 3,9%), 3,4-Me₂-Fucose (8,5 para 8,9%) não apresentaram mudanças

significativas em suas quantidades após o processo de dessulfatação, ou seja, parte das unidades de fucose são 3- e 2-ligadas. Estes dados estão de acordo com os obtidos para a fração Q1-0,4.

As unidades de xilose se apresentam nesta fucana como unidades terminais não redutoras (3,6%) e como unidades 2- e 4-substituídas (9,2%). Em Q2-0,6 carboxirreduzida com NaBD₄ (Q2-0,6CR*) e permetilado a análise por CLG-EM demonstrou que o perfil de fragmentação é condizente com a presença de ambos os derivados: 2,3- (majoritário) e 3,4-Me₂-Xilose. Após o processo de dessulfatação (em Q2-0,6DCR) observa-se o aumento do derivado tri-metilado (3,6 para 8,1%) concomitante à diminuição dos derivados co-eluídos 2,3- + 3,4-Me₂-Xilose (9,2 para 4,6%), sendo que o perfil de fragmentação revela a presença de 3,4-Me₂-Xilose e traços de 2,3-Me₂-Xilose para Q2-0,6DCR. Esses dados, em conjunto, demonstram a diversidade de substituição das unidades de xilose nesta fucana, as quais estão presentes como unidades simples não substituídas (TNR), unidades simples sulfatadas em C-4 (TNR 4-sulfatados) e unidades de xilose 2-ligadas.

A presença de unidades de xilose sulfatadas foi também reportada por LEITE et al. (1998) para as fucanas da alga parda *Spatoglossum schröderi*, onde estas unidades se encontram como cadeias de β-D-xilose (1→4)-ligadas ao C-2 das unidades de fucose. Diferentemente da alga parda *L. variegata*, que apresenta suas unidades de xilose parcialmente sulfatadas em C-4, as fucanas de *S. schröderi* apresentam essas unidades parcialmente sulfatadas no C-3.

A manose apresenta uma variedade de derivados mono- e di-metilados, sugerindo que estas unidades são pontos de ramificação do polímero. O principal derivado metilado é o 4,6-Me₂-Manose em ambas as frações, Q2-0,6CR* e Q2-0,6DCR (4,2 e 6,5%, respectivamente). Sendo assim, a manose está presente principalmente na forma 2,3-di-substituída.

A galactose também apresenta uma grande variedade de derivados metilados, sendo o principal 2,3,4-Me₃-Galactose, que apresentou um aumento de 6,0 para 9,9% após o processo de dessulfatação. Sendo assim, as unidades de galactose se apresentam principalmente na forma 6-ligada. Esse aumento é acompanhado do desaparecimento do derivado 4-Me-Galactose (4,5 para 0,0%), indicando que no polissacarídeo nativo as unidades de galactose se apresentam 2,3-di-sulfatadas. O desaparecimento do derivado 4,6-Me₂-Galactose (2,1 para

0,0%) é acompanhado da aparição do derivado 2,4,6-Me₃-Galactose (0,0 para 2,9%), indicando que estas unidades se apresentam sulfatadas em C-2. 2,3,6-Me₃-Galactose aparece em pequena quantidade no polissacarídeo dessulfatado (1,8%).

A presença de grupos O-sulfato nas unidades de galactose foi também relatada por DUARTE et al. (2001) para as fucanas de *S. stenophyllum*, onde estes grupos esterificam diferentes carbonos destas unidades.

O ácido glucurônico (fração Q2-0,6CR*) se apresenta na forma de unidades terminais não redutoras (5,4%) e 4-ligadas (3,6%), as quais não se apresentam sulfatadas, desde que não houve mudanças significativas na percentagem destes após o processo de dessulfatação. Estes resultados (obtidos após carboxirredução com NaBD₄) quando extrapolados para a fração carboxirreduzida com NaBH₄ (Q2-0,6DCR) definem 5,6 e 2,7% para as unidades relatadas anteriormente, respectivamente. A percentagem de derivados provenientes de ácido glucurônico no polímero original é condizente com a de ácido urônico determinada por método colorimétrico (TABELA 6).

De modo similar, as unidades de glucose no polímero original se apresentam 4-ligadas, tanto na fração Q2-0,6CR* quanto na Q2-0,6DCR (6,9 e 7,7%, respectivamente), como unidades terminais não redutoras, estando estas em baixas percentagens (1,9-1,6%) e como pontos de ramificação (2,3% para Q2-0,6CR* e 1,9% para Q2-0,6DCR).

TABELA 7 – PRINCIPAIS DERIVADOS METILADOS OBTIDOS DAS FRAÇÕES Q2-0,6 CR* E Q2-0,6CRD

Derivado metilado (mol %) ^a	Fração		Padrão de substituição
	Q2-0,6CR*	Q2-0,6CRD	
2,3,4-Me ₃ -Fuc ^b	4,2	9,0	TNR
2,4-Me ₂ -Fuc ^b	3,6	3,9	3-L
2,3-Me ₂ -Fuc ^b	3,3	7,6	4-L
3,4-Me ₂ -Fuc	8,5	8,9	2-L
2-Me-Fuc	5,5	1,0	4-L / 3-S
4-Me-Fuc	6,5	8,2	2,3-L
Fuc	7,9	-	2,3-L / 4-S; 2,3,4-S
2,3,4-Me ₃ -Xyl ^b	3,6	8,1	TNR
2,3 + 3,4-Me ₂ -Xyl	9,2	4,6 ^c	4-S + 2-L
2,3,4,6-Me ₄ -Man	1,6	1,4	TNR
2,3,6-Me ₃ -Man	2,6	2,1	4-L
4,6-Me ₂ -Man	4,2	6,5	2,3-L
3,6- Me ₂ -Man	-	1,3	2,4-L
2,6-Me ₂ -Man	1,7	1,4	3,4-L
3/4-Me-Man	1,7	tr	2,4,6-L / 2,3,6-L
Man	1,4	1,3	2,3,4,6-L
2,3,4,6-Me ₄ -Gal	1,1	2,2	TNR
2,3,6-Me ₃ - Gal	-	1,5	4-L
2,4,6-Gal	-	1,7	3-L
2,3,4- Me ₃ - Gal	5,4	9,9	6-L
4,6-Gal	1,6	-	3-L / 2-S
4-Me-Gal	4,5	-	6-L / 2,3-S

Continua

Gal	1,8	-	2,3,4,6-L e/ou 2,3,6-S
2,3,4,6-Me ₄ -GlcA	5,4	5,6	TNR
2,3,6-Me ₃ -GlcA	3,6	2,7	4-L
2,3,4,6-Me ₄ -Glc	1,9	1,6	TNR
2,3,6-Me ₃ -Glc	6,9	7,7	4-L
Glc	2,3	1,9	2,3,4,6-L

a = Derivados metilados na forma de acetatos de alditóis obtidos por CLG-EM

b = Separados e quantificados por CLG-EM utilizando coluna capilar DB-23

c = Apenas o derivado 3,4-Me₂-Xyl é observado para a fração dessulfatada

L = Ligação glicosídica

S = Grupo sulfato

TNR = Terminal Não Redutor

tr = traços

- = não detectado

4.7 ANÁLISES DE RMN DE ¹³C DA FRAÇÃO Q2-0,6

O espectro de RMN de ¹³C de Q2-0,6 (FIGURA 11) apresentou um aumento do sinal correspondente ao -CH₃ de fucose (15,3 ppm) quando comparado ao espectro da fração de origem (Q2) (FIGURA 10). Isto é condizente com o processo de purificação, visto que Q2-0,6 foi a fração que apresentou a maior percentagem de fucose em sua composição monossacarídica (42,8%) (TABELA 5).

A fração Q2-0,6 apresenta-se homogênea com relação à massa molecular (HPSEC-MALLS, FIGURA 9). Apesar disso, seu espectro de RMN de ¹³C é altamente complexo e com sinais alargados devido à sobreposição destes. Este tipo de espectro é característico de fucanas sulfatadas obtidas de algas pardas e, como descrito por MULLOY, MOURÃO e GRAY (2000), indicam heterogeneidade e possíveis ramificações, o que limita a capacidade das análises de RMN. O espectro de RMN de ¹³C da fração dessulfatada (Q2-0,6D) apresenta sinais mais definidos, devido à remoção dos grupos sulfato, o que promoveu uma simplificação do polímero, embora tal espectro ainda se apresente complexo e com muitas sobreposições.

Tanto a fração nativa (Q2-0,6), quanto a fração dessulfatada (Q2-0,6D) apresentam um grupo de sinais centrado em 174,9 ppm, correspondente à carboxila (C-6) das unidades de ácidos glucurônicos, como previamente determinado.

Em ambas as frações, Q2-0,6 e Q2-0,6D, são observados grupos de sinais em 99,5 – 98,3 ppm, que podem ser atribuídos às unidades de fucose 3- e 4-ligadas (JAIN; MATTA, 1990), e em 95,1 – 93,3 ppm, podendo estes ser atribuídos às unidades de fucose 2- e 2,3-substituídas (CARDOSO, 2003). Nota-se, ainda em Q2-0,6D, sinais menores centrados em 96,9 e 96,5 ppm, correspondentes às unidades de fucose 4-ligadas 3-sulfatadas em diferentes ambientes químicos (DUARTE, 2001). A presença de sinais referentes a sulfatação em Q2-0,6D confirma uma dessulfatação parcial do mesmo (65,0%).

Assim como na fração Q1-0,4, e ainda se tratando das unidades de fucose 4-ligadas 3-sulfatadas, pode-se observar que o processo de dessulfatação promoveu um deslocamento do sinal em 79,0 ppm (C-4 dessas unidades) para 80,6 e 80,4 ppm (C-4 de fucose 4-ligada). Ainda, o sinal em 76,4 ppm, o qual pode ser atribuído em parte ao C-3 de fucose 4-ligada 3-sulfatada mostra-se ausente na fração Q2-0,6D (DUARTE, 2001).

No espectro de RMN de ^{13}C da fração dessulfatada foi possível observar os sinais em 103,9; 73,4; 75,6; 69,2 e 65,1 ppm, correspondentes aos C-1–C-5 das unidades simples de xilose não substituídas, respectivamente (USOV; BILAN; SHASHKOV, 1997). Observa-se ainda o sinal em 101,5 ppm, que pode ser atribuído às unidades de xilose 2-ligadas (HABIBI; VIGNON, 2005).

Na fração nativa, os sinais em 76,4 (atribuído também a C-3 de fucose 4-ligada 3-sulfatada) e 63,0 ppm podem ser atribuídos ao C-4 (KOVAC et al., 1980) e C-5 (VIANA, 2005) de unidades de xilose 4-substituídas (respectivamente). Após o processo de dessulfatação observa-se o desaparecimento destes sinais, juntamente ao aumento dos sinais em 69,2 e 65,1 ppm (C-4 e C-5 de unidades de xilose não substituídas, respectivamente). O sinal em 65,1 ppm mostrou-se invertido no experimento de DEPT (FIGURA 13), confirmando que se trata do C-5 das unidades xilose. Esses dados, em conjunto com as análises de metilação, indicam a presença de unidades simples de xilose sulfatadas em C-4. O processo de dessulfatação promoveu também o desaparecimento do sinal em 104,2 ppm, que pode ser atribuído ao C-1 das unidades de xilose 4-sulfato em ambiente químico sulfatado e,

após a solvólise, esse sinal foi deslocado para 103,9 ppm (C-1 de unidades simples de xilose), o qual se mostrou aumentado no espectro de Q2-0,6D.

O sinal em 69,2 ppm foi atribuído ao C-4 das unidades simples de xilose e ao C-3 das unidades de fucose 4-ligadas, podendo ainda corresponder ao C-6 das unidades de galactose 6-substituídas, visto que o mesmo mostrou-se parcialmente invertido (diminuído) no experimento de DEPT. Esse dado está de acordo com as análises de metilação. O grupo de sinais em 61,7 - 60,3 ppm também foi invertido neste experimento, podendo ser atribuídos ao C-6 das unidades de hexoses presentes na fração.

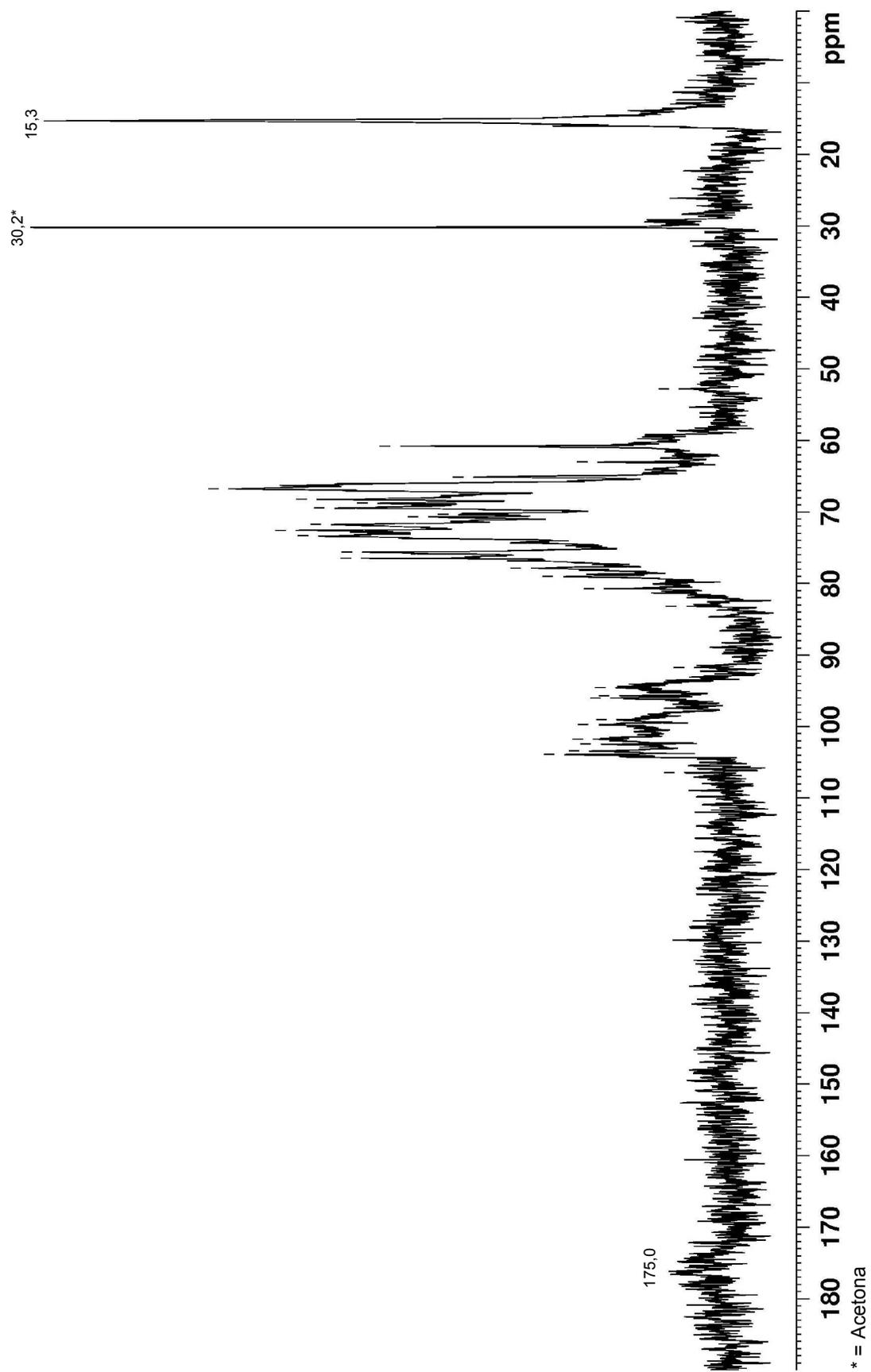
FIGURA 10 – ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DA FRAÇÃO Q2

FIGURA 11 – ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DA FRAÇÃO Q2-0,6

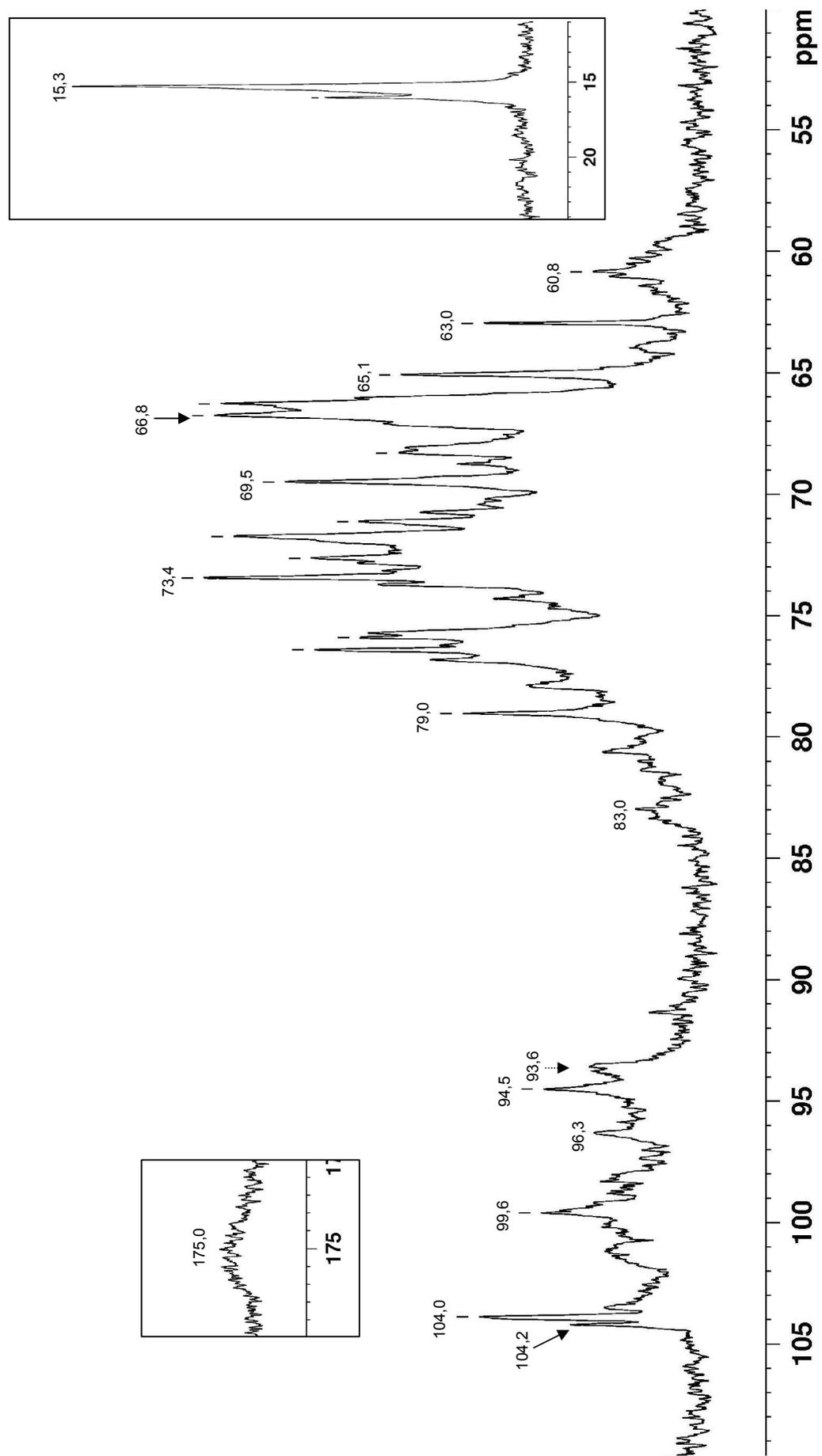


FIGURA 12 – ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DA FRAÇÃO Q2-0,6D

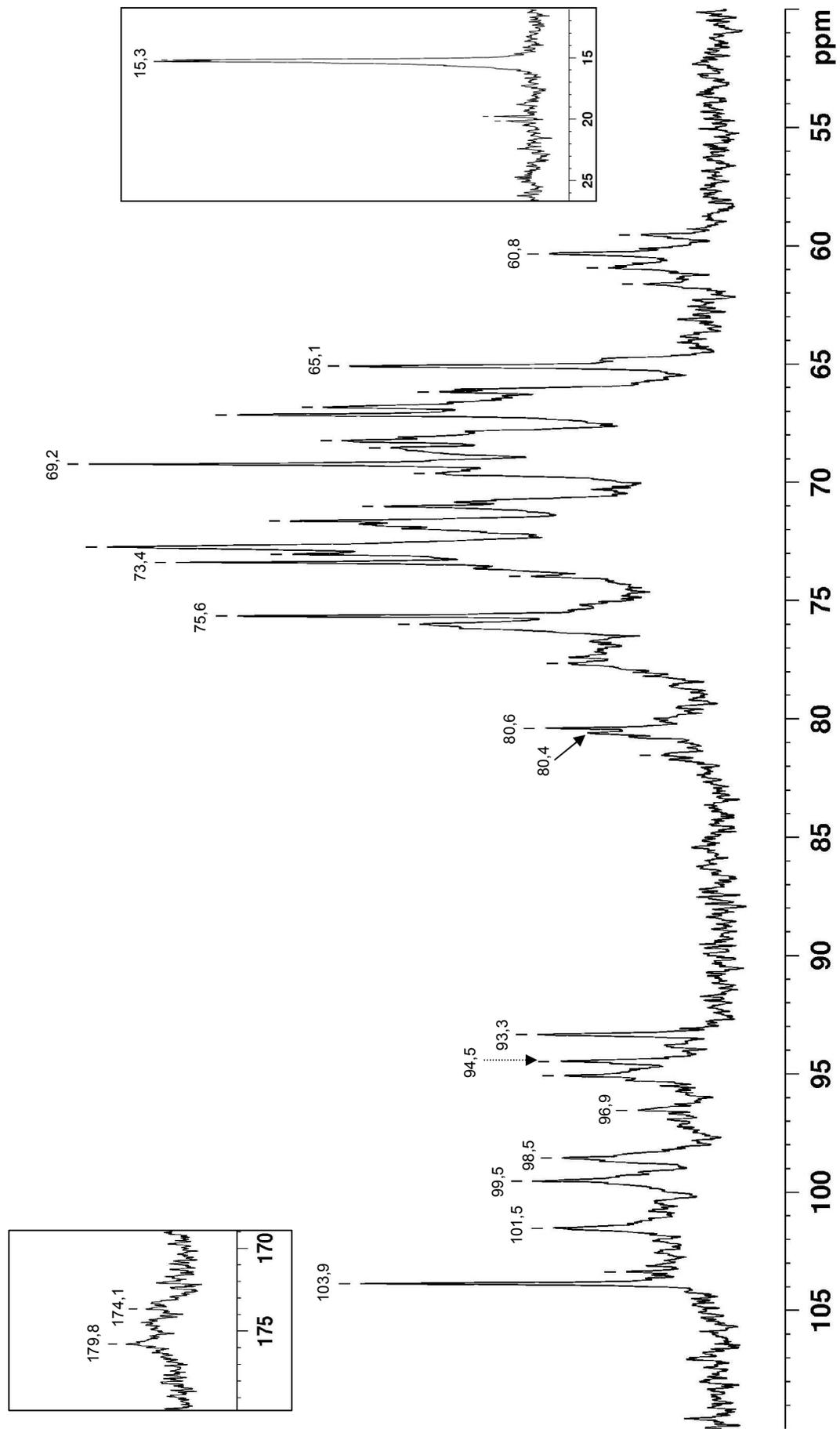
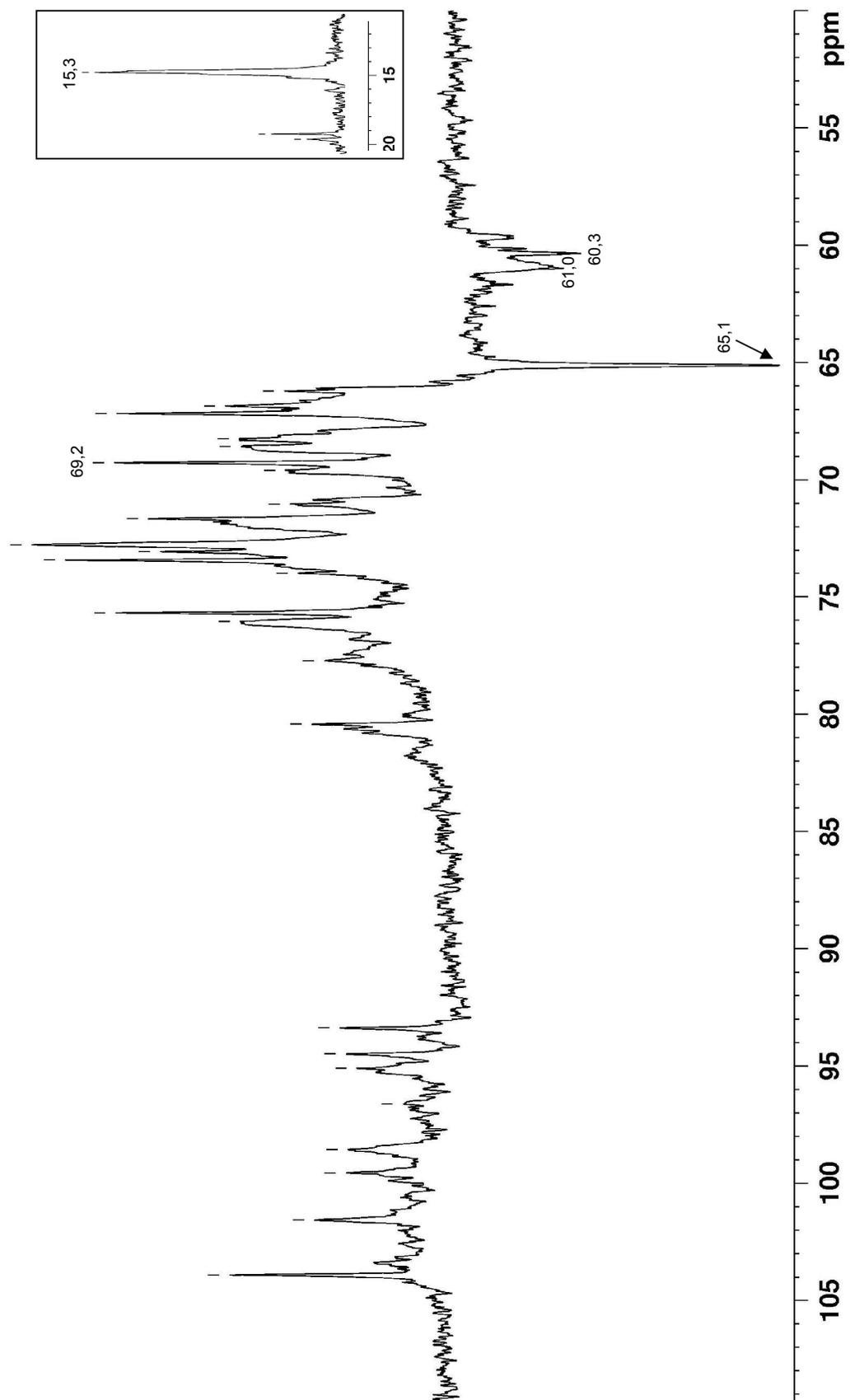


FIGURA 13 – ESPECTRO DE RMN DEPT DA FRAÇÃO Q2-0,6D



5. CONCLUSÃO

- A alga parda *Lobophora variegata* sintetiza diferentes heterofucanas ramificadas constituídas majoritariamente por fucose e xilose, além de manose, glucose, galactose e ácido glucurônico.
- Os grupos sulfato esterificam diferentes posições das unidades de fucose, xilose e galactose.
- A estrutura química da fucana Q1-0,4, de um modo geral, é similar à de Q2-0,6, sendo estas frações representativas das fucanas biossintetizadas pela alga parda *L. variegata*. Essas duas frações se diferenciam pela presença de unidades de galactose 6-ligadas 2,3-di-sulfatadas em Q2-0,6.
- A presença de xilose 4-sulfato é pela primeira vez relatada como constituinte de fucanas de algas pardas.

REFERÊNCIAS

- ANDREWS, K. T.; KLATT, N.; ADAMS, Y.; MISCHINICK, P.; SCHWARTZ, -A. R. Inhibition of chondroitin-4-sulfate-specific adhesion of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes by sulfated polysaccharides. **Infec. Immun.**, v. 73, n.7, p. 4288-4294, 2005.
- ANGULO, Y., LOMONTE, B. Inhibitory effect of fucoidan on the activities of crotoaline snake venom myotoxic phospholipases A₂. **Biochem. Pharmacol.**, v. 66, p. 1993-2000, 2003.
- ASGHAR, S. S. Pharmacological manipulation of complement system. **Pharmacol.**, v. 36, p. 223-244, 1984. Review.
- ASPINALL, G. O. Isolation and fractionation of polysaccharides. In: _____. **The Polysaccharides**. NewYork: Academic Press, 1983, v. 1, p. 19-26.
- BABA, M.; SNOECK, R.; PAULWELS.; CLERCQ, E. DE. Sulfated polysaccharides are potent and selective inhibitors of various enveloped viruses, including herpes simplex virus, cytomegalovirus, vesicular stomatitis virus and human immunodeficiency virus. **Antimicrob. Agents Chemother.**, Washington, v. 32, p. 1742-1745, 1988.
- BERNARDI, G.; SPRINGER, G. F. Properties of highly purified fucan. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 237, p. 75-80, 1962.
- BILAN, M. I.; GRACHEV, A. A.; USTUZHANINA, N. E.; SHASHKOV, A. S.; NIFANTIEV, N. E.; USOV, A. I. Structure of a fucoidan from the brown seaweed *Fucus evanescens* C. Ag. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 337, p. 719-730, 2002.
- BILAN, M. I.; GRACHEV, A. A.; USTUZHANINA, N. E.; SHASHKOV, A. S.; NIFANTIEV, N. E.; USOV, A. I. A highly regular fraction of a fucoidan from the brown seaweed *Fucus distichus* L. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 339, p. 511-517, 2004.
- BILAN, M. I.; GRACHEV, A. A.; SHASHKOV, A. S.; NIFANTIEV, N. E.; USOV, A. I. Structure of a fucoidan from the brown seaweed *Fucus serratus* L. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 341, p. 238-245, 2006.
- BLONDIN, C.; CHAUBET, F. NARDELLA, A.; SINQUIN, C.; JOSEFONVICZ, J.; Relationship between chemical characteristics and anticomplementary activity of fucans. **Biomaterials**, Kindlington, v. 17, p. 597-603, 1996.
- BORRIS, R.; KRAH, M.; BRUMER, H.; KERZHNER, M. A.; IVANEM, D. R.; ENEYSKAYA, E. V.; ELYAKOVA, L. A.; SHISHLYANNIKOV, S. M.; SHABALIN, K. A.; NEUSTROEV, K. N. Enzymatic synthesis of 4-methylumbelliferyl (1→3)-β-D-glucooligosaccharides—new substrates for β-1,3-1,4-D-glucanase. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 338, n. 14, p. 1455-1467, 2003.

CARDOSO, M. A. **Estrutura química de fucanas e laminarana de *Leathesia difformis* e *Pocockiella variegata***. Curitiba, 2003. 91 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Paraná.

CARPITA, N. C.; SHEA, E. M. Linkage structure of carbohydrates by gas-chromatography-mass spectrometry (GC-MS) of partially methylated alditol acetates. In: BIERMAN, C. J.; MCGINNIS, G. D. **Analysis of carbohydrates by GLC and MS**. Florida, CRC Press., 1989, p. 157-217.

CHAUBET, F.; CHEVOLOT, L.; JOZEVINICZ, J.; DURAND, P.; VIDAL, B- C. Relationships between chemical characteristics and anticoagulant activity of low molecular weight fucans from marine algae. In: PAULSEN, B. S. **Bioactive Carbohydrate Polymers**. Netherlands: Kluwer Academic 2000, p. 59-84.

CHEVOLOT, L.; COLLIEC, -J. S.; FOUCAULT, A.; RATISKOL, J.; SINQUIN C. Preliminary report on fraction of fucans by ion-exchange displacement centrifugal partition chromatography. **J. Chromatogr.**, Amsterdam, v. 706, p.43-54, 1998.

CHEVOLOT, L.; FOUCAULT, A.; CHAUBET, F.; KERVAREC, N.; SINQUIN, C.; FISHER, A. M.; BOISSON-VIDAL, C. Further data on the structure of brown seaweed fucans: relationship with anticoagulant activity. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 319, p. 154-165, 1999.

CHEVOLOT, L.; MULLOY, B.; RATISKOL, J.; FOUCAULT, A.; COLLIEC, -J. S. A disaccharide repeat unit is the major structure in fucoidans from two species of brown algae. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 330, p. 529-535, 2001.

CHIZHOV, A. O.; DELL, A.; MORRIS, H. R.; REASON, A. J.; HASLAM, S. M.; MCDOWELL, R. A.; CHIZHOV, O. S.; USOV, A. I. Structural analysis of laminarans by MALDI and FAB mass spectrometry. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 310, p. 203-210, 1998.

CHIZHOV, A. O.; DELL, A.; MORRIS, H. R.; HARSLAM, S. M.; MCDOWELL, R. A.; SHASHKOV, A. S.; NIFANTÉV, N. E.; KHATUNTSEVA, E. A.; USOV, A. I. A study of fucoidan from the brown seaweed *Chorda filum*. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 320, p. 108-119, 1999.

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

CORRÊA, J. B. C. **Métodos químicos para a determinação de estrutura de polissacarídeos**. Curitiba, 1971. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Paraná.

DANIEL, R.; BERTEAU, O.; JOZEFONVICZ, J.; GOASDONE, N. Degradation of algal (*Ascophyllum nodosum*) fucoidan by an enzymatic activity contained in digestive glands of the marine mollusc *Pecten maximus*. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 322, p. 291-297, 1999.

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

DOLL, M. H.; BAKER, B. R. Irreversible enzyme inhibitors. Inhibitors of guinea pig complement derived by quaternization of substituted pyridines with benzyl halides. **J. Med. Chem.**, v. 19, p. 1079-1088, 1976.

DUARTE, M. E. R; CARDOSO, M. A., NOSEDA, M. D.; CERESO, A. S. Structural studies form the brown seaweed *Sargassum stenophyllum*. **Carbohydr. Res.**, v. 333, p. 281-293, 2001.

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

FILISSETTI-COZZI, T. M. C. C.; CARPITA, N. C. Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars. **Anal. Biochem.**, v. 197, p. 157-162, 1991.

FUJIK, K.; MATSUYAMA, H.; YANO, T. Protective effect of sodium alginates against bacteria infection in common carp. **J. Fish Dis.**, v. 17, p. 349-355, 1994.

HABIBI, Y.; VIGNON, M. R. Isolation and characterization of xylans from seed pericarp of *Argania spinosa* fruit. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 340, p. 1431-1436, 2005.

HANDA, N.; NISIZAWA, K. Structural investigation of a laminaran isolated from *Eisenia bicyclis*. **Nature**, London, v. 192, p. 1078-1080, 1961.

HONG, k.; KINOSHITA, T.; MIYAZAKI, W.; IZAWA, T.; INOUE, K. An anticomplementary agent K-76 monocarboxylic acid: its site and mechanism of inhibition of the complement activation cascade. **J. Immunol.**, v. 122, p. 2418-2423, 1979.

HONYA, M.; MORI, H.; ANZAI, M; ARAKI, Y.; NISIZAWA, K. Montly changes in the content of fucans, their constituent sugars and sulfate in cultured *Laminaria japonica*. **Hydrobiol.**, v. 399, n. 4, p. 411-416, 1999.

ITOH, H.; NODA, H.; AMANO, H.; ZHUANG, C.; MIZUNO, T.; ITO, H. **Anticancer Res.**, v. 13, p. 2045-2052, 1993.

JAIN, R. K.; MATTA, K. L. Synthesis of methyl 2-O-(sodium α -L-fucopyranosyl 3- and 4-sulfate)- α -L-fucopyranoside. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 208, p. 280-286, 1990.

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

KIM, Y. -T.; KIM, E. -H.; CHEONG, C.; WILLIAMS, D. L.; KIM, C. -W.; LIM, S. T. Structural characterization of β -D-(1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 6)-linked glucans using NMR spectroscopy. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 328, n. 3, p. 331-341, 2000.

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

KOVAC, P.; HIRSCH, J.; SHASHKOV, A. L.; USOV, A., I.; YAROTSKY, S. V. ^{13}C spectra of xylo-oligosaccharides and their application to the elucidation of xylan structures. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 85, p. 177-185, 1980.

KOYANAGI, S.; TANIGAWA, N.; NAKAGAWA, H.; SOEDA, S.; SHIMENO, H. Oversulfation of fucoidan enhances its anti-angiogenic and antitumor activities. **Biochem. Pharmacol.**, Tokyo, v. 65, p. 173-179, 2003.

KULICKE, W. M.; LETTAU, A. I.; THIELKING, H. Correlation between immunological activity, molar mass, and molecular structure of different (1 \rightarrow 3)- β -D-glucans. **Carbohydr. Res.**, v. 272, p. 135-143, 1997.

LEITE, E. L.; MEDEIROS, M. G. L.; ROCHA, H. A. O.; FARIAS, G. G. M.; DA SILVA, L.; CHAVANTE, S. F.; DE ABREU, L. D.; DIETRICH, C. P.; NADER, H. B. Structure and pharmacological activities of a sulfated xylofucoglucuronan from the alga *Spatoglossum schröderi*. **Plant Sci.**, v. 132, p. 215-228, 1998.

LEWIS, J., G.; STANLEY, N. F.; GUIST, G. G. Commercial production and applications of algal hydrocolloids. In: LEMBI, C. A.; WAALAND, J. R. **Algae and human affairs**. Cambridge University Press, 1988, p. 205-236.

LI, B.; WEI, X. -J.; SUN, J. -L.; XU, S. -Y. Structural investigation of a fucoidan containing a fucose-free core from the brown seaweed, *Hizikia fusiforme*. **Carbohydr. Res.**, v. 341, p. 1135-1146, 2006.

LOMONTE, B.; TARKOWSKI, A.; BAGGE, U.; HANSON, L. A.. Neutralization of the cytolytic and myotoxic activities of phospholipases A_2 from *Bothrops asper* snake venom by glycosaminoglycans of the heparin/heparin sulfate family. **Biochem. Pharmacol.**, v. 47, p. 1509-1518, 1994.

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

MABEAU, S.; KLOAREG, B.; JOSELEAU, J. -P. Fractionation and analysis of fucans from brown algae. **Phytochem.**, Oxford, v. 29, p. 2441-2445, 1990.

MAUZAC, M.; MAILLET, F.; JOZEFONVICZ, J.; KAZATCHKINE, M. D. Anticomplementary activity of dextran derivatives. **Biomaterials**, v. 6, p. 61-63, 1985.

MARAIS, M. -F.; JOSELEAU, J. -P. A fucoidan fraction from *Ascophyllum nodosum*. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 336, p. 155-159, 2001.

MCCLURE, M. O.; MOORE, J. P.; BLANC, D. F.; SCOTTING, P.; COOK, G. M. W.; KEYNES, R. J.; WEBER, J. N.; DAVIES, D.; WEISS, R. A. Investigation into the mechanism by which sulfated polysaccharides inhibit HIV-infection in vitro. **AIDS Res. Human. Retrovir.**, v. 8, n. 1, p. 19-26, 1992.

MIAN, A. J. E; PERCIVAL, E. Carbohydrates from the brown seaweeds *Himanthalia lorea* e *Bifurcaria bifurcata*. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 26, p. 147-161, 1973.

MOURÃO, P. A. S.; PEREIRA, M. S. Searching for alternatives to heparin. Sulfated fucans from marine invertebrates. **Trends Cardiovasc. Méd.**, v. 9, n. 8, p. 225-232, 2000.

MULLOY, B.; FOSTER, M. J.; JONES, C. DRAKE, A. F.; JOHNSON, E. A.; DAVIES, D. B. The effect of variation of substitution on the solution conformation of heparin: a spectroscopic and molecular modelling study. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 55, p. 1-26, 1994.

MULLOY, B.; MOURÃO, P. A. S.; GRAY, E. Structure/function studies of anticoagulant sulphated polysaccharides using NMR. **J. Biotechnol.**, v. 77, p. 123-135, 2000.

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

NAGUMO, T.; NISHINO, T. Fucan sulfates and their anticoagulant activities. In: DUMITRIU, S. **Polysaccharides in Medicinal Applications**. New York: Marcel Dekker p. 545-574, 1996.

NARDELLA, A.; CHAUBET, F.; BOISSON, -V. C.; BLONDIN, C.; DURAND, P.; JOSEFONVICZ, J. Anticoagulant low molecular weight fucans produced by radical process and ion exchange chromatography of high molecular weight fucans extracted from the brown seaweed *Ascophyllum nodosum*. **Carbohydr. Res.**, Amsterdã, v. 289, p. 201-208, 1996.

NISHINO, T.; NAGUMO, T.; KIYOHARA, H.; YAMADA, H. Structural characterization of a new anticoagulant fucan sulfate from the brown seaweed *Ecklonia kurome*. **Carb. Res.**, Amsterdam, v. 211, p. 77-90, 1991.

NISHINO, T.; FUKUDA, A.; NAGUMO, T.; FUJIHARA, M.; KAJI, E. Inhibition of the generation of thrombin and factor Xa by a fucoidan from the brown seaweed *Ecklonia kurome*. **Thromb. Res.**, v. 96, p. 37-49, 1999.

OLAFSDOTTIR, E. S.; OMARSDOTTI, S.; PAULSEN, S. B.; WAGNER, H. Immunologically active O-6-branched (1→3)-β-glucan from the lichen *Thamnia vermicularis* var. *subuliformis*. **Phytomed.**, v. 10, n. 4, p. 318-324, 2003.

- PAINTER, T. J. Algal polysaccharides. In: ASPINALL, G. O. **The polysaccharides**. New York: Academic Press, 1983. v. 2, p. 195-285.
- PATANKAR, S.; OEHNINGER, S.; BARNETT, T.; WILLIAMS, R. L.; CLARK, G. F. A revised structure for fucoidan may explain some of its biological activities. **J. Biol. Chem.**, v. 268, n. 29, p. 21770-21776, 1993.
- PATCHEN, W. L.; D'ALESSANDRO, M. M.; BROOK, I. Glucan mechanisms involved in its radioprotective effect. **J. Leukocyte Biol.**, v. 42, p. 95-105, 1987.
- PERCIVAL, E.; MCDOWELL, R. H. **Chemistry and Enzymology of Marine Algal Polysaccharides**. London: Academic Press, 1967.
- PONCE, N. M. A.; PUJOL, C. A.; DAMONTE, E. B.; FLORES, M. L.; STORTZ, C. A. Fucoidans from the brown seaweed *Adenocystis utricularis*: extraction, methods, antiviral activity and structural studies. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 338, p. 153-165, 2003.
- PREOBRAZHENSKAYA M. E.; BERMAN A. E.; MIKHAILOV V. I.; USHAKOVA N. A.; MAZUROV A. V.; SEMENOV A. V.; USOV A. I.; NIFANT'EV N. E.; BOVIN N. V. Fucoidan inhibits leukocyte recruitment in a model peritoneal inflammation in rat and blocks interaction of P-selectin with its carbohydrate ligand. **Biochem. Mol. Biol. Int.**, Moscow, v. 43, n. 2, p. 443-451, 1997.
- RAM S.; BEYER, R.; SHEPHERD, M. G.; SULLIVAN, P. A. Isolation and analysis of neutral glucans from *Ecklonia radiata* and *Cystophora scalaris*. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 96, p. 95-104, 1981.
- RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2001, p. 344-366.
- RIJKEN, D. C.; WIJNGAARDS, G.; WELBERGEN, J. Immunological characterization of plasminogen activator activities in human tissue and body fluids. **J. Lab. Clin. Med.**, v. 97, p. 477-486, 1981.
- SAITO, k.; NISHIJIMA, M.; OHNO, N. Structure and antitumor activity of the less-branched derivatives of an alkali-soluble glucan isolated from *Omphalia lapidescens*. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 40, p. 261-263, 1992.
- SHAEFFER, D. J.; KRYLOV, V. S. Anti-HIV activity of extracts and cyanobacteria. **Exotoxicol. Environ. Safety**, v. 45, n. 2, p. 208-227, 2000. Review.
- SHARP, I.; VALENT, B.; ALBERSCHEIM, P. Purification and partial characterization of a β -glucan fragment that elicits phytoalexin accumulation in soybean. **J. Biol. Chem.**, v. 259, p. 11312-11320, 1984.
- SHIBATA, H.; KIMURA, -T. I.; NAGAOKA, M.; HASHIMOTO, S.; AIYAMA, R.; IHA, M.; UEYAMA, S.; YOJKOKURA, T. **Biofactors**, v. 11, p. 235-245, 2000.

SKAJAK, -B. G. Alginates biosynthesis and some structure-function relationships relevant to biomedical and biotechnological applications. **Biochem. Plant. Polysacch.**, v. 20, n. 1, p. 27-33, 1992.

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

SOEDA, S.; FUJII, N.; NAGAMATSU, A. Oversulfated fucoidan and heparin suppress endotoxin induction of plasminogen-activator inhibitor-1 in cultured human endothelial-cells: their possible mechanism of action. **Biochem. Biophys. Acta**, v. 1269, p. 85-90, 1995.

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

STONE, B. A.; ANDERSON, M. A. **Carbohydr. Polym.**, v. 5, p. 115-120, 1985.
TAKO, M.; YOZA, E.; TOHMA, S. Chemical Characterization of Acetyl and Alginate from Commercial Cultured *Cladosiphon okamuranus*. **Bot. Mar.**, Berlin, v. 43, p. 393-398, 2000.

TAYLOR, R. L.; CONRAD, H. E. Stoichiometric Depolymerization of Polyurônides and Glycosaminoglycuranans to Monossaccharides following Reduction of Their Carbodiimide-Activated Carboxyl Groups. **Biochemistry**, v. 11, p. 1383-1388, 1972.

USOV, A. I.; BILAN, M. I.; SHASHKOV, A. S. Structure of a sulfated xylogalactan from the calcareous red alga *Corallina pilulifera* P. et R. (Rhodophyta, Corallinaceae). **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 303, p. 93-102, 1997.

USOV, A. I.; SMIRNOVA, G. P.; BILAN, M. I.; SHASHKOV, A. S. **Bioorg. Khim.**, v. 24, p. 437-455 (Russ. J. Bioor. Chem., 1998, v.24, p. 382-389 (English translation), 1998.

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

VIANA, A. G. **Caracterização química de polissacarídeos neutros e sulfatados isolados de algas vermelhas e cinética química da reação de ciclização em galactanas sulfatadas**. Curitiba, 2005. 157 f. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Paraná.

WEILER, J. M.; EDENS, R. E.; LINHARDT, J.; KAPELANSKI, D. P. Heparin and modified heparin inhibit complement activation *in vivo*. **J. Immunol.**, v. 148, p. 3210-3215, 1992.

WOLSKI, E. A.; LIMA, C.; AGUSTI, R.; DALEO, G. R.; ANDREU, A. B.; LEDERKREMER, R. M. An α -glucan elicitor from the cell wall of a biocontrol

binucleate *Rhizoctonia* isolate. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 340, n. 4, p. 619-627, 2005.

YAMADA, H. Structure and antitumor activity of an alkali-soluble polysaccharide from *Cordyceps ophioglossoides*. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 125, p. 107-115, 1984.

YOSHIDA, T.; FENNIE, C.; LASKY, L. A.; LEE, Y. C. **Eur. J. Biochem.**, v. 222, p. 703-709, 1994.

ZVYAGINTSEVA, T. N.; SHIROKOVA, N. I.; ELYAKOVA, L. A. The structure of laminarans from some brown algae (in Russian). **Bioorgan. Khim.**, v. 20, n. 12, p. 1349-1358, 1994.

ZVYAGINTSEVA, T. N.; ELYAKOVA, L. A.; ISAKOV, V. V. Enzymatic conversion of laminarans into 1 → 3; 1 → 6-β-D-glucans, possessing immunostimulating activity (in Russian). **Bioorgan. Khim.**, v. 21, n. 2, p. 218-225, 1995.

ZVYAGINTSEVA, T. N.; SHEVCHENKO, N. M.; POPIVNICH, I. B.; ISAKOV, V. V.; SCOBUN, A. S.; SUNDUKOVA, E. V.; ELYAKOVA, L. A. A new procedure for the separation of water-soluble polysaccharides from brown seaweeds. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 322, p. 32-39, 1999.

ZVYAGINTSEVA, T. N.; SHEVCHENKO, N. M.; NAZAROVA, I. V.; SCOBUN, A. S.; LUK'YANOV, P. A.; ELYAKOVA, L. A.. Inhibition of complement activation by water-soluble polysaccharides of some far-eastern brown seaweeds. **Com. Biochem. Physiol.** Part C, Oxford, v.126, p. 209215, 2000.

ZVYAGINTSEVA, T. N.; SHEVCHENKO, N. M.; CHIZHOV, A. O.; KRUPNOVA, T. N.; SUNDUKOVA, E. V.; ISAKOV, V. V. Water-soluble polysaccharides of some far-eastern brown seaweeds. Distribution, structure, and their dependence on the developmental conditions. **J. Exper. Mar. Biol. Ecol.**, v. 294, p. 1-13, 2003.

ZVYAGINTSEVA, T. N.; SHEVCHENKO, N. M.; NAZARENKO, E. L.; GORBACH, V. I.; URVANTSEVA, A. M.; KISELEVA, M. I.; ISAKOV, V. V. Water-soluble polysaccharides of some brown algae of the Russian far-east. Structure and biological action of low-molecular mass polyuronans. **J. Exper. Mar. Biol. Ecol.**, v. 320, p. 123-131, 2005.

ANEXO

ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DA FRAÇÃO Q3

