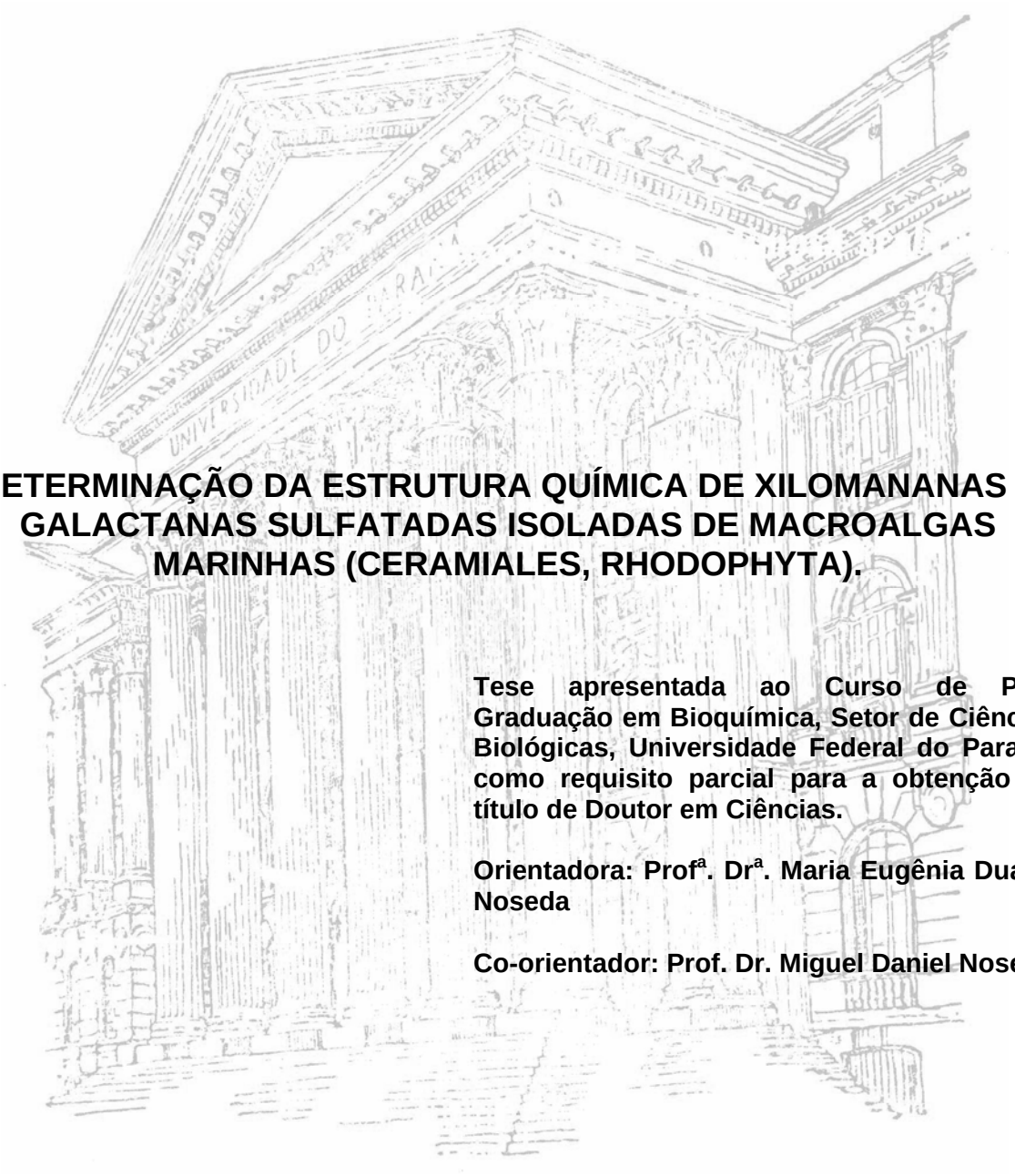
MARCO ANDRÉ CARDOSO



DETERMINAÇÃO DA ESTRUTURA QUÍMICA DE XILOMANANAS E GALACTANAS SULFATADAS ISOLADAS DE MACROALGAS MARINHAS (CERAMIALES, RHODOPHYTA).

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

Orientadora: Prof[a]. Dr[a]. Maria Eugênia Duarte Noseda

Co-orientador: Prof. Dr. Miguel Daniel Noseda

CURITIBA

2007

MARCO ANDRÉ CARDOSO

DETERMINAÇÃO DA ESTRUTURA QUÍMICA DE XILOMANANAS E GALACTANAS SULFATADAS ISOLADAS DE MACROALGAS MARINHAS (CERAMIALES, RHODOPHYTA).

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

Orientadora: Prof[a]. Dr[a]. Maria Eugênia Duarte Noseda

Co-orientador: Prof. Dr. Miguel Daniel Noseda

CURITIBA

2007

AGRADECIMENTOS

Ao meus pais, José Abelardo e Irene, aos meus irmãos Andréa e Maurício por toda a motivação, carinho e incentivo que tenho recebido sempre.

A Prof. Maria Eugênia R. Duarte Noseda, com quem eu tive o privilégio de compartilhar toda a minha caminhada acadêmica. Obrigada pela orientação, pela confiança, pelos estímulos e pelo carinho e amizade sincera que conseguimos conquistar neste período.

Ao Prof. Miguel D. Noseda, grande pesquisador que, com seu exemplo, me ensinou muitas coisas sobre ciência e sobre a vida. Obrigada pela orientação e pelo seu entusiasmo em compartilhar comigo as intrigantes estruturas dos polissacarídeos.

Aos meu amigos André B. mariano e Ricardo Wagner, com quem eu aprendi muito, discutimos resultados e convivi com grande amizade.

As amigas do laboratório Bianca, Luciana e Juliana (minha afilhada!), pela convivência agradável, pelo carinho, apoio e por me ajudar em todos os mais diferentes momentos da minha vida.

Aos amigos Diogo, Alexandre e Thales pelo incentivo, carinho, momentos de descontração e conversas, especialmente no caminho para o “RU”.

Ao Prof. Guilherme Sassaki pelo auxílio científico e disponibilidade em realizar as análises de RMN.

À Rosane e à Andréia pelas análises de GC, GC-MS e HPSEC-MALLS.

À Coordenação do Curso de Pós-graduação em Bioquímica, representada pela Prof[a]. Leda Satie Chubatsu e a todos os professores do Depto. de Bioquímica e Biologia Molecular, pelo estímulo.

À Dona Marilza Lamour, secretária do Curso de Pós-graduação em Bioquímica, pelos auxílios prestados. Aos funcionários do Departamento, às Bibliotecárias, sem os quais este trabalho não poderia ser concluído.

À todos que, de uma forma ou de outra, foram importantes para a realização desta tese e para meu amadurecimento científico, o meu muito obrigada!

Ao CNPq e ao PRONEX-Carboidratos pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS..... iv
LISTA DE TABELAS..... vi
LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS E SIGLAS..... viii
RESUMO..... ix
ABSTRACT..... X
1. INTRODUÇÃO..... 1
1.1. ALGAS VERMELHAS..... 1
1.2. GALACTANAS SULFATADADAS..... 3
1.2.1. GALACTANAS DO TIPO AGARANAS..... 5
1.2.2. GALACTANAS DA ORDEM CERAMIALES..... 8
1.2.3. MANANAS E XILOMANANAS..... 12
1.2.4**.** ÁCIDO PIRÚVICO..... 13
2. OBJETIVOS..... 17
2.1. OBJETIVO GERAL..... 17
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... 17
3. MATERIAIS E MÉTODOS..... 18
3.1.ESPÉCIES ESTUDADAS E SEUS POSICIONAMENTOS SISTEMÁTICOS..... 18
3.2. COLETA E PROCESSAMENTO..... 18
3.3. EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS DE *C. papillosus* E *C. flagelliferus*..... 19
3.4. PRECIPITAÇÃO COM KCl..... 19
3.5. CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL..... 20
3.5.1. MÉTODOS ANALÍTICOS GERAIS..... 20
3.6. MÉTODOS HIDROLÌTICOS..... 21
3.6.1. HIDRÓLISE ÁCIDA TOTAL..... 21
3.6.2. HIDRÓLISE ÁCIDA TOTAL DO TIPO HIDRÓLISE REDUTIVA..... 21
3.6.3. HIDRÓLISE ÁCIDA TOTAL PARA DETERMINAÇÃO DO TEOR DE ÁCIDO PIRÚVICO..... 22
3.7. ANÁLISE DE METILAÇÃO..... 22
3.8. MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS..... 23
3.8.1. CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA..... 23
3.8.2. CROMATOGRAFIA LÍQUIDO-GASOSA..... 23

3.8.3. CROMATOGRAFIA LÍQUIDO-GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSA (CG-EM)..... 24
3.8.4. CROMATOGRAFIA DE GEL PERMEAÇÃO (HPSEC-MALLS) – ANÁLISE DE HOMOGENEIDADE E MASSA MOLECULAR..... 24
3.8.5. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA-EFICIÊNCIA (CLAE)..... 26
3.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS OBTIDOS..... 27
3.10. MODIFICAÇÃO QUÍMICA DOS POLISSACARÍDEOS..... 27
3.10.1. DESSULFATAÇÃO POR TRATAMENTO SOLVOLÍTICO..... 27
3.10.1.1. PREPARO DO SAL DE PIRIDÔNIO..... 27
3.10.1.2. SOLVÓLISE..... 28
3.10.2. DEGRADAÇÃO CONTROLADA DE SMITH..... 28
3.11. MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS..... 28
3.11.1. RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR..... 28
3.11.1.1. RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE CARBONO-13 (RMN - ^{13}C).. 29
3.11.1.2. RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE PRÓTON (RMN – ^{1}H)..... 29
3.11.1.3. HMQC (HETERONUCLEAR MULTIPLE QUANTUM CORRELATION SPECTROSCOPY)..... 29
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 30
4.1. EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDIOS DAS ALGAS *Chondrophycus papillosus e Chondrophycus flagelliferus*..... 30
4.1.1. EXTRAÇÃO E ANÁLISE QUÍMICA..... 30
4.1.2. COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA..... 34
4.1.3. ANÁLISES DE RMN DE ^{13}C DAS FRAÇÕES BRUTAS P2 E F2..... 37
4.1.4. ANÁLISE DE HOMOGENEIDADE DAS FRAÇÕES P2 e F2..... 41
4.2. PRECIPITAÇÃO FRACIONADA DAS XILOMANANAS DE *Chondrophycus papillosus*, UTILIZANDO KCl 42
4.3. PRECIPITAÇÃO SELETIVA DAS XILOMANANAS DE *Chondrophycus flagelliferus*, UTILIZANDO KCl..... 58
4.4. PURIFICAÇÃO DAS FRAÇÕES SOLÚVEIS EM KCl 2M OBTIDAS DE *C. papillosus* (P2S) E *C, flagelliferus* (F2S)..... 75
4.4.1. ANÁLISE QUÍMICA..... 75
4.4.2. COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS SUBFRAÇÕES OBTIDAS POR CROMATOGRAFIA DE TROCA-IÔNICA DE P2S e F2S..... 76
4.4.3. ANÁLISE DE HOMOGENEIDADE DAS GALACTANAS OBTIDAS DE *C.*

papillosus (P2S-3) e DE *C. flagelliferus* (F2S-3)..... 78

4.4.4. ANÁLISE ESPECTROSCÓPICA DE RMN DE ^{13}C DA GALACTANA P2S-3 OBTIDA DE *C. papillosus*..... 80

4.4.5. DESSULFATAÇÃO SOLVOLÍTICA DA GALACTANA P2S-3 OBTIDA DE *C. papillosus*..... 82

4.4.6. ANÁLISE DE METILAÇÃO DAS GALACTANAS NATIVA (P2S-3) E DESSULFATADA (P2S-3D) OBTIDAS DE *C. papillosus*..... 85

4.4.7. ANÁLISE ESPECTROSCÓPICA DE RMN DE ^{13}C DA GALACTANA OBTIDA DE *C. flagelliferus* F2S-3..... 89

4.4.8. DESSULFATAÇÃO SOLVOLÍTICA DA GALACTANA OBTIDA DE *C. flagelliferus* F2S-3..... 92

4.5. PADRONIZAÇÃO DO MÉTODO DE QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDO PIRÚVICO POR CLAE..... 97

5. CONCLUSÕES..... 106

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.......... 107

ANEXOS..... 126

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - ESTRUTURA REPETITIVA APRESENTADA PELAS AGARANAS..... 6

FIGURA 2 - ESTRUTURA DAS MANANAS, XILOMANANAS E GALACTOXILOMANANAS ISOLADAS DE ALGAS VERMELHAS... 13

FIGURA 3 - ESTRUTURA DO 4,6-O-(1'-CARBOXIETILIDENO)-β-D-GALACTOSE..... 14

ESQUEMA 1 - EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS DAS ALGAS VERMELHAS *C. papillosus* E *C. flagelliferus*..... 32

FIGURA 4 - ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DA FRAÇÃO P2 DE *C. papilosus*..... 38

FIGURA 5 - ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DA FRAÇÃO F2 DE *C. flagelliferus*..... 39

FIGURA 6 - CROMATOGRAMA DE HPSEC DAS FRAÇÕES P2 E F2..... 41

FIGURA 7 - CROMATOGRAMA DE HPSEC DA XILOMANANA P2d..... 46

FIGURA 8 - ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DAS XILOMANANAS P2d, P2d-D E DETALHE DO ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C – DEPT DE P2d-D..... 51

FIGURA 9 - ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DAS XILOMANANAS P2e E P2e-D..... 52

FIGURA 10 - ESPECTRO DE RMN DE ^{1}H DA XILOMANANA P2d ISOLADA DE *C. papillosus*..... 56

FIGURA 11 - ESPECTRO DE CORRELAÇÃO HMQC ($^{13}C/^{1}H$) DA XILOMANANA P2d..... 57

FIGURA 12 - CROMATOGRAMA DE HPSEC DAS XILOMANANAS F2a E F2b..... 63

FIGURA 13 - ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DA XILOMANANA NATIVA (F2a), DESSULFATADA (F2a-D) E APÓS DEGRADAÇÃO DE SMITH (F2a-sm) DE *C. flagelliferus*..... 68

FIGURA 14 - ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DAS XILOMANANAS F2b E F2b-D OBTIDAS DE *C. flagelliferus*..... 69

FIGURA 15 - ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DE FH, FH-S E FH-p DE *C. flagelliferus*..... 73

FIGURA 16 - ANÁLISE DE HOMOGENEIDADE DAS GALACTANAS OBTIDAS DE *C. papillosus* (P2S-3) E DE *C. flagelliferus* (F2S-3)..... 79

FIGURA 17 - ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DA GALACTANA P2S-3 OBTIDA DE *C. papillosus*..... 81

FIGURA 18 - ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DA GALACTANA DESSULFATADA (P2S-3D) OBTIDA DE *C. papillosus*..... 85

FIGURA 19 - ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DA FRAÇÃO F2S3..... 91

FIGURA 20 - ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DA GALACTANA DESSULFATADA (F2S-3D) OBTIDA DE *C. flagelliferus*..... 94

FIGURA 21 - AVALIAÇÃO POR CLAE DA SELETIVIDADE DO MÉTODO PARA QUANTIFICAÇÃO DO ÁCIDO PIRÚVICO UTILIZANDO A COLUNA REZEX-ROA..... 99

FIGURA 22 - CURVA DE CALIBRAÇÃO EM CLAE PARA O ÁCIDO PIRÚVICO.. 100

FIGURA 23 - INFLUÊNCIA DO TEMPO DE HIDRÓLISE SOBRE O TEOR DE ÁCIDO PIRÚVICO OBSERVADO NAS GALACTANAS P3, P5 e P6 102

FIGURA 24 - TESTE DE REPETITIVIDADE DA METODOLOGIA EMPREGADA NA DETERMINAÇÃO DO TEOR DE ÁCIDO PIRÚVICO OBSERVADO NA GALACTANA P5..... 103

FIGURA 25 - TESTE DE ESTABILIDADE NA DETERMINAÇÃO DO TEOR DE ÁCIDO PIRÚVICO OBSERVADO NA GALACTANA P5..... 104

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - RENDIMENTO E ANÁLISE QUÍMICA DAS FRAÇÕES BRUTAS DE *C. papillosus* (P1 – P6) E *C. flageliferus* (F-1 – F6, FH)..... 33

TABELA 2 - COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES BRUTAS DE *C. papillosus* (P1 – P6) E *C. flageliferus* (F-1 – F6)..... 36

TABELA 3 - RENDIMENTO, ANÁLISE QUÍMICA E ROTAÇÃO ÓPTICA DAS SUBFRAÇÕES NATIVAS (P2a – P2e, P2-S) E DESSULFATADAS (P2d-D E P2e-D) OBTIDAS APÓS TRATAMENTO DE P2 COM KCl..... 43

TABELA 4 - COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS SUBFRAÇÕES NATIVAS (P2a – P2e, P2-S) E DESSULFATADAS (P2d-D E P2e-D) OBTIDAS APÓS TRATAMENTO DE P2 COM KCl..... 45

TABELA 5 - ANÁLISE DE METILAÇÃO DAS XILOMANANAS NATIVAS (P2d, P2e) E DESSULFATADAS (P2d-D, P2e-D)..... 48

TABELA 6 - ASSINALAMENTOS QUÍMICOS DE RMN DE ^{13}C DAS XILOMANANAS NATIVAS (P2d, P2e) E DESSULFATADAS (P2d-D, P2e-D)..... 53

TABELA 7 - RENDIMENTO, ANÁLISE QUÍMICA E ROTAÇÃO ÓPTICA DAS SUBFRAÇÕES NATIVAS (F2a, F2b, F2-S, FH-p, FH-S), DESSULFATADAS (F2a-D, F2b-D) E DO PRODUTO DE DEGRADAÇÃO DE SMITH (F2a-sm) OBTIDAS APÓS TRATAMENTO DE F2 e FH COM KCl..... 60

TABELA 8 - COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS SUBFRAÇÕES OBTIDAS DE *C. flagelliferus*..... 62

TABELA 9 - ANÁLISE DE METILAÇÃO DAS XILOMANANAS NATIVAS (F2a, F2b), DESSULFATADAS (F2a-D, F2b-D) E APÓS DEGRADAÇÃO DE SMITH (F2a-sm, F2a-sm-D)..... 65

TABELA 10 - RENDIMENTO E ANÁLISE QUÍMICA DAS SUBFRAÇÕES OBTIDAS POR CROMATOGRAFIA DE TROCA-IÔNICA DE P2S e F2S..... 76

TABELA 11 - COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS SUBFRAÇÕES OBTIDAS POR CROMATOGRAFIA DE TROCA-IÔNICA DE P2S e F2S..... 78

TABELA 12 - COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES NATIVA (P2S-3) e DESSULFATADA (P2S-3D) DE *C. papillosus*..... 83

TABELA 13 - ANÁLISE DE METILAÇÃO DAS GALACTANAS NATIVA (P2S-3) e DESSULFATADA (P2S-3D) OBTIDAS DE *C. papillosus*..... 86

TABELA 14 - COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES NATIVA (F2S-3) e DESSULFATADA (F2S-3D) DE *C. flagelliferus*..... 93

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

α_D^{25} – rotação óptica específica (a 25 °C)

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

RMN – ^{1}H - Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

CLG – cromatografia líquido-gasosa

CG-EM – cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa

D_2O – água deuterada

HMQC - heteronuclear multiple quantum correlation spectroscopy ($^{1}H/^{13}C$)

CLAE – cromatografia líquida de alta eficiência

HPSEC-MALLS - cromatografia de exclusão estérica de alta pressão (hpsec) acoplada a detector de índice de refração diferencial e espalhamento de luz em multiângulos (malls)

p/v – peso/volume

ppm - partes por milhão

RESUMO

Galactanas sulfatadas são os principais polissacarídeos sulfatados, solúveis em meio aquoso, sintetizados pela grande maioria das algas vermelhas (Rhodophyta). Estes são constituídos por unidades alternantes de β-D-galactopiranose 3-*O*-ligada e α-galactopiranose 4-*O*-ligada (ou 3,6-anidrogalactose). Galactanas do tipo carragenana apresentam as unidades α pertencentes à série estereoquímica D- enquanto nas agaranas estas unidades são da série L-. Estas galactanas podem apresentar substituição por grupos sulfato e/ou metil, acetal de ácido pirúvico e ramificações simples por unidades de xilose. Entretanto, algumas espécies, como as da ordem Nemaliales, sintetizam também xilomananas sulfatadas constituídas por uma cadeia principal formada por unidades de β-D-manopiranose 3-*O*-ligadas. A partir das algas vermelhas *Chondrophycus papillosus* e *Chondrophycus flagelliferus* (Ceramiales) mediante extração aquosa a 80 °C e precipitação fracionada com KCl (até 2 M) foram obtidos dois grupos de polissacarídeos: um insolúvel e outro solúvel em KCl 2 M. Quatro polissacarídeos insolúveis apresentaram um perfil homogêneo quando analisados por HPSEC-MALLS (Mw 33-222 kDa). Estes são constituídos por manose, xilose e grupos *O*-sulfato. Estes polissacarídeos foram submetidos à análises de metilação e RMN (1D e 2D) em suas formas nativas e modificadas (dessulfatação solvolítica, degradação controlada de Smith). Os resultados conjuntos destas análises demonstraram que as xilomananas isoladas de *C. papillosus* e *C. flagelliferus* são constituídas por uma cadeia principal formada por unidades de β-D-manopiranose 4-*O*-ligadas, sulfatadas em C-2 e parcialmente substituídas em C-6 por unidades simples de xilose e manose 2-sulfato. Após purificação por cromatografia de troca iônica (DEAE-Sephacel)), foi obtido a partir de cada extrato solúvel em KCl 2 M uma agarana sulfatada homogênea (Mw de 48 e 204 kDa). Análises químicas e espectroscópicas das correspondentes agaranas nativas e dessulfatadas demonstraram que estas são constituídas por β-D-galactopiranose 2-sulfato, parcialmente substituídas por acetal de ácido pirúvico [4,6-*O*-(1´-carboxietilideno)] as quais estão ligadas a 3,6-anidro-α-L-galactopiranose e a α-L-galactopiranose. Deste modo, *C. papillosus* e *C. flagelliferus* sintetizam, além de agaranas sulfatadas, xilomananas sulfatadas. Ressalta-se que este é o primeiro relato da presença de xilomananas sulfatadas em algas pertencentes à ordem Ceramiales e que estas representam um novo tipo estrutural de polissacarídeo sulfatado isolado de macroalgas marinhas.

ABSTRACT

Sulfated galactans are the principal water soluble sulfated polysaccharides synthesized by the great majority of red seaweeds (Rhodophyta). They are constituted by alternating 3-linked β-D-galactopyranosyl and 4-linked α-galactopyranosyl (or 3,6-anhydrogalactopyranosyl) units. The configuration of the 4-linked units, D- or L-, defines the group of carrageenans and agarans, respectively. These galactans can present substitution by sulfate and/or methyl groups, acetal of pyruvic acid and single stubs of xylose. Nevertheless, other types of water soluble polysaccharides are synthesized by red algae. Sulfated xylomannans constituted by a β-D-mannopyranosyl 3-linked backbone were described for species of Nemaliales order. From the red seaweeds *Chondrophycus papillosus* and *Chondrophycus flagelliferus* (Ceramiales, Rhodophyta) by extraction with water at 80 ^{o}C followed by KCl fractionation (up to 2 M) were obtained two kinds of polysaccharides: one insoluble and the other soluble in 2 M KCl. HPSEC-MALLS analyses of four KCl-insoluble fractions gave a homogeneous profile with Mw of 33-222 kDa. They were constituted by mannose, xylose and sulfate groups. Structural determination of the native, desulfated and Smith-degraded KCl-insoluble polysaccharides carried out by composition and methylation analysis and NMR spectroscopy (1D and 2D experiments) showed that the xylomannans isolated from *C. papillosus* e *C. flagelliferus* are constituted by a 4-linked β-D-mannan main chain, sulfated at C-2 and partially substituted in C-6 by single stubs of xylose and mannose 2-sulfate. Purification of the 2 M KCl-soluble fractions on DEAE-Sephacel gave rise to homogeneous sulfated agarans (Mw 48 and 204 kDa). Chemical and spectroscopic analyses of the native and desulfated agarans indicated that they are structurally composed by β-D-galactopyranose 2-sulfate partially pyruvylated [4,6-*O*-(1´-carboxyethylidene)] linked to 3,6-anhydro-α-L-galactopyranose and α-L-galactopyranose residues. Therefore, beside this type of galactan the two *Chondrophycus* species analyzed in the present study synthesize sulfated xylomannans with an unusual structure. As far as we know this is the first report of the presence of a xylomannan sulfate in red seaweed species of order Ceramiales. Noteworthy, this polymer represents a novel marine macroalgae polysaccharide.

1. INTRODUÇÃO

1.1. ALGAS VERMELHAS

As algas compreendem um grupo muito diverso de organismos fotossintetizadores e não vasculares. Este grupo apresenta uma variação morfológica extremamente diversa, englobando tanto organismos procarióticos e eucarióticos quanto unicelulares e pluricelulares (VAN DEN HOEK et al., 1989).

Entre as macro algas, as algas vermelhas (Rhodophyta) são as principais macrófitas marinhas, representando o grupo com maior diversidade de espécies (USOV; KLOCHOVA, 1992) e correspondendo a 27% de todas as espécies de plantas marinhas descritas (PAINTER, 1983). De fato, há mais rodofitas do que todos os outros maiores grupos de algas marinhas combinados, (COLE; SHEATH, 1990) sendo amplamente distribuídas ao longo de todo o litoral brasileiro, ocorrendo de forma mais abundante e diversificada na costa nordeste do país, nos costões e fundos rochosos, bem como nas áreas recifais (SAITO e OLIVEIRA, 1990).

As rodofitas são filogeneticamente a divisão de macrófitas marinhas mais antigas incluindo aproximadamente 5.500 espécies (RAVEN et al., 2001).

Alguns dos polissacarídeos encontrados na parede das algas vermelhas são muito diferentes dos de outras plantas, originando dois componentes principais, um denominado fibrilar, o qual forma o esqueleto da parede celular e outro denominado amorfo, o qual forma uma matriz na qual o fibrilar se encontra embebido (KLOAREG; QUATRANO, 1988).

Segundo KLOAREG e QUATRANO (1988), os polissacarídeos da matriz das algas marinhas estão relacionados com a regulação osmótica ou iônica, adaptando-as ao ambiente marinho. Ainda, com função de osmorregulação, as algas biossintetizam polióis como sorbitol, dulcitol e manitol (KARSTEN et al. 1999, 2003), além de carboidratos de baixo peso molecular como os heterosídeos digeneasídeo, floridosídeo e digalactosídeo glicerol (KARSTEN et al., 1993, 2005). As algas vermelhas sintetizam polissacarídeos que diferem em sua composição e estrutura em relação a outras plantas, por apresentarem

majoritariamente galactanas sulfatadas (agaranas e carragenanas – USOV, 1998) como principais constituintes (PAINTER, 1983).

As galactanas sulfatadas encontradas na matriz extracelular das algas vermelhas apresentam capacidade de formar soluções viscosas ou géis fortes, que permanecem estáveis na presença de muitos aditivos (KLOAREG e QUATRANO, 1988).

Estas características fazem com que as algas vermelhas sejam, do ponto de vista econômico, as mais exploradas, desempenhando importante papel econômico devido à sua utilização em uma ampla variedade de produtos pela indústria alimentícia e farmacêutica, bem como para fins biotecnológicos (LOBBAN; HARRISON, 1994). Desta forma, despertam interesses mundiais devido ao seu valor econômico e as suas propriedades geleificantes e viscosantes (DE RUITER e RUDOLPH, 1997).

Além da importância industrial, as galactanas têm despertado interesses na área biomédica, pois são promissoras como compostos biologicamente ativos desempenhando atividade antiviral (DUARTE et al., 2001, 2004; TALARICO et al., 2005;) anticoagulante (CARLUCCI et al., 1997; FARIAS et al., 2000), antitrombótica (SEN et al., 2002), antiangiogênica (SATORU et al., 2003) e antitumoral (FERNANDEZ et al., 1989).

Além disto, além de galactanas outros tipos de polissacarídeos como mananas, xilomananas e galactoxilomananas, também sulfatadas, têm sido observados em representantes das ordens Nemaliales (COLE; SHEATH, 1990; USOV, 1984; KOLENDER et al., 1997), bem como frações solúveis de xilanas lineares neutras em representantes da ordem Palmariales (COLE; SHEATH, 1990; USOV, 1984, LAHAYE, et al., 2003). É possível encontrar um ou mais destes polissacarídeos sendo sintetizados por uma mesma espécie de alga vermelha. Por exemplo, frações de xilanas solúveis, mananas sulfatadas, xilomananas e xilogalactanas sulfatadas já foram obtidas a partir de *Nothogenia fastigiata*, pertencente à ordem Nemaliales e anteriormente denominada de *Chaetangium fastigiatum* (MATULEWICZ; CEREZO, 1987a,b; MATULEWICZ et al., 1994; HAINES et al., 1990).

Desta forma, a determinação estrutural das galactanas sulfatadas assim como das xilanas, mananas e xilomananas sulfatadas contribui para a

prospecção de novas aplicações industriais e biológicas, além de ser útil como ferramenta para posicionamento taxonômico das algas vermelhas.

1.2. GALACTANAS SULFATADAS

As galactanas sulfatadas de algas marinhas são estruturalmente, polímeros de cadeias lineares apresentando como característica única, uma estrutura linear formada por unidades de β-D-galactopiranose substituídas glicosidicamente no carbono 3 (unidade A) e de α-galactopiranose substituídas glicosidicamente através da posição 4 (unidade B) (PERCIVAL e McDOWELL, 1967), mostrando um arranjo dissacarídico alternante repetitivo entre as unidades A e B $(AB)_n$:

$[\rightarrow 3)$-β-D-galactopiranose-$(1\rightarrow 4)$-α-galactopiranose-$(1\rightarrow]_n$

unidade A **unidade B**

Enquanto a unidade A sempre se apresenta na configuração enantiomérica D-, a unidade B pode se apresentar nas configurações D- ou L-.

Baseando-se na estereoquímica da unidade B, estas galactanas podem ser classificadas como carragenana, quando esta unidade pertencer à série D-, ou agarana, quando pertencer à série L- (McCANDLESS; CRAIGIE, 1979; PAINTER, 1983; USOV, 1984, 1998; STORTZ; CEREZO, 1997).

Estudos estruturais detalhados têm demonstrado que uma importante característica de vários polissacarídeos de algas vermelhas é a presença simultânea de unidades dissacarídicas de carragenanas e agaranas. Esse tipo estrutural foi denominado de carrágar por CHOPIN et al (1999) e, posteriormente, STORZ e CEREZO (2000) adotaram o termo galactana DL-híbrida. Foi definido então um terceiro grupo de polissacarídeos onde as unidades de α-galactose ou 3,6-anidro-α-galactose podem apresentar tanto a configuração D- quanto L-.

$[\rightarrow 3)$-β-D-galactopiranose-$(1\rightarrow 4)$-α-D/L-galactopiranose-$(1\rightarrow]_n$

unidade A **unidade B**

ZIBETTI et al. (2005) mostraram que a alga *Cryptonemia crenulata* biosintetiza uma família de galactanas híbridas baseadas na seqüência clássica repetitiva formada pelas unidades A e B. As frações isoladas apresentaram uma dispersão estrutural em relação à posição e teor de grupos sulfato e acetal de ácido pirúvico e presença de grupos metil e de cadeias laterais formadas por β-D-xilose e/ou β-D-galactopiranose. Além disto, observaram também, diferenças na razão entre galactose e 3,6-anidrogalactose nas unidades B, assim como na razão entre as unidades de D/L-galactose e 3,6-anidrogalactose (ZIBETTI, et al., 2005).

De acordo com a proporção de unidades B com a configuração L-, estas galactanas podem ser divididas em D/L-híbridas com um predomínio da estrutura de carragenana ou D/L-híbridas com um predomínio da estrutura de agarana (STORTZ; CEREZO, 2000).

Embora a estrutura básica seja repetitiva, as galactanas apresentam grande diversidade estrutural, devido aos diferentes tipos de substituintes na cadeia principal (ERREA; MATULEWICZ, 2003), como:

- Presença de grupos éter metílico em C-6; grupos sulfato em C-2, C-4 ou C-6 e ainda substituição por acetal de ácido pirúvico, todos na unidade A.
- Presença de grupos éter metílico ou grupos sulfato em C-2, C-3 ou C-4, todos na unidade B.
- Ciclização interna total da unidade B, gerando um anidro-açúcar na forma de 3,6-anidrogalactose, que pode ainda apresentar grupos éter metílico ou grupos sulfato em C-2 (PAINTER, 1983).

A presença da unidade B total ou parcialmente ciclizada na forma de 3,6-anidrogalactose constitui uma característica estrutural particular dos polissacarídeos sintetizados pelas algas vermelhas. As galactanas sulfatadas que apresentam este anidro-açúcar na sua estrutura, podem apresentar propriedades geleificantes ou viscosantes (RENN, 1997) e são denominadas de ficocolóides ou hidrocolóides, pela elevada capacidade que apresentam de formar géis em meios aquosos (GLICKSMAN, 1987).

Esta variabilidade estrutural das galactanas é normalmente explicada em decorrência de modificações incompletas ou irregulares que ocorrem a partir do esqueleto das unidades de galactose pré-formado.

Considera-se como o mais abundante grupo substituinte encontrado nas carragenanas o éster sulfato. Grupos metil éter e acetal ácido pirúvico também podem ser encontrados, porém em baixos níveis (CHIOVITTI et al., 1996; STORTZ; CEREZO, 2000; ERREA; MATULEWICZ, 2003). As agaranas, em contrapartida, podem apresentar elevados níveis de substituição por sulfato, metil, acetal de ácido pirúvico e glicosilação (PAINTER, 1983; ERREA; MATULEWICZ, 2003).

Relatos mais recentes mostram que este padrão de substituição, contudo, pode sofrer variações uma vez que carragenanas ricas em grupos acetal de ácido pirúvico (CHIOVITTI et al., 1997; FALSHAW et al., 2003) e em metil éter (CHIOVITTI et al., 2004) já foram isoladas e descritas na literatura.

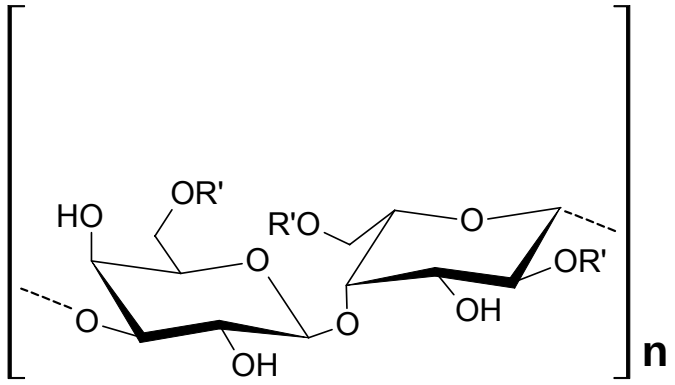
Novas técnicas de análise empregadas na pesquisa da química de carboidratos (STORTZ; CEREZO, 2000; CHIOVITTI, et al., 2004) justificam a descoberta destes novos padrões de substituição em carragenanas. A estes mesmos fatores também se deve a identificação do terceiro grupo de galactanas sulfatadas, os D/L-híbridos ou carrágar (STORTZ; CEREZO, 2000; CHOPIN et al., 1999).

As galactanas sulfatadas, portanto, apresentam ampla diversidade estrutural dependendo da espécie e de diferentes propriedades físico-químicas e biológicas.

1.2.1. GALACTANAS DO TIPO AGARANA

As agaranas apresentam uma estrutura básica repetitiva, constituída por unidades alternantes de β-D-galactopiranose (unidade A) e α-L-galactopiranose (unidade B), como mostrado na FIGURA 1, diferindo, portanto, das carragenanas na estereoquímica da unidade B. Assim como nas carragenanas esta unidade pode estar na forma do seu derivado 3,6-anidrogalactose (PAINTER, 1983).

FIGURA 1. ESTRUTURA REPETITIVA APRESENTADA PELAS AGARANAS.



R’ = H, CH_3 ou SO^-_3

Nos primeiros estudos de fracionamento de agaranas (ARAKI; HIRASE, 1957 e ARAKI, 1966), considerou-se que esta classe era composta por dois componentes distintos. Agarose, formada por uma estrutura ideal repetitiva de [→3)-β-D-galactose (1→4)-α-L-3,6-anidrogalactose(1→] e agaropectina, composta por uma estrutura mais complexa contendo grupos substituintes como sulfato e piruvato.

A agarose é a galactana com maior propriedade geleificante dentro do grupo das agaranas (USOV, IVANOVA e SHASHKOV, 1983). A substituição das unidades anidrogalactosídicas por unidades de α-L-galactopiranose-6-sulfato reduz consideravelmente a propriedade de geleificação desses polímeros, enquanto que a introdução de grupos metil nessa mesma posição (C-6) tem pouca influência sobre tal propriedade (USOV, IVANOVA e SHASHKOV, 1983).

Embora algumas agaranas com estrutura clássica repetitiva, como no caso da agarose, sejam naturalmente obtidas esta classificação, no entanto, não reflete a complexidade estrutural encontrada pelas galactanas relatadas na literatura. A maioria das espécies biossintetiza agaranas com uma grande dispersão estrutural tornando esta classificação desatualizada.

A substituição das agaranas por grupos sulfato, metil e pirúvico difere muito do observado em carragenanas. A presença de unidades A piruvatadas

(4,6-*O*-(1-carboxietilideno)-D-galactopiranose) e com grupos metil (6-*O*-metil-D-galactopiranose) é freqüente, bem como cadeias laterais de 4-*O*-metil-L-galactopiranose e unidades B metiladas em C-2 (STORTZ e CEREZO, 2000) torna a classificação das agaranas não tão específica quanto à das carragenanas.

Assim, uma classificação baseada em terminologias dependentes do padrão de substituição apresentado pelo polissacarídeo e da força do gel formado por este seja mais conveniente. Sendo assim, teríamos agarose, ágares e agaróides (MILLER, 1997).

As agaranas são principalmente biossintetizadas pelas algas vermelhas pertencentes às ordens Gelidiales e Gracilariales, sendo que agaranas com diversas modificações estruturais podem ainda ser sintetizadas por algas das ordens Bangiales, Ceramiales, Corallinales e Nemaliales (MILLER 1997; CHOPIN et al., 1999; STORZ e CEREZO, 2000 e LEE, 1989).

As agaranas biossintetizadas por algas pertencentes aos gêneros *Porphyra* e *Bangia* são genericamente denominadas de porfiranas (ANDERSON; REES, 1965; ASPINALL, 1970). Estas apresentam grupos O-metil em C-6 das unidades A, e parte das unidades B se encontram sufatadas em C-6 (NOSEDA et al., 2000).

Uma porfirana dotada de uma estrutura não usual foi isolada de *Eucheuma denticulatum* onde algumas unidades de β-D-galactose apresentaram glicosilação por unidades de 6-*O*-metil β-D-galactose 4-sulfato, localizadas como terminais não redutores (VIANA et al., 2004).

Destacam-se ainda, dentro do grupo das agaranas, as xilogalactanas. Este grupo de polissacarídeos já foi relatado para algumas espécies de algas vermelhas, principalmente pertencentes às ordens Corallinales, Ceramiales e Nemaliales (FURNEAUX; STEVENSON, 1990; MATULEWICZ et al., 1994; USOV et al., 1997).

As xilogalactanas se caracterizaram por apresentarem uma estrutura central baseada nas agaranas, porém com um complexo padrão de substituição (FURNEAUX; STEVENSON, 1990; MATULEWICZ et al., 1994; USOV et al., 1997). Nestes polímeros, as unidades de D-galactose podem estar total ou parcialmente metiladas em C-6, sulfatados em C-2, C-4 e/ou C-6 e

glicosiladas em C-4 ou C-6 por unidades de β-D-xilose, α-L-galactose ou 4-*O*-metil-α-L-galactose, enquanto que as unidades de L-galactose, por sua vez, podem estar presentes como 3,6-anidrogalactose ou como α-galactose 6-sulfato, o qual pode estar parcialmente metilado em carbono 2 e/ou substituídas em carbono 3 (FURNEAUX; STEVENSON, 1990; MATULEWICZ et al., 1994; USOV et al., 1997).

A alga *Georgiella confluens*, coletada na Antártica, foi descrita como produtora de xilogalactanas sulfatadas naturalmente ricas em unidades metiladas, sendo descritos duas unidades incomuns caracterizados como α-L-galactopiranose-3-sulfato e β-D-galactopiranose substituída no C-4 por xilose (KOLENDER e MATULEWICZ, 2002).

Vemos então, importância no estudo das agaranas, devido ao seu uso amplamente difundido nas indústrias farmacêutica e alimentícia assim como para análise e monitoramento microbiológico (FALSHAW et al., 1998).

1.2.2. GALACTANAS DA ORDEM CERAMIALES

As agaranas sintetizadas pelas espécies pertencentes à ordem Ceramiales têm grande complexidade estrutural. Várias espécies desta ordem vêm sendo descritas como produtoras de galactanas sulfatadas do grupo das agaranas (BATEY e TURVEY, 1975; USOV, IVANOVA e SHASHKOV, 1983; USOV e IVANOVA, 1987; USOV e KLOCHKOVA, 1992; MILLER e FURNEAUX, 1997; NOSEDA, TULIO e DUARTE, 1999; MILLER e BLUNT, 2002; DUARTE et al., 2002).

Estes polissacarídeos são normalmente substituídos por diferentes grupos, podendo encontrar-se metilados, sulfatados ou glicosilados em diferentes posições das unidades A e B. Podem ocorrer ainda substituições dos C-4 e C-6 das unidades A por acetal de ácido pirúvico e a presença do anel de 3,6-anidrogalactose nas unidades B (BATEY e TURVEY, 1975; USOV, IVANOVA e SHASHKOV, 1983; USOV e IVANOVA, 1987; USOV e KLOCHKOVA, 1992; MILLER e FURNEAUX, 1997; NOSEDA, TULIO e DUARTE, 1999; MILLER e BLUNT, 2002; DUARTE et al., 2002).

Como exemplo, o estudo realizado com a espécie *Laurencia pinnatifida* cujo polissacarídeo apresenta um padrão de substituição complexo onde suas unidades A são na maioria sulfatadas em C-2 e as unidades B são encontradas na forma de α-L-galactose metiladas em C-2 ou sulfatadas em C-6, e na forma de 3,6-anidrogalactose que podem estar metiladas em C-2 (BOWKER; TURVEY, 1968b).

BATEY e TURVEY (1975), ao rever a estrutura dos polissacarídeos extraídos da alga *Polysiphonia lanosa*, propuseram que o polímero era pertencente ao grupo das agaranas, sendo que as unidades A poderiam estar substituídas por 6-*O*-metil-β-D-galactopiranose, β-D-galactopiranose-6-sulfato e uma unidade anteriormente não relatada, descrita como 6-*O*-metil-β-D-galactopiranose-4-sulfato. As unidades B estariam substituídas por α-L-galactopiranose-6-sulfato, 2-*O*-metil-α-L-galactopiranose-6-sulfato e 3,6-anidro-α-L-galactopiranose (BATEY e TURVEY, 1975).

Da alga vermelha *Bostrychia montagnei* foi isolada uma agarana sulfatada e metilada de grande complexidade estrutural. Análises químicas e espectroscópicas demonstraram a presença de grande número de substituintes em diferentes posições, tanto nas unidades A quanto B (DUARTE et al., 2002).

Na espécie *Acanthophora spicifera*, também foi identificada uma agarana sulfatada e piruvatada apresentando unidades A substituídas por grupos sulfato em C-2 (28-30%), sulfato em C-2 e acetal de ácido pirúvico (9-15%) ou somente por acetal de ácido pirúvico (5-8%). Adicionalmente, unidades A apresentam baixas porcentagens de grupo sulfato ou metil, ou não substituídas neste carbono. As unidades B são formadas principalmente por 3,6-anidro-α-L-galactose (15-16%) e α-L-galactose 6-sulfato (10-17%) junto com menores proporções de 3,6-anidro-α-L-galactose 2-sulfato, α-L-galactose 2,6-dissulfato, α-L-galactose 2,3,6-trissulfato, α-L-galactose 2,6-dissulfato com xilose em C-3, 2-O-metil-α-L-galactose e α-L-galactose não substituída (DUARTE et al., 2004).

A ordem Ceramiales é um grupo bem sucedido dentre as algas vermelhas por apresentarem uma vasta distribuição mundial e corresponderem a quase metade dos gêneros descritos para as algas vermelhas (KRAFT,

1981). Essa ordem é composta por quatro famílias, sendo elas, Ceramiaceae, Delesseriaceae, Dasyaceae, Rhodomelaceae (KRAFT, 1981).

As algas pertencentes à família Rhodomelaceae apresentam distribuição mundial (HORTA e OLIVEIRA, 2004). Essas macroalgas são comuns ao longo de toda a costa brasileira, sendo, entretanto, mais abundantes e diversificadas em áreas com substrato rochoso e águas mais transparentes, como é o caso da costa Nordeste do país (HORTA e OLIVEIRA, 2007). É nesta porção do litoral brasileiro que são abundantemente encontradas as algas *C. papillosus* e *C. flagelliferus*, anteriormente denominadas *Laurencia papillosa* e *L. flagellifera,* respectivamente.

Dentre as famílias que compõem a ordem Ceramiales, a Rhodomelaceae é a mais estudada quanto à estrutura de seus polissacarídeos (STORTZ e CEREZO, 2000). O complexo *Laurencia*, pertencente à ordem Ceramiales, foi separado em três gêneros distintos: *Laurencia*, *Chondrophycus* e *Osmundea* baseado em estruturas vegetativas e reprodutivas (GARBARY e HARPER, 1998; NAM, 1999). Estes gêneros compartilham as mesmas características de morfologia típica e superficial (NAM, 1999).

USOV et al. (1989) estudando as galactanas de quatro espécies de *Laurencia* (*L. coronopus*, *L. nipponica*, *L. obtusa* e *L. papillosa*), demonstrou que as unidades A destas galactanas podem estar metiladas, sulfatadas ou não substituídas em C-6. As unidades B são constituídas por 3,6-anidrogalactose ou α-L-galactose (metiladas ou não em C-6).

Analisando dados da literatura referentes a algumas espécies do gênero *Laurencia*, observou-se que as galactanas de *L. coronopus* (USOV e ELASHVILI, 1997), *L. gemmifera* (VALIENTE *et al.*, 1993), *L. nipponica* (USOV e ELASHVILI, 1991), *L. pinnatifida* (BOWKER e TURVEY, 1968a,b), *L. thyrsifera* (MILLER, FALSHAW e FURNEAUX, 1993) apresentam as unidades de β-D-galactose principalmente não substituídas ou metiladas em C-6, unidades anidrogalactosídicas, xilose como terminais não redutores e grupos sulfato em diferentes posições nas unidades A e B, como constituintes comuns a todas as espécies, os quais são observados em diferentes proporções. Embora em *L. thyrsifera* os níveis de 6-*O*-metil-galactose observados não sejam significantes (MILLER, FALSHAW e FURNEAUX, 1993), em outras

espécies grupos *O*-metil substituem diferentes posições nas galactanas, como o C-2 das unidades de 3,6-anidro-α-L-galactopiranose (*L. gemmifera*, *L. nipponica* e *L. pinnatifida*) e C-3 das unidades de α-L-galactopiranose (*L. coronopus* e *L. nipponica*) (BOWKER e TURVEY, 1968a,b; USOV e ELASHVILI, 1991; VALIENTE et al., 1993; USOV e ELASHVILI, 1997).

MILLER et al. (1993) mostraram que o polissacarídeo de *Laurencia thyrsifera* também apresenta unidades A sulfatadas em C-2 e em C-6, não sulfatadas, ou substituídas por acetal de ácido pirúvico.

As algas *Griffithsia antarctica* e *Ceramium uncinatum*, ambas pertencentes à ordem Ceramiales, apresentaram galactanas com estruturas típicas de agaranas com elevado nível de precursores. Os polissacarídeos obtidos de *G. antarctica* apresentaram-se quase completamente sulfatados em C-4 com aproximadamente metade de suas unidades B compostas por 3,6-anidro-α-L-galactose ou seu precursor, α-L-galactose 6-sulfato. Já os polissacarídeos de *C. uncinatum* mostraram substituição por grupos sulfatados em C-6 das unidades A além de aproximadamente metade de suas unidades B substituídas por xilose (MILLER, 2003b).

Unidades laterais de xilose glicosilando a galactana são descritas para todas as espécies de *Laurencia* anteriormente citadas (BOWKER e TURVEY, 1968a,b; USOV e ELASHVILI, 1991; MILLER, FALSHAW e FURNEAUX, 1993; VALIENTE et al., 1993; USOV e ELASHVILI, 1997). Sugere-se que esse monossacarídeo esteja xiloglicosilando o C-3 das unidades B em *L. coronopus* e *L. nipponica* e C-6 das unidades A em *L. thyrsifera*. Através de hidrólise redutiva parcial, USOV e ELASHVILI (1991) isolaram um pentassacarídeo sulfatado na posição 6 das unidades B que se apresentava resistente ao tratamento alcalino. Com esse dado e análise por RMN de ^{13}C, esses autores descreveram que os C-3 das unidades de α-L-galactopiranose-6-sulfato estavam substituídas por β-D-xilopiranose (USOV e ELASHVILI, 1991).

Grupos sulfato substituindo as galactanas biossintetizadas por algas do gênero *Laurencia* são observados em todas as espécies em discussão. Unidades de β-D-galactopiranose-6-sulfato são identificadas em baixas quantidades em *L. coronopus* (USOV e ELASHVILI, 1997) e *L. thyrsifera* (MILLER, FALSHAW e FURNEAUX, 1993); β-D-galactopiranose-2-sulfato é

descrita em *L. nipponica* (USOV e ELASHVILI, 1991), *L. pinnatifida* (BOWKER e TURVEY, 1968a,b) e *L. thyrsifera* (MILLER, FALSHAW e FURNEAUX, 1993), enquanto α-L-galactopiranose-6-sulfato está presente em *L. coronopus* (USOV e ELASHVILI, 1997), *L. nipponica* (USOV e ELASHVILI, 1991) e *L. pinnatifida* (BOWKER e TURVEY, 1968a,b). Ressalta-se que somente *L. gemmifera* (VALIENTE et al., 1993) e *L. thyrsifera* (MILLER, FALSHAW e FURNEAUX, 1993) biossintetizam agaranas sulfatadas e piruvatadas.

1.2.3. MANANAS E XILOMANANAS

As mananas solúveis (FIGURA 2) isoladas de algas vermelhas caracterizam-se por apresentar uma estrutura formada por unidades de α-D-manopiranose 3-*O*-substituida, sulfatadas em carbono 2 e/ou 6 (KOLENDER et al., 1995; 1997).

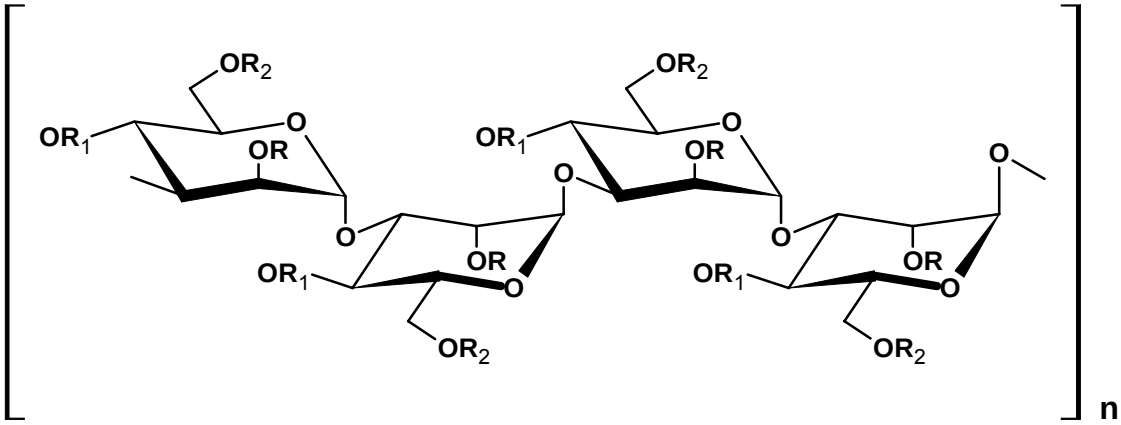
As xilomananas caracterizam-se por apresentarem substituição por grupos sulfato em C-2, C-4 e/ou C-6 e glicosilação em C-2 por unidades de β-D-xilose (MATULEWICZ; CEREZO, 1987b).

Mananas e xilomananas sulfatadas têm sido obtidas a partir de gêneros como *Nothogenia* (MATULEWICZ; CEREZO, 1987b, KOLENDER et al., 1995; 1997) e *Nemalion* (USOV et al., 1973).

As mananas sulfatadas isoladas de algas do gênero *Nothogenia* apresentaram atividade antiviral, inibindo a replicação *in vitro* de diferentes estirpes do vírus *Herpes simplex*, sendo esta atividade em alguns casos comparável a heparina. Esta propriedade esta relacionada com a conformação do esqueleto de manose, com o grau de sulfatação e com a massa molecular (KOLENDER et al., 1995, 1997).

Um novo tipo de polissacarídeo foi descrito no gênero *Galaxaura* (USOV et al., 1981), uma xilogalactomanana sulfatada, este polímero apresentava uma cadeia principal formada por unidades de β-D-manopiranose (1→3), sulfatadas em C-4 (1 para cada 3 unidades) ou glicosiladas no mesmo carbono por unidades de D-xilopiranose (3 para cada 5 unidades) ou L-galactopiranose, em menor quantidade (FIGURA 2).

FIGURA 2 - ESTRUTURA DAS MANANAS, XILOMANANAS E GALACTOXILOMANANAS ISOLADAS DE ALGAS VERMELHAS.



manana: R= H, SO_3^-; R_1= H; R_2= H, SO_3^-.
xilomanana: R= H, SO_3^-, xilose; R_1= H, SO_3^-; R_2= H, SO_3^-).
galactoxilomanana: R= H; R_1= H, SO_3^-, xilose, galactose; R_2= H.

1.2.4. ÁCIDO PIRÚVICO

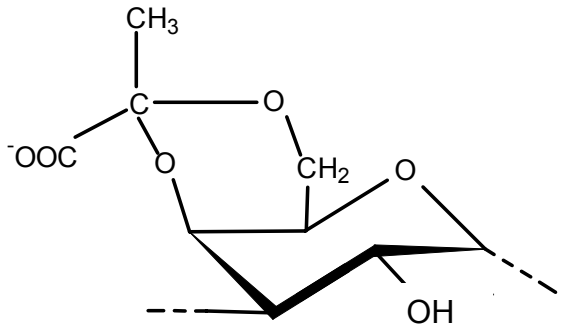
Como já mencionado, as unidades piruvatadas, 4,6-*O*-(1'-carboxietilideno)-β-D-galactopiranose (Figura 3) são freqüentemente encontradas em galactanas do tipo agarana, porém, se mostram presentes também em algumas carragenanas (CHIOVITTI et al., 1997 e 1998).

A presença de acetal de ácido pirúvico foi relatada pela primeira vez em galactanas do tipo agarana obtidas de *Gelidium cartilagineum* por HIRASE (1957). Em 1972, HIRASE e WATANABE demonstraram também a presença de acetal de ácido pirúvico em galactanas do tipo carragenana sendo que em carragenanas obtidas de *Petrocelis middendorfii* praticamente todas as suas unidades dissacarídicas repetitivas mostraram-se substituídas por ácído pirúvico (DiNINNO et al., 1979).

A conformação destas moléculas foi mais bem estudada empregando dados de ^{13}C RMN a fim de determinar sua estrutura em polissacarídeos (GORIN e ISHIKAWA, 1967 e GORIN et al., 1982).

Vários métodos analíticos foram sugeridos para determinação do teor de ácido pirúvico presente em diferentes biomoléculas. Um dos primeiros, foi o proposto por FRIEDEMANN e HAUGEN (1943) utilizado para determinação colorimétrica de ceto-ácidos em amostras de urina e sangue utilizando 2,4-dinitrofenilidrazina, sendo este modificado por KOEPSELL e SHARP (1952) para melhor determinação do ácido pirúvico em líquors de fermentação.

FIGURA 3: ESTRUTURA DO 4,6-O-(1'-CARBOXIETILIDENO)-β-D-GALACTOSE



Um dos métodos posteriormente descritos para determinação do ácido pirúvico em ágar mostrou-se demasiadamente complicado, além de requer uma grande quantidade de polissacarídeo. Assim sendo, não se revelou aplicável para a análise rotineira de polissacarídeos e oligossacarídeos (HIRASE, 1957).

O método usual para determinação do conteúdo de ácido pirúvico em polissacarídeos é o proposto por SLONEKER e ORENTAS (1962) empregando 2,4-dinitrofenilidrazina após a liberação do ácido pirúvico através de hidrólise com ácido clorídrico diluído. Entretanto, DUCKWORTH e YAPHE (1970) demonstraram que um fator de correção deveria ser aplicado quando esta metodologia fosse empregada na determinação do teor de ácido pirúvico em agaranas. Os resultados obtidos pelos autores revelaram que, em amostras contendo 3,6-anidrogalactose, este monossacarídeo sofria degradação a ceto-

ácidos, dando resultados positivos na reação para ácido pirúvico e, portanto, resultados superestimados.

Tal fator de correção pode ser calculado a partir da seguinte equação:

$$\text{\% de Ácido Pirúvico presente na amostra} = A - \frac{B \times C}{D}$$

Onde:

- A = Porcentagem de ácido pirúvico na amostra ensaiada antes da correção.

- B = Porcentagem de ácido pirúvico em uma amostra de agarose antes da correção.

- C = Porcentagem de 3,6-anidrogalactose na amostra ensaiada.

- D = porcentagem de 3,6-anidrogalactose em uma amostra de agarose comercial (47,3%), determinada experimentalmente (ZIBETTI, 2005).

Nota-se que, para a correta determinação do teor de ácido pirúvico, é necessário previamente um polissacarídeo que contenha uma quantidade conhecida de 3,6-anidrogalactose e ausência de ácido pirúvico, além da quantidade de 3,6-anidrogalactose presente na amostra ensaiada. Segundo os próprios autores, os valores desta obtidos desta forma são apenas aproximados não podendo ser usados na caracterização de oligossacarídeos (DUCKWORTH e YAPHE,1970).

O avanço das técnicas cromatográficas, como a Cromatografia Líquida de Alta-Eficiência (CLAE), permitiu o desenvolvimento de procedimentos analíticos mais simples e livres de interferentes possibilitando, deste modo, uma determinação mais precisa do conteúdo de ácido pirúvico que compõe polissacarídeos de origens variadas.

Como exemplo, temos a utilização de CLAE na quantificação do ácido pirúvico existente em exopolissacarídeos de *Zooglea ramigera* (TROYANO et al., 1996) e de cepas pertencentes ao gênero *Methylobacterium* (VERHOEF et al., 2003) usando uma coluna ácida de troca iônica.

Outros trabalhos reportam a utilização de sistemas cromatográficos semelhantes na determinação de ácido pirúvico em vegetais superiores

pertencentes ao gênero *Allium* (YOO e PIKE, 2001), em sistemas fermentativos (GÜZEL-SEYDIM et al., 2000) e em fluidos biológicos (CHEN et al., 1995).

Desta forma, há a necessidade de determinação do teor de ácido pirúvico encontrado em diferentes polissacarídeos de algas vermelhas para a correta determinação estrutural destas moléculas. Contudo, as técnicas colorimétricas disponíveis não se mostram totalmente seletivas e abrangentes. Portanto, o uso de técnicas cromatográficas mais seletivas, que permitam o seu emprego também em oligossacarídeos, mostra-se como uma importante ferramenta dentro do processo analítico que envolve a determinação estrutural de polissacarídeos vegetais.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Este trabalho tem como objetivo geral determinar a estrutura química dos polissacarídeos solúveis em meio aquoso biossintetizados pelas algas marinhas *Chondophycus papillosus* (C. Agardh) (Garbary e Harper, 1998) e *Chondrophycus flagelliferus* (C. Agardh) (Nam, 1999), pertencentes à família Rhodomelaceae, ordem Ceramiales.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Extrair e purificar dos polissacarídeos solúveis em meio aquoso (a 25 °C e a 80 °C).
2. Determinar a massa molecular média dos principais polissacarídeos homogêneos por cromatografia de gel permeação (HPSEC-MALLS).
3. Determinar a estrutura química fina dos principais polissacarídeos por métodos químicos e espectroscópicos.
4. Padronizar a metodologia usando CLAE na análise quantitativa do teor de ácido pirúvico presente em polissacarídeos obtidos a partir de algas vermelhas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. ESPÉCIES ESTUDADAS E SEUS POSICIONAMENTOS SISTEMÁTICOS

As espécies estudadas neste trabalho foram as algas *Chondrophycus papillosus* e *Chondrophycus flagelliferus*.

Divisão: Rhodophyta
Classe: Rhodophyceae
Subclasse: Florideae
Ordem: Ceramiales
Família: Rhodomelaceae
Gênero: *Chondrophycus*

Espécie: *Chondrophycus papillosus* (C. Agardh); Garbary & Harper, 1998.
Chondrophycus flagelliferus (J. Agardh); Nam, 1999.

3.2. COLETA E PROCESSAMENTO

Os exemplares de *Chondrophycus papillosus* foram coletados na Praia do Forte, no litoral do Estado da Bahia (fevereiro de 2001). Os exemplares de *Chondrophycus flagelliferus* foram coletados na Praia da Pedra do Xaréu, no litoral do Estado da Pernambuco (fevereiro de 2001). Os exemplares de *C. flagelliferus* foram classificados pela Dra. Mutue Toyota Fujii do Instituto de Botânica, Seção de Ficologia. Os exemplares de *C. papillosus* foram classificados pela da Dra. Silvia Maria Pita de Beuclair Guimarães do Instituto de Botânica/SP.

Exemplares da espécie *C. flagelliferus* e *C. papillosus* estão depositados no Herbário da UFPR, Departamento de Botânica, sob o número UPCB-55549 e UPCB 55343, respectivamente.

Uma segunda amostra de *C. fagelliferus* foi coletada na Praia de Bombinhas, no litoral do Estado de Santa Catarina. Para uma verificação da existência de epífitas e endófitas, os espécimes foram exaustivamente

examinados usando estereomicroscópio e microscópio. Aproximadamente 1 g da região apical do talo, livre de qualquer tipo de contaminante, foi selecionada para ser utilizado como material padrão.

Os exemplares das duas espécies foram lavados com água corrente, secos à temperatura ambiente (ao sol) e moídos em moinho de faca (WILEY MILL). As algas secas e moídas foram submetidas ao processo de extração descrito a seguir.

3.3. EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS DE *C. papillosus* E *C. flagelliferus*

As algas *C. papillosus* e *C. flagelliferus* secas e moídas foram submetidas à extração aquosa (1,5% m/v) sob agitação mecânica a 25 °C, por 5 horas. Os extratos foram centrifugados (10.000 XG por 15 minutos), obtendo-se um resíduo e um sobrenadante. Posteriormente, ao sobrenadante foi adicionado etanol (três volumes). Os precipitados etanólicos das extrações aquosas a 25 ^{o}C foram ressolubilizados em água destilada, dialisados contra água destilada e liofilizados. As frações polissacarídicas obtidas a partir de *C. papillosus* e *C. flagelliferus* foram denominadas de P1 e F1, respectivamente.

Os respectivos resíduos da extração aquosa a 25 ^{o}C foram suspensos em água (3,0% m/v) e mantidos sob agitação mecânica a 80 ^{o}C por 3 horas.

Após centrifugação (10.000 XG por 15 minutos) aos sobrenadantes foi adicionado etanol (três volumes). O precipitado obtido, após centrifugação, foi ressolubilizado em água, dialisado e liofilizado, originando as frações P2 e F2 para as algas *C. papillosus* e *C. flagelliferus*, respectivamente. O processo de extração a 80 ^{o}C foi repetido por mais quatro vezes para ambas as algas, originando as frações P3-P6 (*C. papillosus*) e F3-F6(*C. flagelliferus*).

3.4. PRECIPITAÇÃO COM KCl

As frações polissacarídicas de maior rendimento, P2 e F2, foram solubilizadas em água (0,25 % m/v) à temperatura ambiente, seguido da adição de cloreto de potássio de modo a obter concentrações crescentes deste (0,25;

0,5; 0,75; 1,0; 1,5 e 2,0M). Após adição de KCl a solução foi mantida sob agitação mecânica (3 horas) e posteriormente em repouso (14 horas a 4 °C) seguida por centrifugação (12.000 rpm durante 15 minutos). O material precipitado foi dialisado e liofilizado, enquanto o sobrenadante foi submetido a um novo tratamento com uma concentração maior de sal. De *C. papillosus* foram obtidas, a partir de P2, as frações P2a (0,25M KCl), P2b (0,5M KCl), P2c (0,75M KCl), P2d (1,0M KCl) e P2e (1,5M KCl). De *C. flagelliferus* foram obtidas, a partir de F2, as frações F2a (0,25M KCl), F2b (0,5M KCl), F2c (0,75M KCl) e F2d (1,0M KCl).

Os polissacarídeos solúveis em KCl 2M obtidos a partir das frações P2 e F2 foram denominados P2S e F2S, respectivamente.

3.5. CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL

3.5.1. MÉTODOS ANALÍTICOS GERAIS

3.5.1.1 A dosagem de açúcar total foi realizada pelo método do fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS et al. 1956), com sensibilidade entre 10-100 μg, utilizando-se como padrão galactose. A leitura foi realizada no comprimento de onda de 490 nm.

3.5.1.2 O teor de sulfato foi determinado pelo método de DODGSON e PRICE (1961). Após hidrólise das amostras com HCl 1M por 5 horas a 105 ^{o}C, foi adicionado o reativo gelatina-bário formando posteriormente o sulfato de bário, que permaneceu suspenso. Como padrão, foi utilizado solução de sulfato de sódio diluído em HCl 1M, a leitura foi realizada no comprimento de onda de 360 nm. A sensibilidade do método está na faixa de 20-200 μg de sulfato.

3.5.1.3 A determinação da rotação óptica específica ($[\alpha]_D$) foi realizada em polarímetro RUDOLPH RESEARCH, modelo Autoplol III, a 20 ^{o}C, com as amostras na concentração de 0,2 g% em água destilada.

3.6. MÉTODOS HIDROLÍTICOS

3.6.1. HIDRÓLISE ÁCIDA TOTAL

Inicialmente, todas as frações foram hidrolisadas pelo método de hidrólise do tipo redutiva adaptada por JOL et al. (1999) com descrito a seguir. As frações que apresentaram apenas manose e xilose foram submetidas à hidrólise ácida total com ácido trifluoracético (TFA) 1M a 100 ^{o}C por 4 h sendo os monossacarídeos obtidos reduzidos com $NaBH_4$ por 16 horas, acetilação com anidrido acético a 120 ^{o}C por 1,0 h e lavagem com água/$CHCl_3$/$NaHCO_3$, para posterior análise por cromatografia liquido gasosa (CLG) e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-EM).

Xilomananas permetiladas foram submetidas à hidrólise ácida total (ácido fórmico 45%, 100 ^{o}C, 16 h) seguida por redução com $NaBH_4$ por 14 horas, acetilação a 120 °C por 1 hora e lavagem com água/$CHCl_3$/$NaHCO_3$ para análise por CLG e CG-EM. Galactanas permetiladas foram submetidas à hidrólise ácida total do tipo hidrólise redutiva.

3.6.2. HIDRÓLISE ÁCIDA TOTAL DO TIPO HIDRÓLISE REDUTIVA

Galactanas sulfatadas foram submetidas à hidrólise ácida total do tipo hidrólise redutiva de acordo com o método de STEVENSON e FURNEAUX (1991), modificada por FALSHAW e FURNEAUX (1994) e adaptado por JOL et al. (1999) a qual se processa em duas etapas.

Na primeira etapa, onde ocorre a liberação e a concomitante redução das unidades de 3,6-anidrogalactose, o polissacarídeo foi hidrolisado a 80 ^{o}C por 30 minutos na presença de TFA, na concentração final de 2,4M, e do complexo 4-metil morfolina borane (agente redutor estável em meio ácido).

Na segunda etapa, onde ocorre a hidrólise e a redução das demais unidades monossacarídicas, o material pré-hidrolisado foi mantido a 120 ^{o}C por 60 minutos na presença de TFA, na concentração final de 2M e de 4-metil morfolina borane. Os alditóis assim obtidos foram acetilados com anidrido acético (0,8 ml) / TFA concentrado (0,4 ml) durante 15 minutos a 50 ^{o}C. Na

forma de acetato de alditol, foram analisados por cromatografia liquido gasosa (CLG) e cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-EM).

3.6.3. HIDRÓLISE ÁCIDA TOTAL PARA DETERMINAÇÃO DO TEOR DE ÁCIDO PIRÚVICO

As frações contendo ácido pirúvico foram submetidas à hidrólise ácida total de acordo com o método descrito por TROYANO et al. (1996), modificada por VERHOEF et al. (2003). Os polissacarídeos foram submetidos à hidrólise ácida total em triplicata (ácido trifluoracético 1M, 120 ^{o}C) por diferentes tempos (2-10 horas) seguida por análise direta por cromatografia líquida de alta-eficiência (CLAE).

3.7. ANÁLISE DE METILAÇÃO

Os polissacarídeos sulfatados foram inicialmente dialisados contra solução de trietilamina 5% (10ml), visando-se obter após liofilização, polissacarídeos sulfatados na forma de sal de trietilamônio, solúveis no solvente aprótico dimetil sulfóxido – DMSO – (STEVENSON e FURNEAUX, 1991).

Os polissacarídeos sulfatados na forma de sal de trietilamônio foram metilados de acordo com o método de CIUCANU e KEREK (1984), utilizando-se iodeto de metila (ICH_3) e hidróxido de sódio pulverizado. Após solubilização em DMSO (1 ml para cada 15 mg de polissacarídeo) foi adicionado NaOH pulverizado (30 mg) e após agitação mecânica vigorosa (30 minutos), foi adicionado iodometano (0,1 ml) sob agitação mecânica vigorosa (30 minutos).

Este processo (adição de NaOH e iodometano) foi repetido por mais 2 vezes completando-se assim uma etapa de metilação. A cada etapa as frações foram dialisadas e liofilizadas.

O material metilado foi então neutralizado, dialisado, liofilizado, hidrolisado e analisado por CLG e CG-EM na forma de alditóis acetilados.

3.8. MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

3.8.1. CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA

No processo de purificação dos polissacarídeos obtidos das algas *C. Papillosus* e *C. flagelliferus* foi utilizada cromatografia de troca iônica em coluna contendo DEAE-SEPHACEL na forma Cl^-. A coluna utilizada apresentava 30,0 cm de altura por 5,0 cm de diâmetro.

As frações polissacarídicas P2S e F2S, solúveis em KCl 2,0M, foram eluídas inicialmente com água e soluções de NaCl de molaridade crescente (0,25 – 2,0M) sendo a detecção dos açúcares realizada pelo método de fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS et al., 1956) entre uma eluição e outra.

Foram obtidas de *C. papillosus* as frações denominadas P2S-1 (0,25M NaCl), P2S-2 (0, 5M NaCl), P2S-3 (0,75M NaCl), P2S-4 (1,0M NaCl), P2S-5 (1,5M NaCl) e P2S-6 (2,0M NaCl). De *C. flagelliferus* foram obtidas as frações denominadas F2S-1 (0,25M NaCl), F2S-2 (0, 5M NaCl), F2S-3 (0,75M NaCl), F2S-4 (1,0M NaCl), F2S-5 (1,5M NaCl) e F2S-6 (2,0M NaCl).

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

3.8.2. CROMATOGRAFIA LÍQUIDO-GASOSA

As análises por cromatografia gasosa foram realizadas em Cromatógrafo HEWLETT PACKARD 5890, com detector de ionização de chama (300 °C) e injetor (250 °C), utilizando nitrogênio como gás de arraste e coluna capilar de sílica fundida (30 m X 0,25 mm d.i.), DB-225 (0,25 μm), em diferentes temperaturas: análises cromatográficas para acetatos de alditóis foram realizadas a 220 °C, e as amostras de acetatos de alditóis parcialmente *O*-metilados foram realizadas a 210 °C.

3.8.3. CROMATOGRAFIA LÍQUIDO-GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSA (CG-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 ºC, 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 1,0 ml/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, SASSAKI et al., 2005).

3.8.4. CROMATOGRAFIA DE GEL PERMEAÇÃO (HPSEC-MALLS) – ANÁLISE DE HOMOGENEIDADE E MASSA MOLECULAR

Para a análise de homogeneidade e determinação da massa molecular ponderal média (Mw) foram preparadas soluções dos polissacarídeos na concentração de 1 mg/ml em solução de nitrito de sódio ($NaNO_2$ 0,1M) contendo azida de sódio (NaN_3, 200 ppm). As soluções obtidas foram filtradas em membranas MILLIPORE (acetato de celulose) de 0,45 e 0,22 μm. As análises foram realizadas em HPLC acoplado a detectores de espalhamento de luz e índice de refração, com fluxo de 0,6 ml/min. a 20 °C. Para determinação

da massa molecular ponderal média utilizou-se o valor de dn/dc (variação do índice de refração com relação à concentração) que foi previamente determinado.

As análises de homogeneidade e de determinação do valor de Mw foram realizadas em cromatógrafo de exclusão estérica de alta pressão (HPSEC) WATERS, equipado com um detector de índice de refração diferencial WATERS modelo 2410 e com detector de espalhamento de luz em multiângulos (MALLS) WYATT TECHNOLOGY modelo DAWN DSP com 18 detectores dispostos ao redor da fotocélula em diferentes ângulos. Foram utilizadas 4 colunas de gel permeação WATERS (Ultrahydrogel®) com limites de exclusão de 1.10^6, 4.10^5, 8.10^4 e 5.10^3, em série. O eluente utilizado foi uma solução de ($NaNO_2$ 0,1 M) contendo NaN_3 (200 ppm).

Para determinação do dn/dc soluções contendo 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1,0 mg do polissacarídeo foram preparadas a partir de uma solução contendo 1,0 mg da amostra em 1 ml de $NaNO_2$ (0,1 M) e azida de sódio (200 ppm) previamente filtradas em membrana Millipore 0,45 μm. As análises foram realizadas utilizando índice de refração, com fluxo de 0,6 ml/min. a 20 ^oC.

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 Mw é:

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

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

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

A2 = 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

$$R_\theta = \frac{G_\theta . D}{Go . \sigma' . 1'}$$

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

3.8.5. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA-EFICIÊNCIA (CLAE)

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foi utilizada para quantificação do ácido pirúvico liberado após hidrólise dos polissacarídeos piruvatados. Empregou-se o método de troca iônica, sendo as análises realizadas em eluição isocrática. O sistema cromatográfico Shimadzu Scientific Instruments Inc. era composto por uma bomba modelo LC10AD, sistema de aquecimento de colunas modelo CTO10A e sistema de controle e aquisição de dados CBM10A (Shimadzu, Kyoto, Japão). Os componentes das amostras foram detectados por espectrofotometria de Ultra-Violeta (UV) a 210 nm, com detector modelo SPD 10A, sendo os dados cromatográficos tratados por software CLASS LC10, da própria Shimadzu. As injeções foram realizadas por amostragem manual, correspondendo o volume de injeção a 10 μl (*loop*).

O método da cromatografia líquida foi realizado em coluna Phenomenex Rezex 8% H. Organic Acid – ROA – (7,8 x 300 mm, 8μm), operada a 65 °C e precedida por uma pré-coluna Phenomenex modelo Carbo H+ (4 x 3,0 mm) para remoção de cátions interferentes. A fase móvel utilizada era composta por água contendo 0,5 ml/l de ácido sulfúrico a uma vazão de 0,5 ml/min., desgaseificada por sonicação seguida por borbulhamento com hélio. As respectivas curvas de calibração para análise quantitativa, por padronização

externa, foram baseadas em soluções padrão de ácido pirúvico Sigma® com concentrações variando de 1 μg/ml a 1mg/ml. O ácido pirúvico eluído da coluna foi identificado através da comparação do tempo de retenção do padrão primário injetado isoladamente assim como da co-eluição deste com uma das amostras analisadas.

3.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS OBTIDOS

Todos os resultados obtidos na padronização da metodologia usando CLAE para análise quantitativa do teor de ácido pirúvico presente em polissacarídeos obtidos a partir de algas vermelhas foram expressos como a média de, no mínimo, três injeções consecutivas ± desvio padrão. As análises foram realizadas pelo teste ANOVA e seqüencialmente pelo teste de Tukey. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado significante, utilizando em todos os cálculos o programa Graphpad Prism versão 3.02 de 2000.

3.10. MODIFICAÇÃO QUÍMICA DOS POLISSACARÍDEOS

3.10.1. DESSULFATAÇÃO POR TRATAMENTO SOLVOLÍTICO

3.10.1.1. PREPARO DO SAL DE PIRIDÍNEO

O processo de solvólise foi conduzido com os polissacarídeos (F2a, F2b, P2d, P2e, F2S-3 e P2S-3) na forma de sal de piridíneo. Este sal foi formado através da solubilização das frações em água e então foi adicionada resina catiônica DOWEX 50x8 na forma H^+, sob agitação magnética a 25 °C por 30 minutos. O pH do sobrenadante ficou entre 1-2. O filtrado (obtido por filtração à pressão reduzida) foi neutralizado (em capela) com piridina, até pH 7,0 e liofilizado (NAGASAWA et al., 1979).

3.10.1.2. SOLVÓLISE

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

A solução resultante foi mantida a 100 °C durante 4 horas. Após o resfriamento, a fração solvolisada foi submetida à diálise exaustiva contra água destilada e, em seguida, liofilizada. O polissacarídeo dessulfatado foi submetido à metilação conforme descrito no item 3.7.

3.10.2. DEGRADAÇÃO CONTROLADA DE SMITH

Para a realização da degradação controlada de Smith, a fração F2a foi solubilizada em água destilada (50 mg/ 20 ml) contendo periodato de sódio ($NaIO_4$ – 130 mg) e mantida em ambiente escuro a temperatura ambiente durante 48 horas sob agitação magnética suave.

Após este período a solução foi tratada com etilenoglicol visando consumir o excesso de $NaIO_4$, reduzida com boroidreto de sódio ($NaBH_4$ - 10%, pH 11) durante 20h, neutralizada com ácido acético, dialisada e liofilizada (FURNEAUX; STEVENSON, 1990). O polissacarídeo assim modificado foi submetido à hidrólise com TFA 1M durante 20 horas à temperatura ambiente. A fração quimicamente modificada assim obtida foi denominada de F2a-s.

3.11. MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS

3.11.1. RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

As análises de ressonância magnética nuclear (RMN) foram realizadas em espectroscópio da marca BRUKER, modelo DRX 400, série Avance, em “probe” de diâmetro externo de 5 mm ou 10 mm, com as amostras dissolvidas em água deuterada (D_2O), à temperatura de 30, 50 ou 80 ^oC. Os deslocamentos químicos, expressos em ppm, foram determinados utilizando

acetona como padrão interno tanto para as análises de ^{13}C (30,20 ppm) quanto para ^{1}H (2,224 ppm).

3.11.1.1. RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE CARBONO-13 (RMN - ^{13}C)

Os espectros de RMN – ^{13}C foram obtidos na freqüência base de 100,61 MHz, com intervalo de aquisição de sinal de 0,6 segundos, sendo feitas de 4.000 – 70.000 aquisições, utilizando-se um intervalo de 0,1 segundo entre os pulsos.

3.11.1.2. RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE PRÓTON (RMN – ^{1}H)

Os espectros de RMN – ^{1}H foram obtidos na freqüência base de 400,13 MHz, sendo necessário promover a troca dos hidrogênios das hidroxilas por deutério e a remoção completa das moléculas de água presentes, através da dissolução das frações em D_2O, congelamento e liofilização (este processo foi repetido no mínimo por 3 vezes), com a finalidade de diminuir a intensidade do sinal relativo ao hidrogênio ligado a oxigênio, o qual prejudica a qualidade do espectro obtido.

3.11.1.3. HMQC (HETERONUCLEAR MULTIPLE QUANTUM CORRELATION SPECTROSCOPY)

Através desta técnica heteronuclear foi possível determinar quais átomos de hidrogênio (^{1}H) estão ligados a quais átomos de carbono (^{13}C) através de suas correlações obtidas no espectro, a partir de sinais de ^{13}C conhecidos ou de ^{1}H já conhecidos.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS DAS ALGAS *Chondrophycus papillosus e Chondrophycus flagelliferus*

4.1.1. EXTRAÇÃO E ANÁLISE QUÍMICA

Após coleta, os exemplares de *C. papillosus* e *C. flagelliferus*, pertencentes à ordem Ceramiales, foram lavados, desidratados e submetidos à moagem. Ambas as espécies foram, separadamente, submetidas ao mesmo procedimento de extração, de forma semelhante ao descrito por DUARTE et al. (2004).

Inicialmente, o material foi submetido à extração aquosa, à temperatura ambiente (1,5 g%, 25° C) sendo o resíduo subseqüentemente submetido à extração aquosa a quente (3,0 g%, 80° C) por cinco vezes consecutivas, todas sob agitação mecânica vigorosa.

Os extratos aquosos obtidos em cada passo de extração foram centrifugados (8.000 rpm durante 15 min.) e concentrados parcialmente sob pressão reduzida e precipitados com etanol (3 volumes). Após nova centrifugação (8.000 rpm durante 15 min.), os sobrenadantes etanólicos (etanol 75%) foram descartados, e os precipitados contendo polissacarídeos foram ressolubilizados em água, dialisados contra água destilada e liofilizados, ESQUEMA 1.

Os polissacarídeos solúveis em meio aquoso de *C. papillosus* (P1 – P6) representaram aproximadamente 20% do material inicial, enquanto os polissacarídeos solúveis em meio aquoso obtidos de *C. flagelliferus* (F1 – F6) representaram aproximadamente 27% do material inicial.

O rendimento individual das frações de *C. papillosus* (P1 – P6) e *C. flagelliferus* (F1 – F6) mostrou-se variado, sendo que em ambas as frações a primeira extração a quente (P2 e F2) foram as majoritárias, conforme pode ser observado na TABELA 1.

O rendimento em polissacarídeos das algas *C. papillosus* e *C. flagelliferus* são compatíveis com os obtidos para outras algas da ordem

Ceramiales, o qual varia de 12,5% a 33,8% (BOWKER e TURVEY, 1968a; USOV, IVANOVA e SHASHKOV, 1983).

As análises de carboidratos totais das frações originárias de *C. papillosus* mostraram-se muito semelhantes, variando de 63,8 a 71,0%. De forma semelhante, a mesma análise quando realizada para *C. flagelliferus* mostrou valores também semelhantes, variando de 54,2 a 66,1% (TABELA 1).

A análise química para determinação do teor de grupos sulfato demonstrou que todas as frações são sulfatadas, porém, as extrações aquosas a 80 °C (P2 e F2) apresentaram maior porcentagem (17,5 e 20,2%, respectivamente) de grupos sulfato (TABELA-1). Pode-se notar também, que o grau de substituição por sulfato presente nas frações de *C. flagelliferus* (F1 – F6; 15,8 a 20,2%) é semelhante ao observado nas frações de *C. papillosus* (P1 – P6; 15,2 a 17,5%). O grau de substituição por sulfato em polissacarídeos obtidos de algas vermelhas pode variar desde valores extremamente baixos, como os encontrados nas galactanas comerciais de *Ahnfeltia. tobuchiensis* (0,2 a 0,3%) (TRUUS et al., 2006) até maiores porcentagens (37 e 32,5%), como as observadas nas frações de *Kallymenia reniformis* e *Pachymenia carnosa*, respectivamente (CHOPIN et al., 1994). O teor de sulfato observado nas algas em estudo é próximo ao obtido para outras algas da família Rhodomelaceae, como *Bostrychia montagnei* (17 – 23% – DUARTE et al., 2002) e *Acanthophora spicifera* (12,8 – 26,6% – DUARTE et al., 2004), sendo superior ao obtido para algumas espécies de *Gracilaria* (2,3 – 13,9% – MELO et. al., 2002).

Os polissacarídeos obtidos dos exemplares de *C. flagelliferus* coletados na Praia de Bombinhas, litoral de Santa Catarina foram obtidos por extração aquosa com água quente (80 ^{o}C) como descrito acima, gerando o extrato bruto denominado FH (TABELA 1).

ESQUEMA 1. EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS DAS ALGAS VERMELHAS *C. papillosus* e *C. flagelliferus*

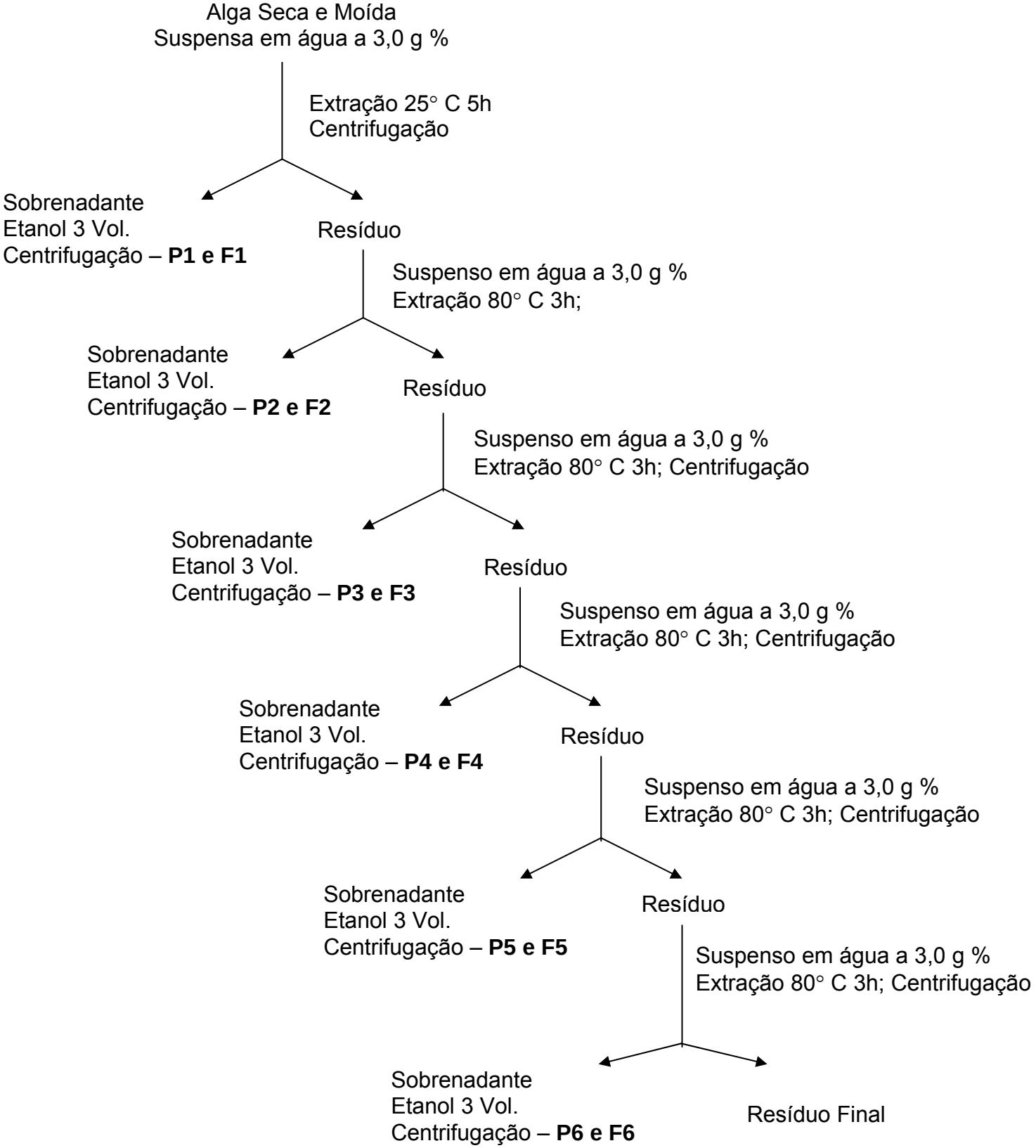


TABELA 1. RENDIMENTO E ANÁLISE QUÍMICA DAS FRAÇÕES BRUTAS DE *C. papillosus* (P1 – P6) E *C. flageliferus* (F-1 – F6, FH)

Fração[a]	Rendimento[b] (%)	Carboidrato[c] (%)	Sulfato[d] (%)	$[\alpha]_D$[e]	Ác. Pirúvico (%)
P1	15,2	67,7	15,2	-28	3,2
P2	17,5	63,8	17,5	-26	2,7
P3	17,2	66,7	17,2	-32	3,6
P4	16,8	67,2	16,8	-33	3,6
P5	16,6	71,0	16,6	-34	4,2
P6	15,4	69,9	15,4	-29	4,2
F1	3,0	60,9	16,1	-27	3,6
F2	10,5	62,3	20,2	-31	3,7
F3	2,0	62,9	19,7	-30	4,3
F4	8,5	59,1	15,8	-22	3,3
F5	2,0	66,1	16,0	-32	3,2
F6	0,9	54,2	16,9	-26	3,4
FH	15,0	59,0	22,2	-18	n.d.

a= Rendimento expresso em termos da alga seca e moída (*C. papillosus:* 88,2 g; *C. flagelliferus*: 20 g).

b= Determinado pelo método fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS et al., 1956); Expresso em termos de galactose.

c= Determinado segundo DODGSON; PRICE (1961); Expresso em termos de $NaSO_3$.

d= Rotação óptica específica das frações polissacarídicas na concentração de 0,2 g% em água, à temperatura de 20 ^oC.

e= Determinado segundo TROYANO, 1996.

Os resultados também mostram a presença de acetal de ácido pirúvico variando este de 2,7 a 4,2% e 3,2 e 4,3% para *C. papillosus* e *C. flagelliferus*, respectivamente. É importante ressaltar que este tipo de substituinte, acetal de ácido pirúvico, foi pela primeira vez encontrado em algas vermelhas por HIRASE (1957) em galactanas do tipo agarana. Em 1972, HIRASE e

WATANABE demonstraram também a presença de acetal de ácido pirúvico em galactanas do tipo carragenana.

Em todas as espécies de algas relatadas até o presente, o acetal de ácido pirúvico se encontra como 4,6-*O*-(1'-carboxietilideno)-β-D-galactopiranose, portanto substituindo os carbonos 4 e 6 das unidades A, tanto de galactanas do tipo agarana (CHOPIN et al. 1994), quanto de carragenanas (MILLER et al., 1995).

As frações brutas obtidas a partir das algas *C.papillosus* e *C. flagelliferus* foram submetidas à análise de rotação óptica, sendo que todos os valores obtidos foram negativos (-26 a -34 e -22 a -32, respectivamente), sugerindo que as galactanas presente nestas frações pertencem ao grupo das agaranas.

4.1.2. COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA

Para a determinação da composição monossacarídica, as frações foram submetidas ao processo de hidrólise redutiva total descrita por STEVENSON e FURNEAUX (1991). A análise de composição monossacarídica dos hidrolisados na forma de alditóis acetatos por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-MS) demonstrou que todas as frações sulfatadas (TABELA-2) de *C. papillosus* e *C. flagelliferus* eram constituídas principalmente por galactose (49,0 – 59,0 mol% e 46,4 – 58,8 mol%, respectivamente), e 3,6-anidrogalactose (10,8 – 21,4 mol% e 9,3 – 17,6 mol%, respectivamente) sendo que as frações provenientes de *C. flagelliferus* apresentaram-se mais semelhantes entre si quanto à sua composição monossacarídica que as de *C. papillosus*. Outros monossacarídeos monometilados como 6-*O*-metilgalactose (5,9 – 13,9 mol% para P1 – P6 e 7,6 – 14,9 mol% para F1 – F6) e 3,6-anidro-2-*O*-metilgalactose (0,0 – 9,7 mol% para P1 – P6 e 0,7 – 2,3 mol% para F1 – F6) além de xilose (0,0 – 12,3 mol% para P1 – P6 e 7,6 – 14,9 mol% para F1 – F6) são observados em porcentagens menores. A presença de glucose foi observada somente em proporções inferiores a 1% (traços) sendo proveniente de contaminação por glucanas (florideanas das algas vermelhas) (USOV; KLOCHKOVA, 1992).

Os primeiros relatos de unidades de galactose monometilada foram descritos nas algas vermelhas *E. spinosum* (BELLION et al., 1983) e em algas do gênero *Erythroclonium,* (6-*O*-metilgalactose; 16,0–24,0 mol%). Em três espécies do gênero *Erythroclonium* foram isoladas frações polissacarídicas com características estruturais complexas: uma alfa/iota-carragenana híbrida com altos níveis de metilação em C-6, menores proporções de piruvatação e metilação em C-3 (CHIOVITTI et al., 1998).

Xilose foi identificada por AGUILAN et al. (2003) e 6-*O*-metil galactose e 2-*O*-metil 3,6-anidrogalactose por TRUUS et al. (1997) entre os produtos de hidrólise dos polissacarídeos isolados de *E. denticulatum* e de *F. lumbricalis*, respectivamente.

As galactanas biossintetizadas por algas vermelhas possuem quantidades variáveis de 3,6-anidrogalactose, que pode chegar a um máximo de 50%, como observado na agarose (REES, 1969). Neste tipo de polímero o teor de sulfato é muito baixo, sendo a agarose comercial praticamente desprovida deste substituinte. Outras galactanas no entando, como as isoladas de *A. multifida* e *O. obtusiloba*, apresentam-se substituídas por grupos sulfato e metil em diferentes proporções e posições além de apresentarem acetal de ácido pirúvico e cadeias laterais de unidades monossacarídicas, como xilose ou galactose.

A presença do derivado 3,6-anidrogalactose e de unidades A sulfatadas em C-2 nas galactanas de *Chondria macrocarpa*, mostrou-se de grande importânica para a diferenciação dos polissacarídeos biossintetizados por essa alga em diferentes estações do ano (FURNEAUX e STEVENSON, 1990; MILLER e BLUNT, 2002). As algas coletadas no outono apresentavam elevados teores do derivado ciclizado e baixos teores de β-D-galactopiranose-2-sulfato, enquanto que a amostra coletada na primavera apresentava altas porcentagens do derivado 2-sulfato e unidades B principalmente como o precursor α-L-galactopiranose-6-sulfato (MILLER e BLUNT, 2002). Contudo, destaca-se que a maioria dos polímeros invetigados quanto a sazonalidade apresenta a mesma estrutura, não sofrendo alterações quanto à época do ano de coleta.

Assim, com exceção da agarose, todas as demais galactanas apresentam diferentes tipos de subsitutintes, como grupos sulfato, metil, acetal de ácido pirúvico e cadeias laterais formadas por diferentes unidades monossacarídicas.

TABELA 2. COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES BRUTAS DE *C. papillosus* (P1 – P6) E *C. flageliferus* (F-1 – F6)

Fração[a]	Composição monossacarídica (mol %)[c]					
	Gal[b]	3,6-AnGal[b]	6Me-Gal[b]	2Me-AnGal[b]	Xil[b]	Man[b]
P1	55,8	10,8	8,0	9,7	8,7	6,9
P2	49,0	13,8	5,9	-	11,0	20,3
P3	53,4	11,5	13,1	7,9	4,7	9,5
P4	59,0	12,1	6,7	8,1	-	14,0
P5	51,4	17,6	13,9	-	6,2	11,0
P6	58,1	21,4	11,9	8,6	-	-
F1	58,8	12,1	8,9	2,3	6,8	11,2
F2	49,6	11,1	7,6	1,3	7,4	23,1
F3	51,2	9,3	10,0	1,9	4,1	23,6
F4	46,4	17,6	14,9	0,7	7,9	12,5
F5	46,7	10,5	14,2	2,0	12,2	14,5
F6	55,1	10,3	12,8	1,4	3,9	16,5

(-) não detectado.

[a] Frações definidas no texto.

[b] Xil corresponde a xilose, Man a manose, Gal a galactose, 3,6-AnGal a 3,6-anidrogalactose, 6Me-Gal a 6-*O*-metilgalactose e 2Me-AnGal a 3,6-anidro 2-*O*-metilgalactose.

[c] Analise de composição determinada após hidrólise redutiva.

4.1.3. ANÁLISES DE RMN DE ^{13}C DAS FRAÇÕES BRUTAS P2 E F2

A análise por RMN de ^{13}C da fração P2 (FIGURA 4) revelou um espectro com grande número de sinais sendo esta complexidade reflexo da presença de diferentes padrões de substituição.

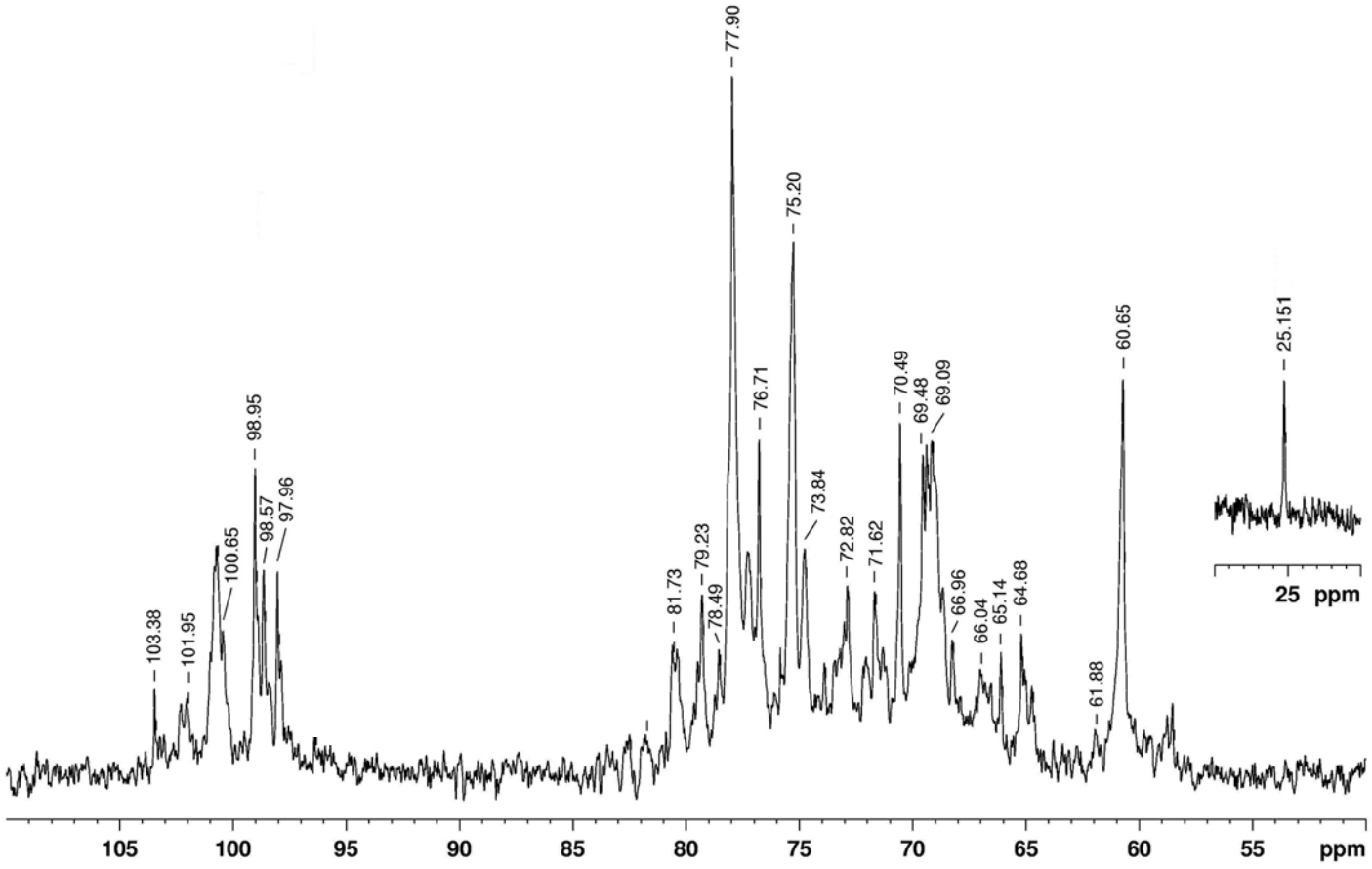
Na região anomérica (90-110 ppm) é possível observar a presença do sinal em 102,2 ppm correspondente a unidades de β-D-galactose ligada a 3,6-anidro-α-L-galactose, cujo sinal de C-1 aparece em 98,1 ppm. O sinal em 81,7 ppm é atribuído ao C-3 das unidades de β-galactopiranose ligada a 3,6-anidro-α-L-galactose, confirmando a presença desta díade na galactana P2. Ressalta-se que este sinal de C-3 é característico para esta díade (MILLER; BLUNT, 2000a).

O sinal alargado centrado em 100,6 ppm pode ser atribuído ao C-1 de β-D-galactose 2-sulfato, cujo sinal de C-2 sulfatado aparece bem pronunciado em 77,9 ppm (MILLER; BLUNT, 2000b). Outros sinais em 103,5 e 60,6 ppm são correspondentes às unidades de β-D-galactopiranose ligada a α-L-galactose e ao C-6 livre de galactose, respectivamente.

O sinal em 25,2 ppm é correspondentes ao grupo metil (CH_3-), de acetal de ácido pirúvico (GAREGG *et al.*, 1979; CHIOVITTI *et al.*, 1997) assim como o sinal próximo a 175,0 ppm correspondente ao carbono carboxílico do ácido pirúvico. Outros sinais em 71,6 e 66,0, podem ser atribuídos aos carbonos 4 e 5 de β-galactopiranose piruvatada, respectivamente (MILLER, 2003a).

Geralmente, a ressonância do carbono acetálico de ácido pirúvico não é observado no espectro de RMN de ^{13}C de galactanas de algas vermelhas. Segundo GORIN et al. (1982), o tempo de relaxamento (T_1) do carbono acetálico pode impedir a sua detecção por espectroscopia de RMN de ^{13}C, mesmo quando este substituinte está presente em uma quantidade significativa. Deste modo o sinal em 101,6 ppm, relativo ao carbono acetálico do acetal de ácido pirúvico não está definido e pode estar sobreposto a outros sinais na região anomérica.

FIGURA 4. ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DA FRAÇÃO P2 DE *C. papilosus.*



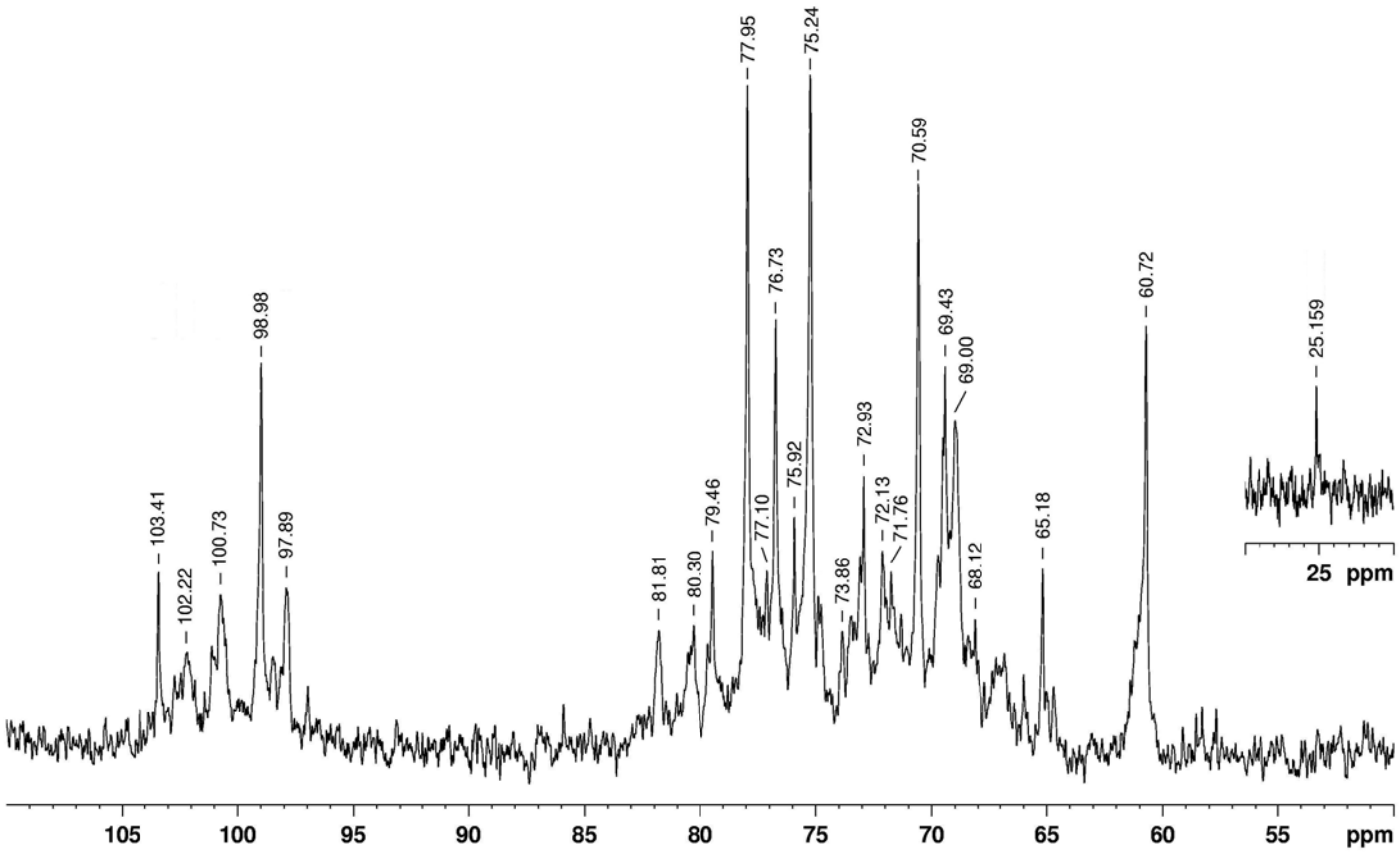
Análise realizada a 70°C em D_2O, calibração com acetona como padrão interno (30,2 ppm). Concentração da amostra 40 mg/ml.

O acetal de ácido pirúvico substituindo as unidades de β-galactopiranose (unidade A) foi encontrado em baixas proporções em espécies do gênero *Grateloupia*, *G. elliptica* (HIRASE; WATANABE, 1972) e *G. filicina* (ZABLACKIS; PEREZ, 1990), 2,92 e 0,18 % de piruvato, respectivamente.

CHOPIN et al. (1994) destacaram a necessidade de estudos mais detalhados com relação à presença de acetal de ácido pirúvico nas galactanas de diferentes fontes, para que se possa sugerir um significado quimiotaxonômico para estes substituintes.

Esta fração (P2) apresentou valor negativo de rotação óptica específica, -12, sugerindo que esta fração fosse composta por galactanas sulfatadas do tipo agarana.

FIGURA 5. ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DA FRAÇÃO F2 DE *C. flagelliferus*.



Análise realizada a 70°C em D_2O, calibração com acetona como padrão interno (30,2 ppm). Concentração da amostra 40 mg/ml.

A análise por RMN de ^{13}C da fração F2 revelou também um espectro com grande número de sinais, reflexo da presença de diferentes padrões de substituição, FIGURA 5. No entanto, nota-se que, pelo espectro de RMN ^{13}C, a fração F2 parece ser estruturalmente mais simples que a fração P2.

Na região anomérica é possível observar a presença do sinal em 103,4 ppm correspondente a unidades de β-D-galactopiranose ligada a α-L-galactose. O sinal em 100,7 ppm pode ser atribuído ao C-1 de β-D-galactose 2-sulfato (cujo sinal de C-2 sulfatado aparece bem pronunciado em 77,9 ppm)

e/ou as unidades de β-D-galactopiranose ligada a α-L-galactopiranose (MILLER; BLUNT, 2000b).

O sinal em 97,9 ppm também é observado na FIGURA 5, sendo atribuído aos C-1 das unidades de 3,6-anidro-α-L-galactopiranose que compõe a díade β-D-galactose (sinal em C1 em 102,2 ppm) ligada a 3,6-anidro-galactose (LAHAYE et al., 1989). Em 98,9 ppm notamos também um sinal de intensidade elevada, correspondente as unidades de 3,6-anidro-2-*O*-metil-α-L-galactose, também correspondente a agaranas.

A presença em campo mais alto do deslocamento químico em 25,0 ppm, referente ao grupo metil (CH_3-) de acetal de ácido pirúvico.

De acordo com GAREGG et al. (1979), o sinal do grupo metil de acetal de ácido pirúvico em 25,0 ppm, corresponde à configuração R do acetal. É importante ressaltar que em polissacarídeos de algas vermelhas só foi encontrado este substituinte na configuração R.

No espectro de F2 foi possível ainda observar a presença dos sinais em 65,1 e 66,6 ppm, atribuídos ao C-6 e ao C-5 de 4,6-*O*-(1'-carboxietilideno)-β-D-galactopiranose. Estas unidades piruvatadas podem estar ligadas a 3,6-anidro-α-L-galactose, a 3,6-anidro-2-*O*-metil-α-L-galactose ou a outro monossacarídeo constituinte desta galactana. Segundo MILLER (1998), a piruvatação da unidade A não interfere significativamente nos deslocamentos químicos dos carbonos das unidades B, quando estas unidades forem constituídas por unidades de 3,6-anidro-galactose (da série L- ou D-).

Outro sinal, como o em 81,8 ppm, foi atribuído ao C-3 das unidades de β-galactopiranose ligada a 3,6-anidro-α-L-galactose, confirmando também a presença desta díade na galactana F2. O sinal em 60,6 ppm é correspondente aos C-6 livres das unidades de galactose.

Os assinalamentos presentes no espectro de ^{13}C da fração F2, indicando a presença de unidades de galactopiranose pertencentes à série L-, sugerem que esta fração também é composta por galactanas sulfatadas do tipo agarana.

No entanto, vale ressaltar que em ambas as frações, P2 e F2, a análise de composição monossacarídica revelou manose (20,3 e 23,1%, respectivamente). A presença deste monossacarídeo e de xilose indica que os

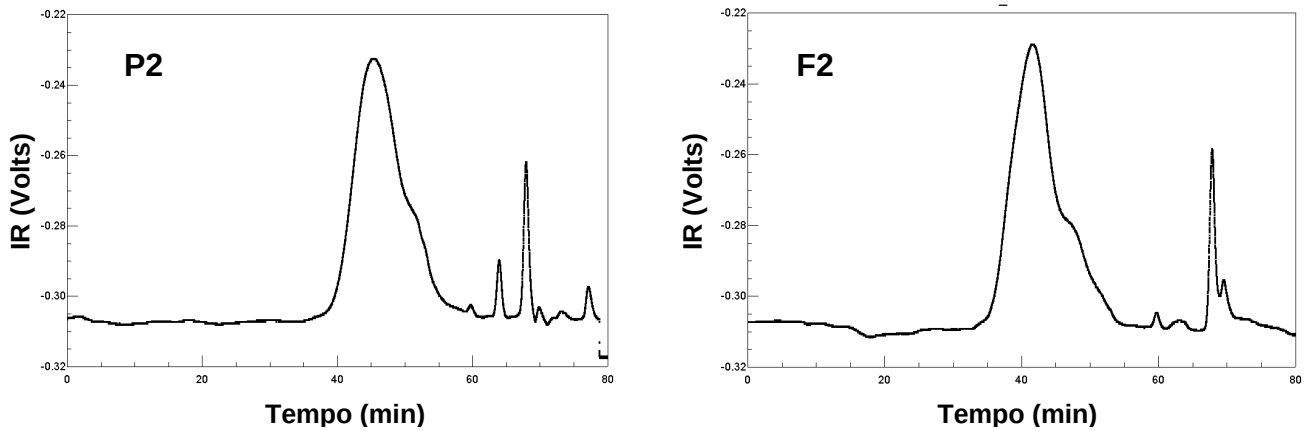
extratos P2 e F2 além de agaranas sulfatadas, piruvatadas e/ou parcialmente substituídas por xilose, contêm outro tipo de polissacarídeo como mananas, xilanas e/ou xilomananas, por exemplo.

Com a finalidade de separar estes polissacarídeos os extratos P2 e F2 foram submetidos à precipitação fracionada com KCl, como descrito a seguir.

4.1.4. ANÁLISE DE HOMOGENEIDADE DAS FRAÇÕES P2 e F2

As frações P2 e F2 foram também submetidas à análise de cromatografia de exclusão estérica, acoplada a detectores de espalhamento de luz e de índice de refração, com a finalidade de se observar a homogeneidade das frações (FIGURA 6). Como podem ser observados os cromatogramas apresentam picos principais assimétricos indicando o caráter heterogêneo e polidisperso das frações P2 e F2.

FIGURA 6 - CROMATOGRAMA DE HPSEC DAS FRAÇÕES P2 E F2



* experimento realizado com os polissacarídeos dissolvidos em solução $NaNO_3$ 0,1 M contendo NaN_3 200 ppm.

IR = Índice de Refração

4.2. PRECIPITAÇÃO FRACIONADA DAS XILOMANANAS DE *Chondrophycus papillosus*, UTILIZANDO KCl.

Com a finalidade de purificar os polissacarídeos da fração P2 de *C. papillosus*, foi realizado um tratamento com solução de cloreto de potássio.

Este processo baseia-se na propriedade apresentada por certos tipos de carragenanas (kappa-, iota- carragenanas) de geleificarem na presença de cátions, como o íon potássio, enquanto as agaranas permanecem solúveis. Esta geleificação é dependente do teor de unidades 3,6-anidrogalactose e de grupos sulfato presentes na molécula (NOSEDA, 1994; USOV, 1998). Carragenanas com maiores teores de 3,6-anidrogalactose e menores teores de grupos sulfato tendem a geleificar em menores concentrações de potássio.

Esta metodologia de fracionamento foi primeiramente descrita por CEREZO (1967) que realizou o fracionamento de um sistema de galactanas da alga *Gigartina skottsbergii* (ordem Gigartinales), isolando diversas frações que precipitavam em diferentes concentrações de KCl.

A fração P2 foi solubilizada em água destilada na concentração de 0,25 g% e tratada com KCl, com aumento gradual do sal, até a concentração de 2M.

O precipitado obtido após cada adição de KCl foi dialisado exaustivamente contra água destilada, sendo utilizado como controle do nível de cloreto na água de diálise o teste de turbidez com nitrato de prata ($AgNO_3$).

A partir do extrato P2 foram obtidas as subfrações precipitadas P2a, P2b, P2c, P2d e P2e e uma fração (P2S) que permaneceu solúvel em KCl 2M.

Na TABELA 3 estão demonstradas as faixas de fracionamento, rendimentos, rotação óptica específica, carboidratos e teores de grupos sulfato, das subfrações obtidas da alga *C. papillosus* após este fracionamento.

A fração P2S representa aproximadamente 80% da fração P2 enquanto as precipitadas com KCl totalizam aproximadamente 20%. A fração solúvel em KCl 2M (P2S), apresentou valores correspondentes ao teor de sulfato (16,6%) e carboidratos (57,2%) semelhantes aos da fração P2 (17,5 e 63,8%, respectivamente) além da rotação óptica específica (-26,0 para P2 e -27,4 para P2S).

As frações precipitadas também apresentaram rotação óptica específica negativa (-28,8 - -40,3).

TABELA 3. RENDIMENTO, ANÁLISE QUÍMICA E ROTAÇÃO ÓPTICA DAS SUBFRAÇÕES NATIVAS (P2a – P2e, P2-S) E DESSULFATADAS (P2d-D E P2e-D) OBTIDAS APÓS TRATAMENTO DE P2 COM KCl.

Fração[a]	Faixa de Fracionamento (M) KCl	Rendimento (%)	$[\alpha]_D$ (°)	Carboidrato (%)	Sulfato SO_3Na (%)
P2	-	17,5 [b]	-26,0	63,8	17,5
P2a	0,25	9,1 [c]	-28,8	51,5	19,1
P2b	0,5	2,6 [c]	-36,2	44,0	20,9
P2c	0,75	0,6 [c]	-40,3	45,2	17,4
P2d	1,0	3,2 [c]	-31,9	67,0	28,1
P2d-D	-	75,3	n.d.	n.d.	-
P2e	1,5	3,7 [c]	-32,4	55,7	25,1
P2e-D	-	58,8	n.d.	n.d.	3,4
P2-S	Solúvel 2,0	80,8 [c]	-27,4	57,2	16,6

n.d. não determinado.

[a] Frações definidas no texto.

[b] Porcentagem baseada na alga seca e moída.

[c] Porcentagem baseada no total de material recuperado após fracionamento com KCl. Rendimento do fracionamento de 88,4%.

Como pode ser observado, a fração precipitada na concentração de 0,25M de KCl (P2a) apresentou o maior rendimento (9,1%) seguido da fração precipitada com 1,5M de KCl (P2e, 3,7%). As demais frações apresentaram rendimentos intermediários (0,6 – 2,6%).

A determinação do teor de grupos sulfato presentes nas frações precipitadas com KCl mostrou que todas as frações (P2a – P2e) são sulfatadas (17,4 – 28,1%).

A análise de composição monossacarídica (TABELA 4) das frações precipitadas com KCl revelou a presença unicamente de xilose e manose nas frações P2d, P2e, F2a e F2b. As demais frações (P2a, P2b, P2c, F2c e F2d) contêm, adicionalmente, galactose, 3,6-anidrogalactose, 6-*O*-metil galactose, 2-*O*-metil 3,6-anidrogalactose e traços de 2-*O*-metil-galactose.

Desta maneira, pode-se sugerir que os polissacarídeos precipitados com 1,0 e 1,5M de KCl (P2d e P2e, respectivamente) são xilomananas sulfatadas e as frações precipitadas com 0,25, 0,5 e 0,75 M de KCl por uma mistura de xilomananas e agarana que foi co-precipitada com as xilanas.

Como descrito na literatura, as algas vermelhas biossintetizam polissacarídeos quimicamente distintos (USOV, 1984; COLE; SHEATH, 1990; MILLER 1997; CHOPIN et al., 1999). Polímeros estruturalmente diferentes, como xilanas neutras, mananas, xilomananas e xilogalactanas sulfatadas podem ocorrer simultaneamente numa mesma espécie de alga (HAINES et al., 1990; MATULEWICZ et al., 1994; KOLENDER et al., 1997).

Uma estrutura deste tipo foi descrita a partir de polissacarídeos obtidos de *Chaetangium fastigiatum*, uma alga pertencente à ordem Nemaliales, por meio do fracionamento do extrato aquoso com a base quaternária cetrimida. Os autores descrevem a presença de um sistema de polissacarídeos sulfatados composto em parte por galactanas e mananas 3-*O*-ligadas substituídas em C-2 e C-6 por grupos sulfato, apresentando ainda ramificações simples por unidades simples de β-D-xilose em C-2).

TABELA 4. COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS SUBFRAÇÕES NATIVAS (P2a – P2e, P2-S) E DESSULFATADAS (P2d-D E P2e-D) OBTIDAS APÓS TRATAMENTO DE P2 COM KCl.

Fração[a]	Composição monossacarídica (mol %)[c]						
	Gal[b]	3,6-AnGal[b]	6Me-Gal[b]	2Me-Gal[b]	2Me-AnGal[b]	Xil[b]	Man[b]
P2	49,0	13,8	5,9	t.r.	-	11,0	20,3
P2a [c]	33,9	11,0	1,5	-	1,2	5,8	46,6
P2b [c]	29,6	13,9	1,8	-	1,7	5,3	47,7
P2c [c]	35,6	2,6	2,0	-	-	5,4	54,4
P2d [e]	-	-	-	-	-	6,1	93,9
P2d-D [e]	-	-	-	-	-	8,5	91,5
P2e [e]	-	-	-	-	-	13,2	86,8
P2e-D [e]	-	-	-	-	-	13,5	86,5
P2-S [c,d]	56,3	16,9	7,5	t.r.	-	12,3	7,0

(-) não detectado.

t.r. Porcentagem menor que 1,0% é considerada como traço

[a] Frações definidas no texto.

[b] Xil corresponde a xilose, Man a manose, Gal a galactose, 3,6-AnGal a 3,6-anidrogalactose, 6Me-Gal a 6-*O*-metilgalactose e 2Me-AnGal a 3,6-anidro 2-*O*-metilgalactose.

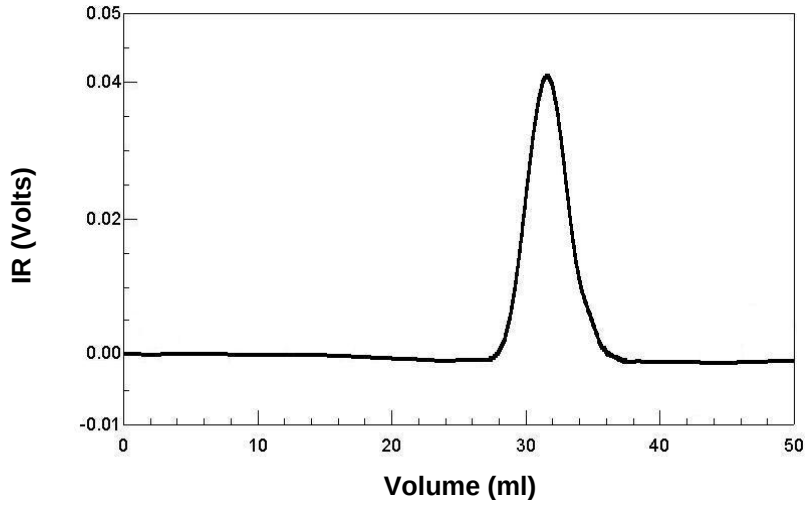
[c] Analise de composição determinada após hidrólise redutiva.

[d] Normalizado para excluir a glucose, 3-5%.

[e] Analise de composição determinada após hidrólise com TFA 1 M por 4 h a 100 ^{o}C

Por meio da análise por cromatografia de exclusão estérica acoplada a detectores de espalhamento de luz e índice de refração (HPSEC-MALLS) das subfrações precipitadas mostraram que P2d e P2e são compostas por polissacarídeos homogêneos (FIGURA 7) de massa molecular de 33 (dn/dc 0,142 ml/g) e 41 kDa (dn/dc 0,142 ml/g), respectivamente.

FIGURA 7 - CROMATOGRAMA DE HPSEC DA XILOMANANA P2d



* experimento realizado com os polissacarídeos dissolvidos em solução $NaNO_3$ 0,1 M contendo NaN_3 200 ppm.
IR = Índice de Refração

As frações nativas P2d e P2e foram submetidas à análise de metilação. Para tanto, utilizou-se o método descrito por CIUCANU e KEREK (1984) com os polissacarídeos na forma de sal de trietilamônio (STEVENSON e FURNEAUX, 1991). As frações metiladas foram hidrolisadas (acido fórmico 45% a 100 °C por 16h) e analisadas por CG-EM.

Entre os derivados obtidos a partir da fração P2d e P2e, os mais abundantes foram 3,6-di-*O*-metil manose (79,5 e 71,5%), 3-*O*-metil manose (10.6 e 12,3%), 3,4,6-tri-*O*-metil manose (4,4 e 3,4%) e 2,3,4-tri-*O*-metil xilose (5,5 e 8,2%) - TABELA 6.

O derivado majoritário 3,6-di-*O*-metil manose se originou a partir das unidades de manose substituídas em carbonos 2 e 4 enquanto o derivado 3-*O*-metil manose originou-se das unidades de manose substituídas em carbonos 2, 4 e 6. O terceiro derivado de maior percentagem detectado, 3,4,6-tri-*O*-metil manose corresponde a unidades simples de manose substituídas em C-2

A baixa porcentagem do derivado 2,3,6-tri-*O*-metil manose (2,6 mol%) presente na fração P2e corresponde a unidades de manopiranose 4-*O*-ligadas.

O derivado 2,3,4-tri-*O*-metil xilose se originou a partir das unidades de xilose presentes no polissacarídeo nativo como terminais não redutores.

A presença dos derivados parcialmente metilados encontrados nas frações P2d e P2e, 3-*O*-metil manose (10,6 e 14,3 mol%, respectivamente) em quantidades muito próximas aos dos derivados 2,3,4-tri-*O*-metil xilose (5,5 e 8,2 mol%, respectivamente) e 3,4,6-tri-*O*-metil manose (4,4 e 3,4 mol%, respectivamente) quando avaliados conjuntamente sugere que unidades terminais de xilose e manose 2-*O*-substituída glicosilam parte da cadeia principal em C-6 (TABELA 6).

Não foram observados derivados parcialmente metilados no carbono 2 das unidades de manose das frações nativas, sugerindo a completa substituição destas unidades em C-2.

Para confirmar o padrão de sulfatação as sub-frações foram submetidas ao processo de dessulfatação seguindo a metodologia descrita por NAGASAWA et al. (1979).

Para tanto, as frações P2d e P2e, na forma de sal de piridíneo, foram solubilizadas em DMSO:MeOH:piridina (89:10:1) e mantidas a 100 °C durante 5 horas. Após diálise contra água destilada e liofilização, foram obtidas as frações denominadas de P2d-D e P2e-D com rendimentos de 75,3 e 58,8%, respectivamente. Como resultado desta metodologia, foi observada uma redução de 100% no teor de sulfatação da sub-fração P2d e de 87,5% para P2e quando comparados aos das frações nativas (28,1 e 25,1% de sulfato, respectivamente).

TABELA 5. ANÁLISE DE METILAÇÃO DAS XILOMANANAS NATIVAS (P2d, P2e) E DESSULFATADAS (P2d-D, P2e-D)

Fração [a]	Derivado parcialmente metilado [b]						
	3,6-Man [c]	2,3,6-Man	3-Man [d]	2,3-Man	3,4,6-Man	2,3,4,6-Man	2,3,4-Xil
P2d	79,5	t.r.	10,6	-	4,4	-	5,5
P2d-D	-	79,0	-	11,6	-	4,2	5,7
P2e	71,5	2,6	14,3	-	3,4	-	8,2
P2e-D	8,2	62,8	-	16,6	-	3,0	10,0

[a] Frações são definidas no texto

[b] Mol % dos monossacarídeos parcialmente metilados nas posições indicadas.

[c] 3,6-Man analisado como 1,2,4,5-tri-*O*-acetil-3,6-di-*O*-metilmanitol, etc.

[d] Determinada após hidrólise ácida, redução com $NaBD_4$, acetilação e análise por CG-EM (*m/z* 130, 159, 190 e 219).

t.r. Porcentagem menor que 1,0% é considerada como traços.

A composição monossacarídica apresentada por esta fração também foi determinada (TABELA 4). Para P2d-D e P2e-D verificou-se que nenhuma modificação considerável na composição monossacarídica ocorreu como resultado deste tratamento solvolítico, indicando que não houve degradação do polissacarídeo após este processo de dessulfatação química.

Entre os derivados obtidos a partir das frações P2d-D e P2e-D, os mais abundantes foram 2,3,6-tri-*O*-metil manose (79,0 e 62,8%), 2,3,4,6-tetra-*O*-metil manose (4,2 e 3,0%), 2,3-di-*O*-metil manose (11,6 e 16,6%) e 2,3,4-tri-*O*-metil xilose (5,7 e 10,0%), - TABELA 5.

O derivado majoritário 2,3,6-tri-*O*-metil manose se originou a partir do derivado 3,6-di-*O*-metil manose após remoção dos grupos sulfato em C-2 pelo tratamento solvolítico (TABELA 5). Nota-se, por meio da análise de metilação das frações dessulfatadas, que o processo solvolítico foi menos eficiente na fração P2e, tendo-se em vista a presença ainda de 8,2% de unidades de 3,6-di-*O*-metil manose mesmo após a dessulfatação química desta molécula.

De forma semelhante, o derivado 2,3-di-*O*-metil manose (11,6 mol% para P2d-D e 16,6 mol% para P2e-D) originou-se das unidades de 3-*O*-metil manose.

Outro derivado parcialmente metilado de manose detectado, 2,3,4,6-tetra-*O*-metil manose (TABELA 5), corresponde às unidades não redutoras após tratamento solvolítico e conseqüente remoção dos grupos sulfato em C-2. Estas unidades glicosilam a cadeia principal de manose 4-*O*-ligada em C-6 de forma semelhante ao que ocorre com as unidades de xilose. Parte destas unidades de manose 2-sulfato poderia, também, ser atribuído aos terminais não redutores da cadeia principal.

O derivado 2,3,4-tri-*O*-metil xilose das frações P2d-D e P2e-D apresenta valores próximos (5,7 e 10,0 mol%, respectivamente) aos das frações nativas e correlações estruturais idênticas as presentes no polissacarídeo nativo, como terminais não redutores e não substituídos glicosilando a cadeia principal de manose 4-*O*-ligada em C-6.

Por fim, pode-se afirmar que a análise dos derivados parcialmente metilados obtidos das frações P2d-D e P2e-D (dessulfatadas) quando comparadas com as frações nativas sugere fortemente um padrão de

substituição das unidades de manopiranose por grupo sulfato em carbono 2 destas unidades.

A identificação dos elevados teores do derivado 3,6-tri-*O*-metil manose na fração nativa e do derivado 2,3,6-tri-*O*-metil manose na fração dessulfatada mostra o envolvimento do carbono 4 das unidades de manose na ligação glicosídica da cadeia principal.

Para confirmar o padrão de sulfatação estabelecido pelas análises de metilação as frações nativas P2d e P2e foram submetidas à análise de RMN de ^{13}C .

O espectro de C^{13} das frações P2d (FIGURA 8) e P2e (FIGURA 9) apresentam na região anomérica somente dois sinais em 103,4 e 99,0 ppm.

O sinal observado em campo mais alto desta região (99,0 ppm) foi atribuído ao C-1 de unidades de manopiranose, quando esterificadas em carbono 2 por grupos sulfato (KOLENDER et al., 1995; USOV et al., 1997; FALSHAW et al., 1998). O sinal em 78,1 ppm confirma o posicionamento em C-2 dos grupos sulfato.

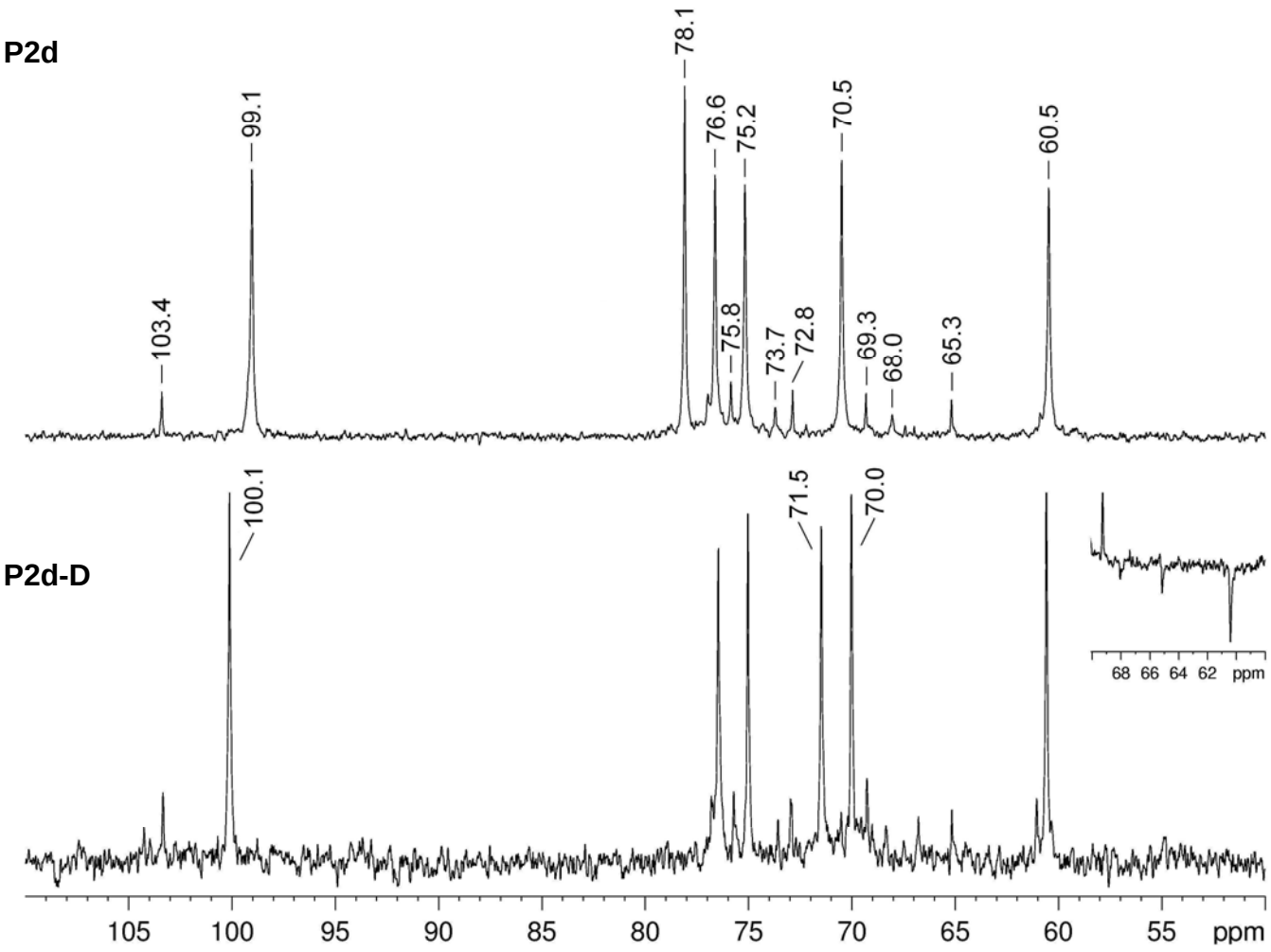
A análise do espectro revelou também que parte das unidades de manose possui C-6 ligado glicosidicamente como evidenciou o sinal em 68,0 ppm, atribuído ao C-6 ramificado de unidades de β-manopiranose (ISHRUD et al., 2001; HUA et al., 2004). Um segundo sinal em campo mais alto, correspondente ao C-6 das unidades de manose não ramificadas, foi identificado em 60,5 ppm (ISHRUD et al., 2001; HUA et al., 2004). Este resultado foi confirmado pelo experimento RMN de C^{13} – DEPT onde se observou a inversão dos sinais correspondentes aos C-6 das unidades de manose substituídas (68,0 ppm) e não substituídas (60,5 ppm) (FIGURA 8).

O carbono 4 das unidades de manopiranose teve seu assinalamento determinado, 76,6 ppm, sugerindo a presença de uma cadeia principal formada por unidades de manose 4-*O*-ligada (BOCIEK, et al., 1981; MANZI e CEREZO, 1986; FLORES et al., 2000).

Dois outros sinais, localizados em 66,8 e 61,0 ppm foram atribuídos aos C-4 e C-6 das unidades de β-manopiranose definidas como terminais não redutores.

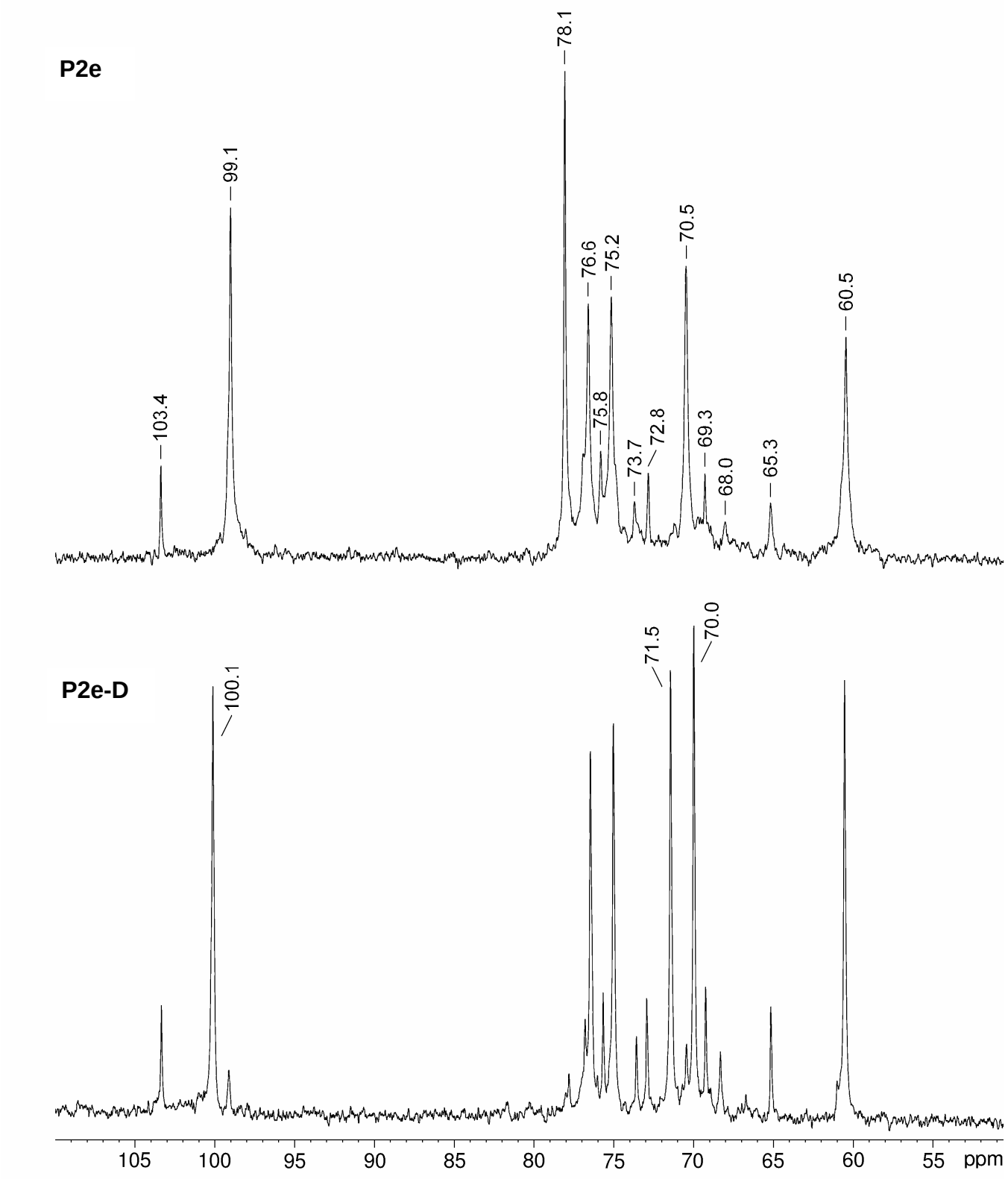
Não foram identificados nestes espectros quaisquer sinais passíveis de atribuição a unidades de galactose, resultado este que confirma a análise da composição monossacarídica realizada por CG-EM (TABELA 4).

FIGURA 8. ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DAS XILOMANANAS P2d, P2d-D e DETALHE DO ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C – DEPT DE P2d-D.



Análise realizada a 70°C em D_2O, calibração com acetona como padrão interno (30,2 ppm). Concentração da amostra 40 mg/ml.

FIGURA 9. ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DAS XILOMANANAS P2e E P2e-D.



Análise realizada a 70°C em D_2O, calibração com acetona como padrão interno (30,2 ppm). Concentração da amostra 40 mg/ml.

TABELA 6. ASSINALAMENTOS QUÍMICOS DE RMN DE ^{13}C E ^{1}H DAS XILOMANANAS NATIVAS (P2d, P2e) E DESSULFATADAS (P2d-D, P2e-D)

Unidade	Assinalamentos (ppm)													
	C-1	**C-2**	**C-3**	**C-4**	**C-5**	**C-6**	**H-1**	**H-2**	**H-3**	**H-4**	**H-5a**	**H-5b**	**H-6a**	**H-6b**
→4)-β-D-Man*p*-2-S-(1→														
Não ramificada em O-6[a]	99,0	78,1	70,5	76,6	75,2	60,5	4,86	4,81	3,96	3,87	3,59		3,83	3,94
Ramificada em O-6[a]	99,0	78,1	70,5	76,6	73,7	68,0	-	-	-	-	-		-	-
→4)-β-D-Man*p*-(1→														
Ramificada em O-6[b]	100,1	70,0	71,5	76,5	75,0	60,6	-	-	-	-	-		-	-
Ramificada em O-6[b]	100,1	70,0	71,5	76,5	73,6	68,3	-	-	-	-	-		-	-
β-D-Xil*p*-(1→ [a,b]	103,4	72,8	75,8	69,3	65,2	-	4,45	3,37	3,89	3,66	3,37	4,00	-	-
β-D-Man*p*-(1→ [a,b]	-	-	-	66,8	-	61,0	-	-	-	-	-		-	-

[a] Polissacarídeo Nativo [b] Polissacarídeo Dessulfatado

A configuração anomérica das unidades de manose foi determinada pelo experimento de RMN DE C^{13} acoplado, onde se observou uma constante de acoplamento ($J_{C-1, H-1}$) de 161 Hz, correspondente ao padrão de ligação do tipo β- entre as unidades de manose (ISHRUD et al., 2001).

A análise de RMN ^{13}C permitiu também identificar o sinal localizado em campo mais baixo do espectro (103,4 ppm) o qual foi atribuído ao C-1 de unidades de xilopiranose.

Os demais sinais, referentes às unidades de xilose, foram assinalados em 72,8, 75,8, 69,3 e 65,2 e atribuídos aos C-2, C-3, C-4 e C-5, respectivamente (KOVAC e HIRSCH, 1980; KOLENDER et al. 1995), (TABELA 6).

Análises de RMN de H^1 também foram realizadas, sendo que os espectros obtidos para as frações P2d e P2e, de forma semelhante ao observado para os espectros de ^{13}C, se mostraram muito similares a FIGURA 10, que ilustra o espectro da fração P2d.

Na região anomérica do espectro de H^1, os sinais em 4,86 e 4,81 ppm (TABELA 6) foram atribuídos aos prótons anoméricos H-1 e H-2 das unidades de β-D-manopiranose 4-*O*-ligadas, respectivamente (RAMESH et al. 2001).

Uma vez identificado o próton anomérico das unidades constituintes da cadeia principal das xilomananas a fração P2d foi submetida à análise bidimensional de RMN HMQC, visando por este método identificar os sinais referentes aos demais prótons de cada unidade monossacarídica.

No espectro obtido para a fração P2d foram observadas 7 correlações C^{13}/H^1 mais intensas e, a partir dos deslocamentos já conhecidos de cada carbono constituinte, foi possível identificar o seu próton correspondente (H-2, H-3, H-4, H-5, H-6a e H-6b - FIGURA 10).

O sinal anomérico de C^{13} localizado em 99,0 ppm, apresentou correlação com o sinal anomérico de H^1, localizado em 4,86 (FIGURA 11, TABELA 6).

Os sinais em 78,1, 70,5, 76,6 e 75,2 ppm, por sua vez correlacionaram-se com os sinais em 4,81, 3,96, 3,87, 3,59 e 3,47 ppm, respectivamente (FIGURA 11). O assinalamento correspondente ao C-6 das unidades de manose (60,8 ppm) correlacionou-se com os sinais em 3,94 e 3,83, mostrando

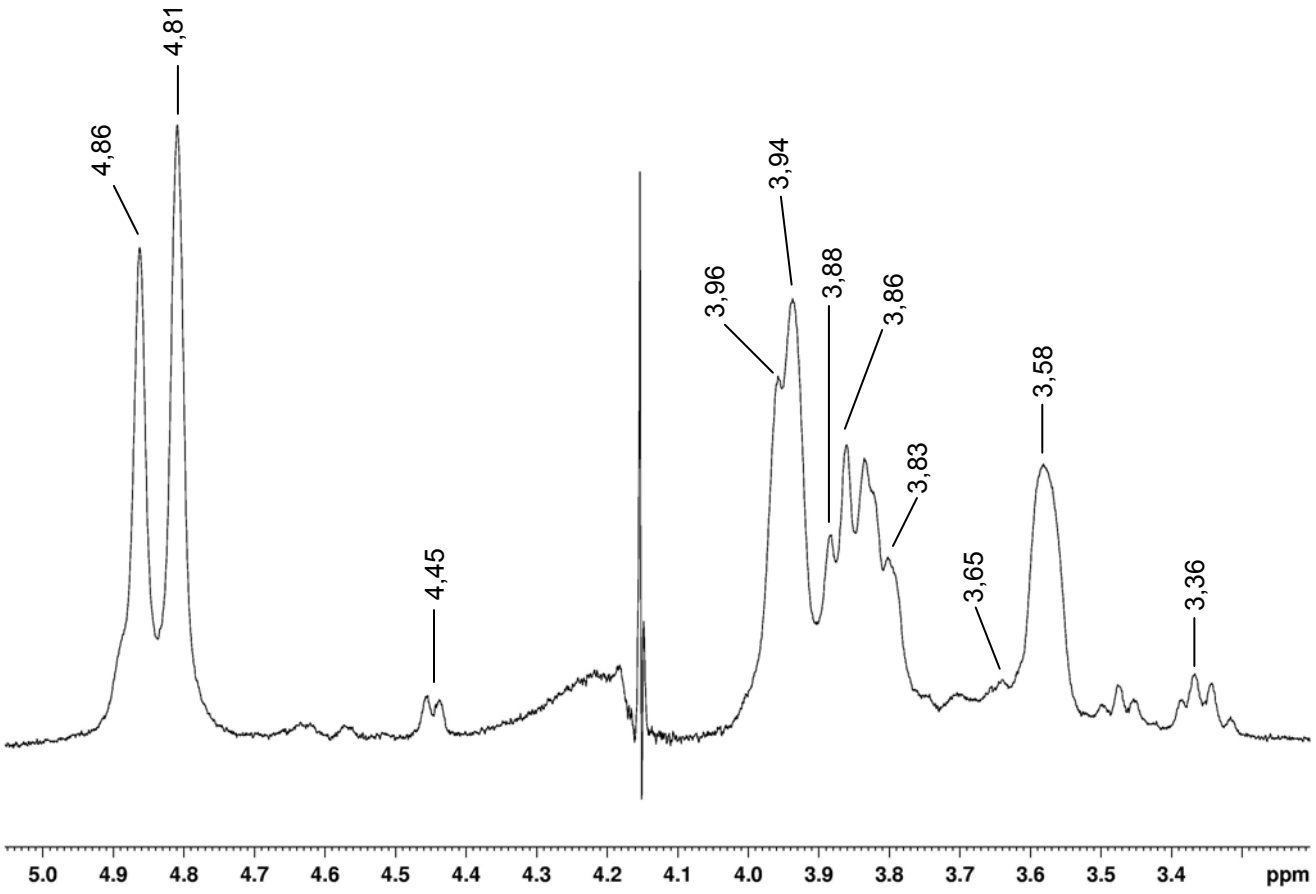
que estes sinais eram referentes aos H-6 equatorial e axial das unidades de β-D-manopiranose (TABELA 6).

O sinal em 103,3 ppm correlacionou-se com o sinal em 4,45 ppm (FIGURA 11) permitindo assim assinalar este sinal de H-1 como o pertencente às unidades de β-D-xilopiranose glicosilando as unidades de manose em C-6. Os sinais em 72,8, 75,8, 69,3 e 65,2 ppm correlacionaram-se com os sinais em 3,37, 3,89, 3,66, 3,37 e 4,00 ppm, os quais foram atribuídos aos H-2, H-3, H-4 e H-5a e H-5b, respectivamente, das unidades de β-D-xilopiranose (TABELA 6) (HÖIJE et al., 2006).

O duplete, centrado em 4,45 ppm (FIGURA 10), permitiu também determinar o valor da constante de acoplamento para o H-1 das unidades de xilopiranose ramificadoras da cadeia principal de manose (TABELA 6). Este foi de 7,2 Hz confirmando que as unidades de xilopiranose constituintes destes polissacarídeos se encontravam como seus anômeros β, uma vez que a configuração α apresenta uma constante em torno de 3,6 Hz (NERINCKX et al., 2004).

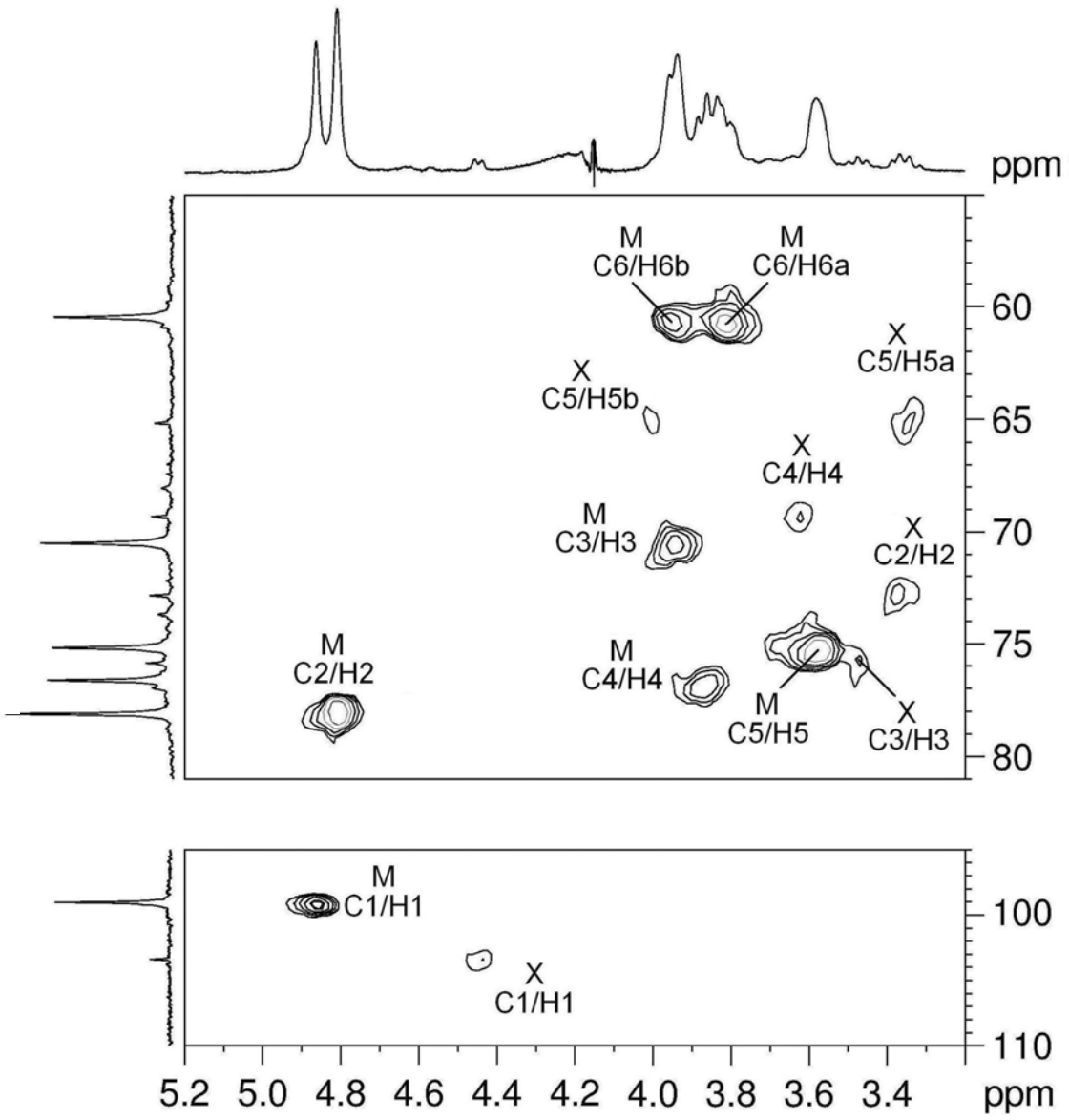
Desta maneira estabeleceu-se o assinalamento completo de próton para a fração P2d, a qual foi utilizada como base para o completo assinalamento das demais frações precipitadas com KCl (TABELA 6).

FIGURA 10 - ESPECTRO DE RMN DE ^{1}H DA XILOMANANA P2d ISOLADA DE *C. papillosus*.



Análise realizada a 70°C em D_2O, calibração com acetona como padrão interno (2,224 ppm). Concentração da amostra 40 mg/ml.

FIGURA 11 - ESPECTRO DE CORRELAÇÃO HMQC ($^{1}H/^{13}C$) DA XILOMANANA P2d.



Correspondentes as correlações C^{13}/H^{1} das unidades; os números correspondem aos carbonos e prótons identificados; M = manopiranose; X = xilopiranose.
Experimento realizado a 50 °C, com os polissacarídeos dissolvidos em D_2O, calibração com acetona como padrão interno (^{13}C em 30,2 e ^{1}H em 2,224 ppm).

As frações dessulfatadas foram submetidas à análise de RMN de C^{13} (FIGURA 8 e 9), gerando espectros distintos daqueles obtidos para as frações nativas.

Nas frações dessulfatadas o sinal em 100,1 ppm e o sinal em 70,0 ppm (TABELA 6) foram atribuídos ao C-1 e C-2 das unidades de manose que foram dessulfatas durante o processo solvolítico, respectivamente. Neste espectro estavam presentes também os sinais em 70,5, 76,6, 75,2 e 60,5 ppm (FIGURAS 8 e 9) referentes aos carbonos 3, 4, 5 e 6 das unidades de β-D-manopiranose, respectivamente.

Ainda no espectro das frações P2d-D e P2e-D, cinco sinais em 103,3, 72,9, 75,7, 69,3 e 65,2 ppm os quais foram atribuídos aos C-1, C-2, C-3, C-4 e C-5 das unidades de β-D-xilopiranose, respectivamente (TABELA 6), como terminais não redutores (USOV et al., 1997).

O espectro da fração P2e-D apresenta dois sinais em 99,0 e 78,1 ppm referente ao C-1 e C-2 das unidades de manose que não foram totalmente dessulfatas durante o processo solvolítico (FIGURA 9, TABELA 6).

Pode-se ainda confirmar a ramificação nas unidades de manose pelas unidades simples de xilose pelos assinalamentos em 66,8 e 73,6 ppm, referentes ao C-6 ramificado e C-5 das unidades de β-D-manopiranose, respectivamente.

Desta maneira, as xilomananas constituintes das frações nativas e dessulfatadas de P2d e P2e originaram assinalamentos obtidos pelas análises de RMN que confirmaram os resultados sugeridos pela análise dos derivados parcialmente metilados apresentados anteriormente (Tabelas 5).

4.3. PRECIPITAÇÃO FRACIONADA DAS XILOMANANAS DE *Chondrophycus flagelliferus*, UTILIZANDO KCl.

Com a finalidade de fracionar os polissacarídeos presentes na fração F2 de *C. flagelliferus*, foi realizado um tratamento com solução de cloreto de potássio de forma idêntica ao realizado para a fração P2.

Para a fração F2, diferentemente do notado para a fração P2, foi observado precipitação nas faixas de concentração de 0,25 – 1,0 M de KCl

sendo que nas concentrações de 1,5 e 2M de KCl não foram observados precipitados. O precipitado obtido após cada adição de KCl foi dialisado exaustivamente contra água destilada sendo as frações então congeladas e liofilizadas.

Após o tratamento da fração F2 foram obtidas as subfrações precipitadas F2a, F2b, F2c e F2d.

O extrato FH (0,25% m/v), obtido a partir de uma amostra de algas coletada na Praia de Bombinhas, litoral de Santa Catarina, previamente submetido à verificação cuidadosa a fim de evitar contaminação com epífitas e endófitas foi tratado diretamente com KCl 2 M gerando as frações precipitadas (FH-p) e solúvel (FH-S).

Na TABELA 7 estão demonstradas as faixas de fracionamento, rendimentos, rotação óptica específica, carboidratos e teores de grupos sulfato, das subfrações obtidas da alga *C. flagelliferus* após este fracionamento.

De acordo com a TABELA 7, 76,3% da fração polissacarídica F2 e 72,0% da fração FH, permaneceram solúveis em KCl 2M, sendo denominadas de F2S e FH-S, respectivamente. Os polissacarídeos restantes constituíram as frações precipitadas F2a – F2d (24%) e FH-p (28,0%). A fração F2S, de maior rendimento, apresentou valores correspondentes ao teor de sulfato (19,3%) e carboidratos (56,8%) semelhantes aos da fração F2 (20,2 e 58,3%, respectivamente) variando significativamente apenas em relação à rotação óptica específica (-17,3 para F2 e -28,7 para F2S).

Como pode ser observado, a fração precipitada na concentração de 0,25M de KCl (F2a) apresentou o maior rendimento (16,7%) seguido da fração precipitada com 0,5M de KCl (F2b, 3,8%). As demais frações apresentaram rendimentos intermediários (1,6 e 1,2%).

A determinação do teor de grupos sulfato presentes nas frações precipitadas com KCl mostrou que todas as frações (F2a – F2d) são ricamente sulfatadas (12,9 – 24,5%).

TABELA 7. RENDIMENTO, ANÁLISE QUÍMICA E ROTAÇÃO ÓPTICA DAS SUBFRAÇÕES NATIVAS (F2a, F2b, F2-S, FH-p, FH-S), DESSULFATADAS (F2a-D, F2b-D) e DO PRODUTO DE DEGRADAÇÃO DE SMITH (F2a-sm) OBTIDAS APÓS TRATAMENTO DE F2 e FH COM KCl.

Fração[a]	Faixa de Fracionamento (M) KCl	Rendimento (%)	$[\alpha]_D$ (°)	Carboidrato (%)	Sulfato (SO_3Na) (%)
F2	-	10,5 [b]	-31,0	62,3	20,2
F2a	0,25	16,7 [c]	-26,6	57,0	24,5
F2a-D	-	52,0	n.d.	n.d.	2,9
F2a-sm	-	70,0	n.d.	n.d.	n.d.
F2b	0,5	4,2 [c]	- 31,5	59,2	24,0
F2b-D	-	71,7	n.d.	n.d.	-
F2c	0,75	1,6 [c]	-27,7	63,4	13,4
F2d	1,0	1,2 [c]	-29,4	61,6	12,9
F2-S	Solúvel 2,0	76,3 [c]	-28,7	56,8	19,3
FH	-	15,0 [b]	-18,0	59,0	22,2
FH-p	2,0	28,0	-30,5	57,0	24,1
FH-S	Solúvel 2,0	72,0 [c]	-29,0	60,0	27,2

n.d. não determinado.

[a] Frações definidas no texto.

[b] Porcentagem baseada na alga seca e moída.

[c] Porcentagem baseada no total de material recuperado após fracionamento com KCl. Rendimento do fracionamento de 88,6 e 93,0% para F2 e FH, respectivamente.

Para a determinação da composição monossacarídicas as frações foram submetidas ao processo de hidrólise do tipo redutiva de acordo com o método de STEVENSON e FURNEAUX (1991), modificada por FALSHAW e FURNEAUX (1994) e adaptado por JOL et al. (1999) a qual se processa em duas etapas. Na primeira etapa ocorre a liberação e a concomitante redução das unidades de 3,6-anidrogalactose e, na segunda etapa, ocorre a hidrólise e a redução das demais unidades monossacarídicas. Após a análise de composição monossacarídica dos hidrolisados na forma de alditois acetatos

por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-MS) revelou que unidades monossacarídicas de xilose, galactose e manose estão presentes em todas as frações sulfatadas (TABELA 7) de *C. flagelliferus* obtidas após precipitação com KCl.

As frações que apresentaram apenas manose e xilose foram, seqüencialmente, submetidas à hidrólise ácida total com ácido trifluoracético (TFA) conforme descrito em Material e Métodos. As frações F2a e F2b mostraram-se compostas unicamente por unidades de manose (90,7 e 85,0%, respectivamente) e xilose (9,7 e 15,0%, respectivamente) enquanto F2c e F2d apresentaram galactose como constituinte principal (58,4 e 54,6%, respectivamente) além de manose (8,1 e 26,2%, respectivamente), xilose (5,9 e 10%, respectivamente), 3,6-anidrogalactose (14,4 e 5,3%, respectivamente), 6-*O*-metil galactose (7,6 e 11,3%, respectivamente) e baixos teores de 2-O-metil 3,6-anidrogalactose, indicando a presença de carragenanas sulfatadas nestas frações (TABELA 8).

Desta maneira, pode-se sugerir que, diferentemente das frações obtidas de *C. papillosus*, as frações originadas a partir de F2 por precipitação com 0,25 e 0,5M de KCl (F2a e F2b, respectivamente) são constituídas por xilomananas sulfatadas e as frações precipitadas com 0,75 e 1,0M de KCl por xilogalactomananas sulfatadas.

A fração obtida a partir da precipitação de FH com KCl (FH-p) mostrou-se constituída principalmente por manose (68,2 mol%) e xilose (15,5 mol%) juntamente com quantidades menores de outros monossacarídeos.

Por outro lado, todas as frações solúveis em KCl (F2-S, P2-S e FH-S) mostraram uma composição monossacarídica diferente em relação às frações precipitadas, com galactose e seus derivados como componentes majoritários. A presença destes açúcares, juntamente com as rotações ópticas negativas (Tabela 7 e 8) e os dados de RMN (mostrados posteriormente) determinados para as frações solúveis em KCl, indica que estes polissacarídeos possuem estruturas do tipo agarana como constituinte principal.

Portanto, o tratamento com KCl dos extratos brutos gerou três tipos principais de frações: uma constituída exclusivamente por manose e xilose, uma segunda indicativa de uma estrutura semelhante à agarana e uma

terceira, com características intermediárias entre as duas anteriores. Esta última fração pode ter resultado da co-precipitação das agaranas, como o observado no fracionamento das xilomananas e agaranas desenvolvido com os polissacarídeos solúveis em água obtidos de *Nothogenia fastigiata* (KOLENDER et al, 1997).

TABELA 8. COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS SUBFRAÇÕES OBTIDAS DE *C. flagelliferus*

Fração[a]	Composição monossacarídica (mol %) [b]						
	Xil[b]	Man[b]	Gal[b]	3,6-AnGal[b]	6Me-Gal[b]	2Me-AnGal[b]	2Me-Gal[b]
F2 [c,d]	7,4	23,1	49,5	11,1	7,6	1,3	t.r.
F2a [e]	9,3	90,7	-	-	-	-	-
F2a-D [e]	10,0	90,0	-	-	-	-	-
F2a-sm [e]	-	100,0	-	-	-	-	-
F2a-sm-D [e]		100,0	-	-	-	-	-
F2b [e]	15,0	85,0	-	-	-	-	-
F2b-D [e]	15,0	85,0	-	-	-	-	-
F2c [c]	5,9	58,4	8,1	14,4	10,9	2,3	-
F2d [c]	10,0	54,6	26,2	5,3	3,9	-	-
F2-S [c,d]	5,7	4,1	66,8	10,8	11,3	1,3	t.r.
FH [c,d]	10,0	26,0	40,0	12,0	9,0	1,0	2,0
FH-p [c]	15,5	68,2	10,5	3,5	2,5	-	-
FH-S [c,d]	5,0	5,6	64,0	8,6	14,8	t.r.	2,0

(-) não detectado.

t.r. Porcentagem menor que 1,0% é considerada como traço

[a] Frações definidas no texto.

[b] Xil corresponde a xilose, Man a manose, Gal a galactose, 3,6-AnGal a 3,6-anidrogalactose, 6Me-Gal a 6-*O*-metilgalactose e 2Me-AnGal a 3,6-anidro 2-*O*-metilgalactose.

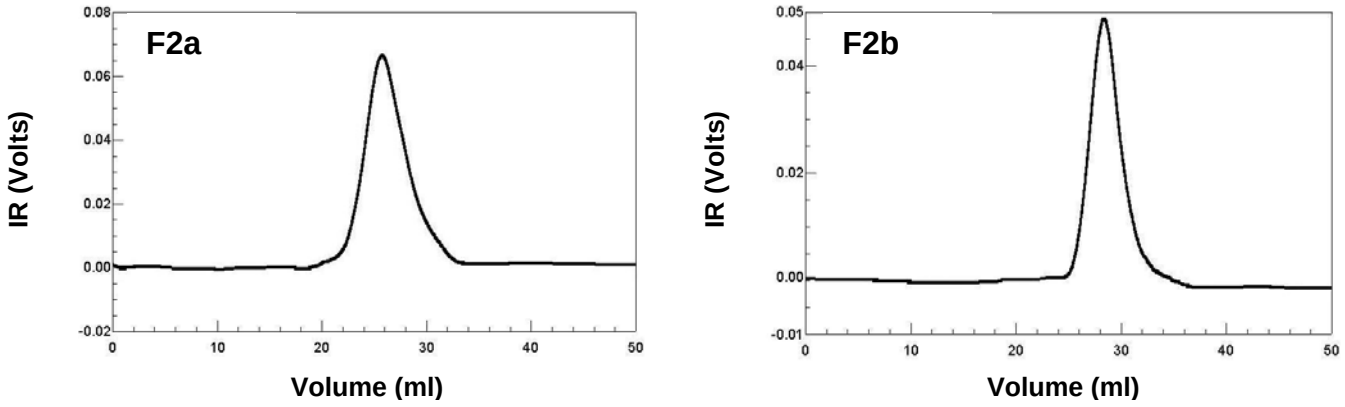
[c] Analise de composição determinada após hidrólise redutiva.

[d] Normalizado para excluir a glucose, 3-5%.

[e] Analise de composição determinada após hidrólise com TFA 1 M por 4 h a 100 ^{o}C

Análises mediante cromatografia de exclusão estérica acoplada a detectores de espalhamento de luz e índice de refração (HPSEC-MALLS) das subfrações precipitadas com KCl F2a e F2b de massa molecular 180 KDa (Dn/Dc 0,157 ml/g) e 220 KDa (Dn/Dc 0,131 ml/g), respectivamente, confirmaram a homogeneidade das mesmas (FIGURA 12).

FIGURA 12 - CROMATOGRAMA DE HPSEC DAS XILOMANANAS F2a e F2b



* experimento realizado com os polissacarídeos dissolvidos em solução $NaNO_3$ 0,1 M contendo NaN_3 200 ppm.
IR = Índice de Refração

As frações F2a e F2b nativas foram submetidas à análise de metilação (CIUCANU e KEREK, 1984; STEVENSON e FURNEAUX, 1991).

Entre os derivados obtidos a partir da fração F2a e F2b, os mais abundantes foram 3,6-di-*O*-metil manose (72,6 e 64,7%), 3-*O*-metil manose (13,9 e 15,1%), 3,4,6-tri-*O*-metil manose (5,0 e 5,8%) e 2,3,4-tri-*O*-metil xilose (6,5 e 11,5%) - TABELA 9.

Estes resultados sugeriram as mesmas correlações estruturais observadas para as frações P2d e P2e onde o derivado majoritário 3,6-di-*O*-metil manose se originou a partir das unidades de manose constituintes da cadeia principal substituídas em carbonos 2 e 4 enquanto o derivado 3-*O*-metil manose originou-se das unidades de manose, também presentes na cadeia principal, substituídas em carbonos 2, 4 e 6.

O terceiro derivado de maior porcentagem detectado, 3,4,6-tri-*O*-metil manose sugere que unidades simples de manose sulfatadas em C-2 estejam presentes como unidades simples glicosilando a cadeia principal de manose 4-*O*-ligada em C-6 de forma semelhante ao que ocorre com as unidades de xilose. Estas unidades foram atribuídas também aos terminais não redutores da cadeia principal, também substituídos em C-2 por grupos sulfato.

A pequena porcentagem do derivado 2,3,6-tri-*O*-metil manose presente nas frações F2a e F2b (2,0 e 2,9 mol%, respectivamente) deve-se à presença de unidades de manopiranose 4-*O*-ligadas não sulfatadas.

O derivado 2,3,4-tri-*O*-metil xilose se originou a partir das unidades de xilose presentes no polissacarídeo nativo como terminais não redutores (não substituídas).

Novamente, a relação de proximidade entre as quantidades observadas dos derivados parcialmente metilados de F2a e F2b 3-*O*-metil manose (13,9 e 15,1 mol%, respectivamente) e somatório dos derivados 2,3,4-tri-*O*-metil xilose (6,5 e 11,5 mol%, respectivamente) e 3,4,6-tri-*O*-metil manose (5,0 e 5,8 mol%, respectivamente) novamente sugere fortemente que não somente unidades terminais de xilose mas também unidades de manose 2-sulfatada glicosilam a cadeia principal através do carbono 6 das unidades de manose 2-*O*-substituídas (TABELA 9).

Não foram observados derivados parcialmente metilados que indicassem a presença de unidades de manopiranose, constituintes da cadeia principal das frações nativas, não substituídas em C-2.

TABELA 9. ANÁLISE DE METILAÇÃO DAS XILOMANANAS NATIVAS (F2a, F2b), DESSULFATADAS (F2a-D, F2b-D) E APÓS DEGRADAÇÃO DE SMITH (F2a-sm, F2a-sm-D)

Fração [a]	Derivado parcialmente metilado [b]						
	3,6-Man [c]	2,3,6-Man	3-Man [d]	2,3-Man	3,4,6-Man	2,3,4,6-Man	2,3,4-Xil
F2a	72,6	2,0	13,9	-	5,0	-	6,5
F2a-D	6,5	69,9	-	13,5	-	4,0	6,2
F2a-sm	98,0	2,0	-	-	-	-	-
F2a-sm-D	-	100,0	-	-	-	-	-
F2b	64,7	2,9	15,1	-	5,8	-	11,5
F2b-D	-	62,9	-	20,0	-	5,9	11,2

[a] Frações são definidas no texto .

[b] Mol % dos monossacarídeos parcialmente metilados nas posições indicadas.

[c] 3,6-Man analisado como 1,2,4,5-tri-*O*-acetil-3,6-di-*O*-metilmanitol, etc.

[d] Determinada após hidrólise ácida, redução com $NaBD_4$, acetilação e análise por CG-EM (*m/z* 130, 159, 190 e 219).

Para confirmar o padrão de sulfatação sugerido para F2a e F2b, estas foram submetidas ao processo de dessulfatação (NAGASAWA et al., 1979).

Para tanto, as frações F2a e F2b foram submetidas a tratamento solvolítico seguindo a mesma metodologia aplicada para P2d e P2e gerando as frações denominadas F2a-D e F2b-D, obtidas com 52 e 71,7% de rendimento, respectivamente. Quando comparadas às frações nativas F2a e F2b apresentaram uma redução de 88,2 e 100% no teor de sulfatação, respectivamente.

A composição monossacarídica apresentada por estas frações também foi determinada (TABELA 8) não sendo verificada modificação suas respectivas composições monossacarídica após o tratamento solvolítico.

Entre os derivados obtidos a partir das frações F2a-D e F2b-D, os mais abundantes foram 2,3,6-tri-*O*-metil manose (69,9 e 62,9%), 2,3,4,6-tetra-*O*-metil manose (4,0 e 5,9%), 2,3-di-*O*-metil manose (13,5 e 20,0%) e 2,3,4-tri-*O*-metil xilose (6,2 e 11,2%), - TABELA 9.

O derivado majoritário 2,3,6-tri-*O*-metil manose se originou a partir do derivado 3,6-di-*O*-metil manose após remoção dos grupos sulfato em C-2 pelo tratamento solvolítico (Tabela 9). Nota-se, pela análise de metilação das frações dessulfatadas, que o processo solvolítico foi menos eficiente na fração F2a, tendo-se em vista a presença ainda de 6,5% de unidades de 3,6-di-*O*-metil manose mesmo após a dessulfatação química desta molécula.

De forma semelhante, o derivado 2,3-di-*O*-metil manose (13,5 mol% para F2a-D e 20,0 mol% para F2b-D) originou-se das unidades de 3-*O*-metil manose. O derivado 2,3,4,6-tetra-*O*-metil manose (TABELA 9), originado a partir do derivado 3,4,6-tri-*O*-metil manose presente nas frações nativas (F2a e F2b), pôde ser atribuído as unidades simples que glicosilam a cadeia principal de manose 4-*O*-ligada em C-6, depois de retirada dos grupos sulfato em C-2 pelo tratamento solvolítico. Estas unidades foram atribuídas também aos terminais não redutores da cadeia principal, após remoção química dos grupos sulfato presentes no carbono 2.

O derivado 2,3,4-tri-*O*-metil xilose das frações F2a-D e F2b-D apresenta valores próximos (6,2 e 11,2 mol%, respectivamente) aos das frações nativas

correspondendo a unidades simples não redutoras e não substituídas que glicosilam a cadeia principal em C-6 das unidades de manose.

Por fim, a identificação dos elevados teores do derivado 3,6-di-*O*-metil manose na fração nativa, e do derivado 2,3,6-tri-*O*-metil manose na fração dessulfatada, indicam a presença de uma cadeia principal formada principalmente por unidades de manopiranose 4-*O*-ligada. Além disto, pode-se afirmar que a análise dos derivados parcialmente metilados obtidos das frações F2a-D e F2b-D (dessulfatadas), quando comparadas com as frações nativas F2a e F2b, indicam um padrão de substituição das unidades de manopiranose, tanto da cadeia principal quanto das unidades simples ramificadoras em C-6, por grupos sulfato em carbono 2.

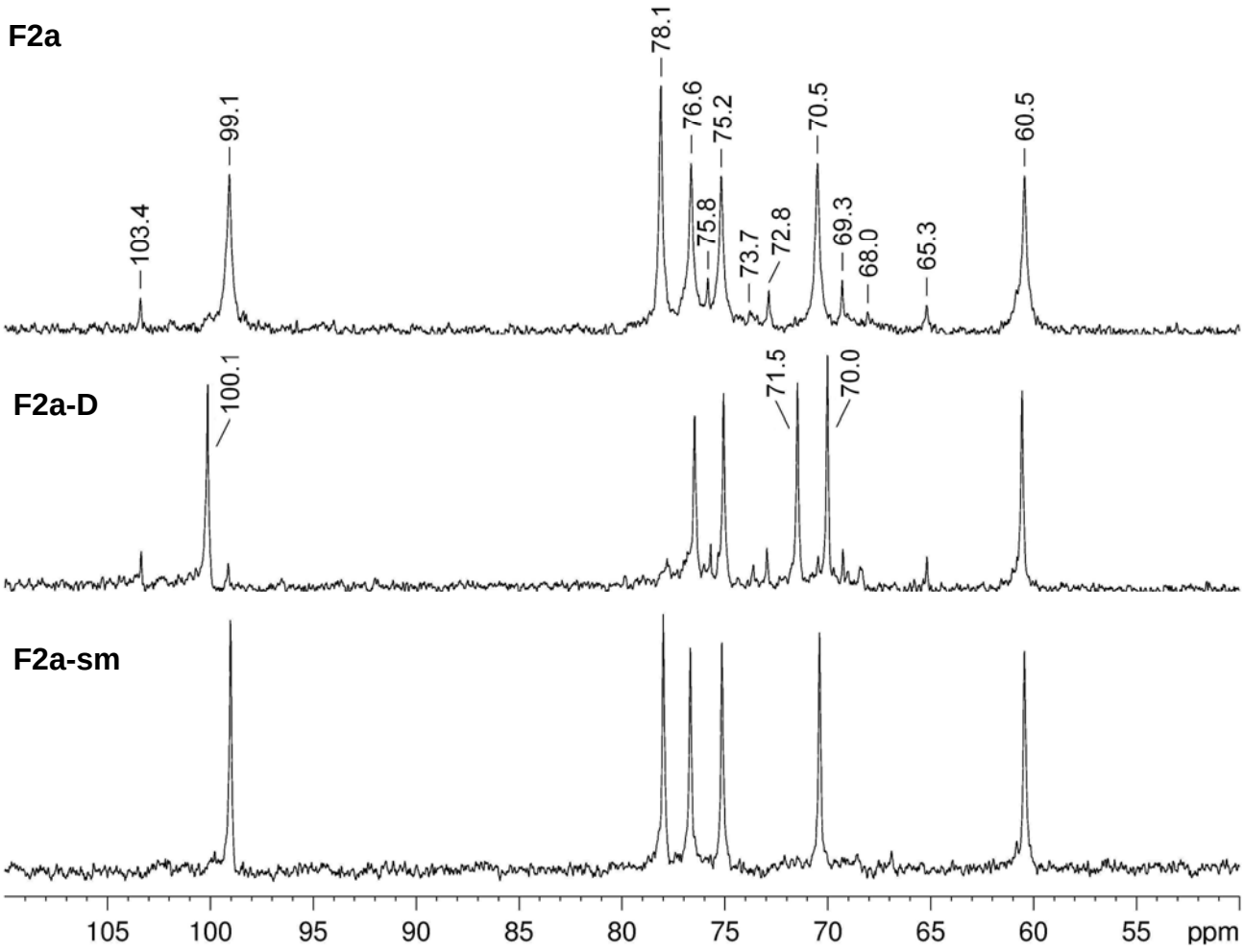
Quando submetidas à análise de ressonância magnética nuclear de C^{13} observa-se na região anomérica do espectro das frações F2a e F2a-D (FIGURA 13) e F2b e F2b-D (FIGURA 14) dois sinais em 99,0 e 103,4 ppm atribuídos ao C-1 das unidades de D-manopiranose quando esterificadas em carbono 2 por grupos sulfato e β-D-xilopiranose, respectivamente (KOLENDER et al., 1995; USOV et al., 1997; FALSHAW et al., 1998; HÖIJE et al., 2006).

Observam-se também sinais em 78,1, 70,5, 76,6, 75,2 e 60,5 ppm atribuídos aos C-2 – C6 das unidades de manopiranose sulfatadas em C-2, respectivamente (TABELA 5), assim como sinais em 72,8, 75,8, 69,3 e 65,2 ppm atribuídos aos C-2 – C-6 das unidades de xilopiranose, respectivamente (TABELA 5) (HÖIJE et al., 2006).

Estes resultados indicam que P2d, P2e, F2a e F2b têm grandes similaridades estruturais, sendo os sinais presentes nestas frações assinalados de forma idêntica aos presentes em P2d e P2e (TABELA 6).

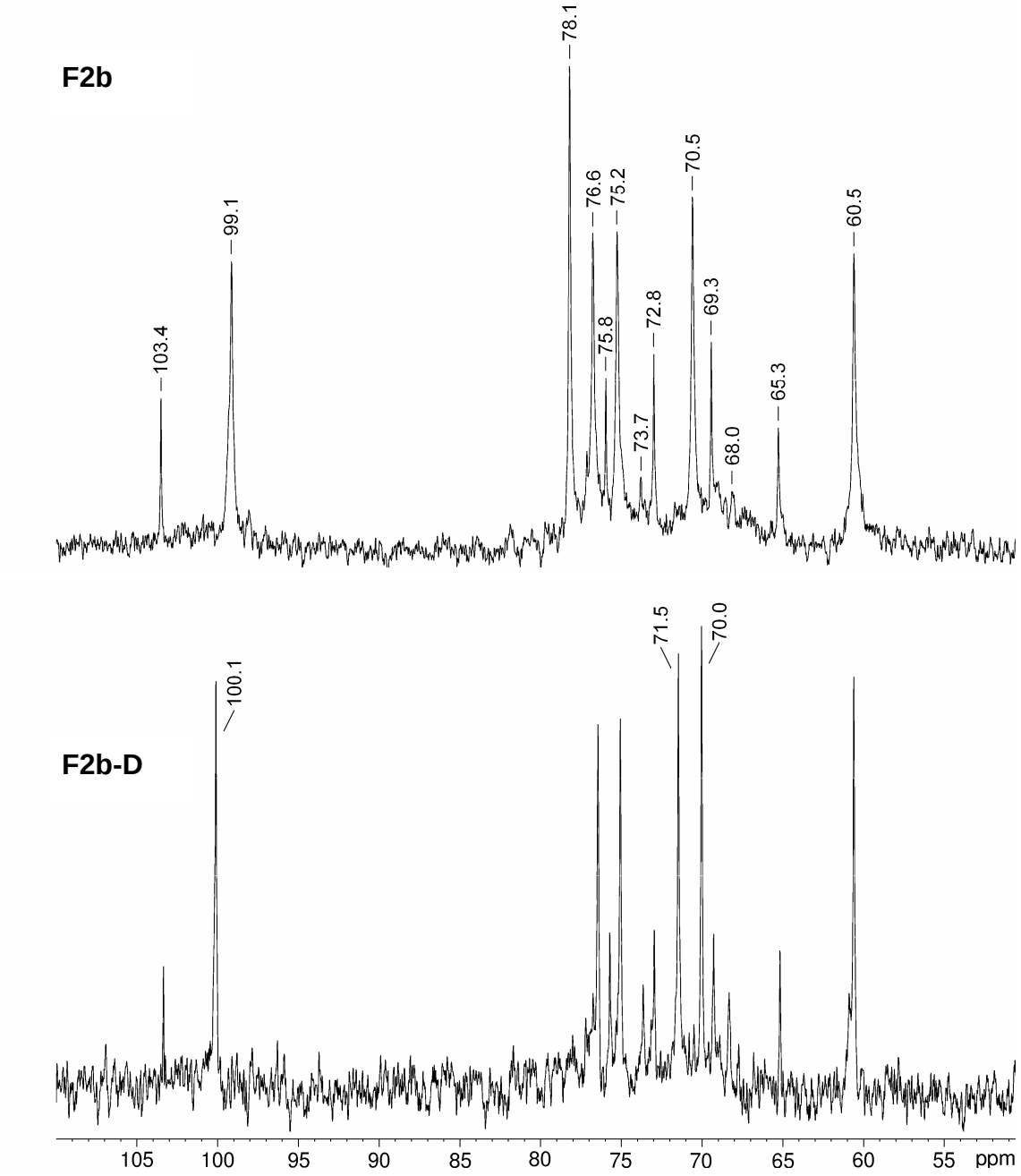
Também não foram identificados nestes espectros quaisquer sinais passíveis de atribuição a unidades de galactose, confirmando a análise por CG-EM (TABELA 8).

FIGURA 13. ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DA XILOMANANA NATIVA (F2a), DESSULFATADA (F2a-D) e APÓS DEGRADAÇÃO DE SMITH (F2a-sm) DE *C. flagelliferus*



Análise realizada a 70°C em D_2O, calibração com acetona como padrão interno (30,2 ppm).
Concentração da amostra 40 mg/ml.

FIGURA 14. ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DAS XILOMANANAS F2b e F2b-D OBTIDAS DE *C. flagelliferus*



Análise realizada a 70°C em D_2O, calibração com acetona como padrão interno (30,2 ppm). Concentração da amostra 40 mg/ml.

As frações dessulfatadas foram também submetidas à análise de RMN de ^{13}C (FIGURA 13 e 14), gerando espectros distintos daqueles obtidos para as frações nativas.

Nestas frações dessulfatadas os sinais anoméricos mostraram-se novamente deslocados para 100,1 ppm e C-2 para 70,0 ppm (TABELA 6). Neste espectro estavam presentes também os sinais em 71,5, 76,5, 75,0 e 60,6 ppm (FIGURAS 13 e 14) referentes aos carbonos 3, 4, 5 e 6 das unidades de α-D-manopiranose, respectivamente. Foram observados também todos os sinais das unidades de xilopiranose em 103,3, 72,9, 75,7, 69,3 e 65,2 ppm atribuídos a C-1 (glicosilação), C-2, C-3, C-4 (livres) e C-5, respectivamente (TABELA 6).

Pode-se notar no espectro referente à fração F2a-D a presença de dois sinais de menor intensidade em 99,0 e 78,1 ppm referentes às unidades de manose que não foram totalmente dessulfatas durante o processo solvolítico (FIGURA 13), semelhantemente ao observado para a fração P2d-D.

Uma vez estabelecido o padrão de sulfatação das xilomananas constituintes das frações, partiu-se para a confirmação da estrutura da cadeia principal e confirmação do padrão de glicosilação destes polissacarídeos pelas unidades de manose 2-sulfato e/ou xilose.

Para tanto a fração F2a foi submetida à degradação controlada de Smith, sob condições específicas para polissacarídeos sulfatados como estabelecido por FURNEAUX; STEVENSON (1991). Assim a fração polissacarídica foi solubilizada em água destilada contendo metaperiodato de sódio e após ser mantida em ambiente escuro sob temperatura ambiente durante 48 horas, redução, diálise e liofilização, rendeu a fração degradada denominada F2a-sm, obtida com 70% de rendimento (TABELA 7).

A análise de composição monossacarídica da fração F2a-sm demonstra que as cadeias laterais de xilose estão presentes como unidades simples não redutoras, uma vez que o polissacarídeo degradado apresentou-se composto exclusivamente por unidades de manose (TABELA 8).

Para se obter a cadeia principal linear e neutra do polissacarídeo nativo, parte da fração F2a-sm foi submetida à dessulfatação solvolítica, seguindo a mesma metodologia descrita anteriormente (NAGASAWA, 1979). Como

esperado, tal fração mostrou-se composta unicamente por unidades de manose.

As frações resultantes da degradação parcial de Smith F2a-sm e F2-sm-D (dessulfatada) foram também submetidas à análise de metilação, seguindo a mesma metodologia descrita para as frações nativas. Os polissacarídeos presentes nestas frações deram origem aos derivados parcialmente metilados mostrados na TABELA 9.

Nenhum derivado referente a pentoses foi encontrado no produto de hidrólise destas frações (TABELA 9). Para a fração F2a-sm foi observado majoritariamente o derivado parcialmente metilado 3,6-di-*O*-metil manose (98 mol%). Para a fração F2a-sm-D foi observado apenas o derivado parcialmente metilado 2,3,6-di-*O*-metil manose.

Esta alteração nos derivados parcialmente metilados foi resultado do processo solvolítico ao qual a fração F2a-sm-D foi submetida, resultando na remoção total dos grupos sulfato presentes em C-2, gerando desta forma um polímero neutro.

A presença unicamente destes derivados confirmou a natureza da cadeia principal da xilomanana presente na fração F2a como uma manana 4-*O*-ligada, com sulfatação em carbono 2 tendo como ponto de ramificação o carbono 6 das unidades de manose pertencentes cadeia principal.

A fração F2a-sm foi então submetida à análise de RMN de ^{13}C. Este espectro apresentou na região anomérica somente um sinal em 99,0 ppm (FIGURA 14) atribuído ao C-1 de unidades de β-D-manopiranose 2-sulfato.

Diferentemente da fração F2a e como resultado da degradação controlada de Smith, em F2a-sm não estava presente o sinal referente ao C-1 das unidades de β-D-xilopiranose (103,3 ppm) (FIGURA 13). Da mesma forma, os sinais em 68,0 e 73,8 ppm, referentes ao C-6 e C-5 ramificados da cadeia principal de β-D-manopiranose, observados na fração nativa (F2a) não se mostravam presentes na fração F2a-sm (FIGURA 13). O desaparecimento destes sinais, no espectro da fração contendo o polissacarídeo degradado, evidenciou de forma indireta que as unidades β-D-xilopiranose e de β-D-manopiranose 2-sulfato estavam substituindo a cadeia principal mediante a

glicosilação do carbono 6 de algumas unidades de β-D-manopiranose, como indicaram as análises de metilação (TABELA 9).

O intenso sinal em 78,0 ppm, referente ao C-2 substituído por grupos sulfato, confirmou que a cadeia principal deste polissacarídeo não sofreu dessulfatação significativa.

Ainda no espectro desta fração estavam presentes os sinais em 70,4, 76,6, 75,1 e 60,4 ppm correspondentes aos carbonos 3, 4, 5 e 6, respectivamente, da cadeia de β-D-manopiranose 2-sulfato (TABELA 6).

A fração FH-S também foi submetida à análise de RMN de ^{13}C gerando o espectro ilustrado na FIGURA 15. As frações solúveis em KCl (F2-S, P2-S e FH-S) forneceram espectros de RMN de ^{13}C similares entre si, além de uma complexa região anomérica contendo no mínimo 9 sinais.

O sinal em 100,6 ppm foi atribuído, ao menos em parte, ao C-1 das unidades de β-D-galactopiranose 2-sulfato ligada a 3,6-anidro-α-L-galactose (C-1 em 98,1 ppm). O sinal de intensidade intermediária em 25,1 ppm juntamente com outro próximo a 175,8 ppm foram atribuídos aos grupos metil e carboxil do substituinte acetal de ácido pirúvico presente na forma R (GAREGG et al., 1979).

Estes dados espectroscópicos, juntamente com a composição monossacarídica e a rotação óptica negativa são indicativos da presença de agaranas piruvatadas como os principais polissacarídeos presentes no extrato aquoso. Estes dados estão em acordo com a característica agarófita das espécies pertencentes ao complexo *Laurencia* (gênero *Laurencia, Chondrophycus* e *Osmundea*) (NAM, 1999), como descrito por vários autores (USOV et al., 1989; USOV & ELASHVILI, 1991; VALIENTE et al., 1993).

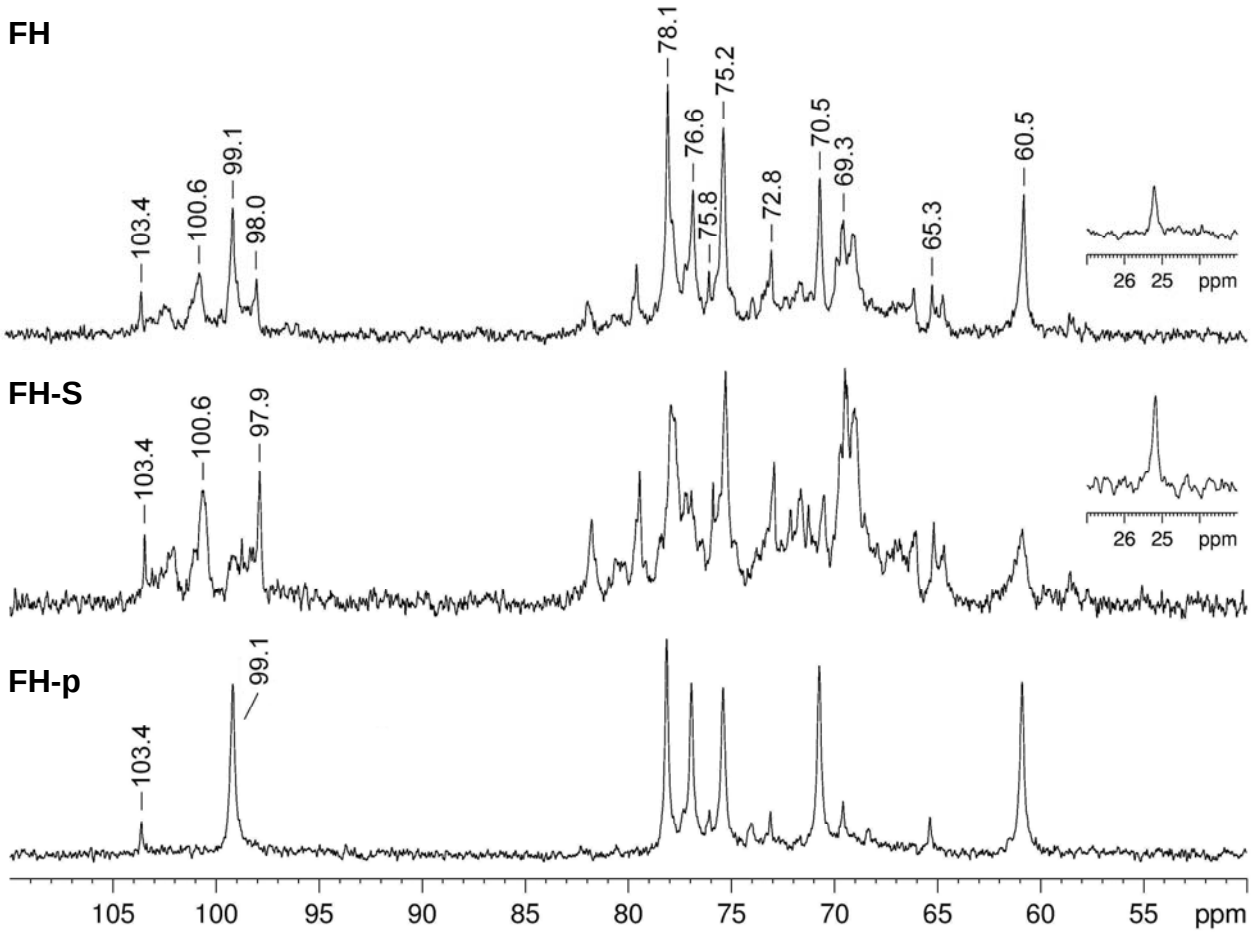
Deve-se notar que o espectro de RMN de ^{13}C do extrato bruto FH, F2 e P2 (FIGURA 15) contêm, juntamente com os sinais anteriormente mencionados, um de grande intensidade em 99,0 ppm (C-1 de manopiranose 4-*O*-ligada 2-sulfato). Combinados com a detecção de manose e xilose, este sinal pode ser utilizado para indicar a presença de xilomanana 2-sulfato nos extratos brutos de outras espécies do gênero *Chondrophycus*.

Agaranas com diferentes modelos de substituição foram descritas para espécies representativas de Ceramiales (DUARTE et al., 2002 e 2004).

Juntamente com estes polissacarídeos outros tipos de galactanas, do tipo DL-híbridas, foram também isoladas a partir de algumas espécies desta ordem (TAKANO et al., 1999 e 2003).

A fração precipitada com KCl 2M, FH-p, obtida de amostras de *C. flagelliferus* cuidadosamente examinadas para evitar contaminação por epífitas e endófitas, mostrou o mesmo padrão de assinalamentos presentes em todos os espectros de todas as outras xilomananas nativas (FIGURA 15). Este resultado claramente mostra que este tipo de polissacarídeo é sintetizado por espécies do gênero *Chondrophycus* e elimina a possibilidade de contaminação exógena.

FIGURA 15. ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DE FH, FH-S E FH-p DE *C. flagelliferus*



Análise realizada a 70°C em D_2O, calibração com acetona como padrão interno (30,2 ppm). Concentração da amostra 40 mg/ml.

Todas estas análises conjuntamente permitiram determinar que as xilomananas biossintetizadas pelas algas *C. papillosus* (P2d e P2e) e *C. flagelliferus* (F2a e F2b) apresentam uma estrutura distinta daquelas isoladas a partir de outras algas vermelhas. Estas xilomananas apresentam uma cadeia principal formada por unidades de β-D-manopiranose 4-*O*-ligadas, esterificada por grupos sulfato em carbonos 2 e glicosilada por unidades de β-D-xilopiranose e β-D-manopiranose, também esterificadas por grupos sulfato em carbonos 2, em carbono 6.

As xilomananas isoladas de outras espécies de algas vermelhas, como por exemplo, *Nothogenia fastigiata* (anteriormente denominada *Chaetangium fastigiatum*), apresentaram uma cadeia principal formada por unidades de α-D-manopiranose 3-*O*-ligadas onde, como grupos substituintes, somente β-D-xilopiranose foi encontrada nestes polissacarídeos, glicosilando também o carbono 2 das unidades constituintes da cadeia principal (CEREZO et al., 1971; MATULEWICZ; CEREZO, 1987b; HAINES et al., 1990; MATULEWICZ et al., 1994; KOLENDER et al., 1995; 1997).

O mesmo padrão estrutural também foi encontrado nas xilomananas isoladas das algas *Nothogenia erinacea* (anteriormente denominada *Chaetangium erinaceum* - NUNN et al., 1973 em MATULEWICZ et al., 1987b) e *Liagora sp* (USOV; DOBKINA, 1988 em HAINES et al., 1990). Entretanto, a xilomanana isolada da alga *Nemalion vermiculare* diferia, de todas as mencionadas, quanto ao padrão de sulfatação, onde estes grupos esterificavam os carbonos 4 e 6 (USOV; YAROTSKII, 1975 em MATULEWICZ et al., 1987a).

Desta forma, o isolamento de uma xilomanana sulfatada a partir de duas espécies de *Chondrophycus* adiciona um novo tipo de polissacarídeo a este grupo de algas vermelhas.

4.4. PURIFICAÇÃO DAS FRAÇÕES SOLÚVEIS EM KCl 2M OBTIDAS DE *C. papillosus* (P2S) e *C. flagelliferus* (F2S)

4.4.1. ANÁLISE QUÍMICA

Com a finalidade de se purificar os polissacarídeos presentes nas frações P2S e F2S, de maiores rendimentos, estas foram submetidas à cromatografia de troca iônica, em coluna de DEAE-Sephacel, utilizando como eluentes: água e soluções crescentes de NaCl (0,25 – 4,0M) (TABELA-10), desta alga *C. papillosus* foram obtidas as frações: P2S-1, P2S-2, P2S-3, P2S-4, P2S-5 e P2S-6, eluídas com NaCl 0,25; 0,5; 0,75; 1,0, 1,5M e 2,0M, respectivamente. Da alga *C. falgelliferus* foram obtidas as frações: F2S-1, F2S-2, F2S-3, F2S-4, F2S-5 e F2S-6, eluídas com NaCl 0,25; 0,5; 0,75; 1,0, 1,5M e 2,0M, respectivamente.

Como pode ser observado na TABELA-10 as frações obtidas da coluna de troca-iônica são piruvatadas e sulfatadas. Além disto, nota-se que todas as frações apresentam rotação óptica específica negativa, indicativo da presença de agaranas.

TABELA-10 RENDIMENTO E ANÁLISE QUÍMICA DAS SUBFRAÇÕES OBTIDAS POR CROMATOGRAFIA DE TROCA-IÔNICA DE P2S e F2S

Fração	Rendimento[a] (%)	Carboidrato[b] (%)	Sulfato[c] (%)	$[\alpha]_D$[d]	Ác. Pirúvico[e] (%)
P2S-1	8,2	76,1	6,4	-30	1,3
P2S-2	25,2	63,5	14,9	-28	3,7
P2S-3	26,0	58,1	21,6	-31	3,7
P2S-4	4,2	60,0	14,1	-23	1,1
P2S-5	4,0	46,4	11,8	-40	1,2
P2S-6	1,2	58,1	11,5	-30	0,6
F2S-1	4,0	49,5	7,3	-32	1,6
F2S-2	25,1	64,9	17,8	-28	2,4
F2S-3	60,4	59,3	21,3	-29	3,8
F2S-4	4,8	53,6	16,2	-28	2,0
F2S-5	5,5	41,1	17,5	-30	1,3
F2S-6	1,2	42,5	13,1	-28	0,5

a= Rendimento expresso em termos da alga seca e moída (*C. papillosus:* 88,2 g; *C. flagelliferus*: 20 g).

b= Determinado pelo método fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS et al., 1956); Expresso em termos de galactose.

c= Determinado segundo DODGSON; PRICE (1961); Expresso em termos de $NaSO_3$.

d= Rotação óptica específica das frações polissacarídicas na concentração de 0,2 g% em água, à temperatura de 20 ^oC.

e= Determinado segundo TROYANO, 1996.

4.4.2. COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS SUBFRAÇÕES OBTIDAS POR CROMATOGRAFIA DE TROCA-IÔNICA DE P2S e F2S.

A cromatografia de troca-iônica de P2S e F2S permitiu a separação de diferentes polissacarídeos. A composição monossacarídica das frações P2S-1 a P2S-6, como pode ser observado na TABELA-11, mostra a presença majoritária de galactose (38,9 – 61,4 mol%), 3,6-anidrogalactose (0,8 – 19,9 mol%), bem

como do seu derivado 2-*O*-metilado (2,9 – 7,9 mol%). Todas as frações, exceto P2S-1, apresentaram 6-*O*-metil-galactose (2,9 – 9,6 mol%) e xilose (5,0 – 31,4 mol%), além de manose em proporções variadas (3,9 – 25,1 mol%).

Agaranas com elevados teores de 6-*O*-metilgalactose são relatadas em algas vermelhas, como por exemplo em várias espécies do gênero *Curdia* (*C. angustata*, *C. crassa* e *C. coriace*), onde cerca de 100% das unidades de β-D-galactose encontram-se 6-*O*-metiladas (FALSHAW, FURNEAUX e STEVENSON, 1998).

A presença de elevados teores de xilose e manose nas frações P2S-1 e P2S-6, superiores aos observados nas demais frações, pode ser originada da contaminação destas por parte das xilomananas sulfatadas anteriormente descritas não precipitadas com KCl.

A composição monossacarídica das frações F2S-1 a F2S-6, TABELA-11, mostra a presença majoritária de galactose (12,8 – 79,4 mol%), 3,6-anidrogalactose (2,1 – 14,2 mol%) e do seu derivado 2-*O*-metilado (0,0 – 6,7 mol%). Novamente, todas as frações apresentaram 6-*O*-metil-galactose (1,1 – 16,1 mol%) e xilose (4,6 – 21,1 mol%), além de manose em proporções variadas (2,6 – 14,6 mol%).

Com relação às frações obtidas a partir da cromatografia de troca-iônica (DEAE-Sephacel) de P2S e F2S as frações P2S-3 e F2S-3, de maior rendimento, foram selecionadas para serem estudadas neste trabalho.

TABELA 11. COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS SUBFRAÇÕES OBTIDAS POR CROMATOGRAFIA DE TROCA-IÔNICA DE P2S e F2S

Fração	Monossacarídeos (% molar)[a]					
	Gal[b]	3,6-AnGal[b]	6Me-Gal[b]	2Me-AnGal[b]	Xil[b]	Man[b]
P2S-1	42,7	0,8	-	-	31,4	25,1
P2S-2	43,3	15,4	7,6	7,3	10,0	16,4
P2S-3	61,4	12,6	9,6	7,5	5,0	3,9
P2S-4	50,1	19,9	8,7	7,9	8,0	5,3
P2S-5	48,7	11,5	4,8	5,8	11,4	17,8
P2S-6	38,9	6,6	2,9	3,8	26,5	21,3
F2S-1	65,7	4,0	3,0	-	21,1	6,3
F2S-2	50,3	12,4	6,9	1,9	14,0	14,6
F2S-3	59,0	14,2	10,9	3,4	5,9	6,6
F2S-4	73,9	6,8	7,0	0,6	7,8	4,0
F2S-5	57,2	7,8	16,1	6,7	9,7	2,6
F2S-6	79,4	2,1	1,1	-	4,6	12,8

[a] Monossocarídeos quantificados em moles%, na forma de acetatos de alditóis, por CG-EM (STEVENSON & FURNEAUX, 1991).

[b] Abreviatura dos monossacarídeos (Gal= galactose; 3,6 AG = 3,6-anidrogalactose; 2MeAG = 3,6-anidro-2-*O*-metilgalactose; 6MeGal = 6-*O*-metilgalactose e Man = manose).

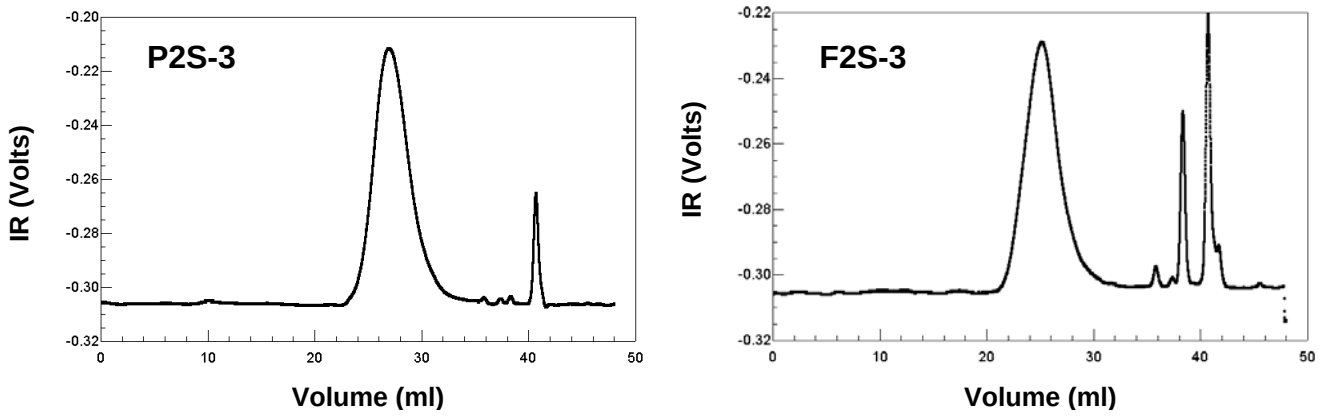
4.4.3. ANÁLISE DE HOMOGENEIDADE DAS GALACTANAS OBTIDAS DE *C. papillosus* (P2S-3) e DE *C. flagelliferus* (F2S-3)

Para verificar a homogeneidade em relação ao raio hidrodinâmico, as frações P2S0-3 e F2S-3 foram analisadas por cromatografia de gel permeação (HPSEC) utilizando como detectores o espalhamento de luz (MALLS) e o índice de refração (RI). As análises de HPSEC-MALLS (FIGURA 16) mostram os perfis de eluição das frações P2S-3 e F2S-3. Ambas as frações apresentaram um perfil de eluição muito semelhante entre si, com tempo de retenção próximo há 25 minutos. Por meio dessa análise foi possível constatar que estas frações estavam homogêneas.

É interessante ressaltar que tais frações, P2S-3 e F2S-3, apresentaram em sua composição monossacarídica manose como um dos seus constituintes (3,9 e 6,6 mol%, respectivamente) certamente proveniente das xilomananas que permaneceram solúveis após o tratamento com KCl. Estes polissacarídeos deveriam, portanto, apresentar um perfil heterogêneo quando submetidos à análise por HPSEC o que não ocorreu. Isto se deve, certamente, à baixa porcentagem deste contaminante, o que não alterou o perfil cromatográfico homogêneo destas frações.

A fração P2S-3 apresentou massa molecular média de 47.960 Da, a qual foi determinada baseando-se na variação dos índices de refração (dn/dc 0,132 ml/g). De forma semelhante, a fração F2S-3 apresentou massa molecular média de 204.100 Da, a qual foi determinada baseando-se na variação dos índices de refração (dn/dc 0,171 ml/g).

FIGURA 16. ANÁLISE DE HOMOGENEIDADE DAS GALACTANAS OBTIDAS DE *C. papillosus* (P2S-3) e DE *C. flagelliferus* (F2S-3)



* experimento realizado com os polissacarídeos dissolvidos em solução $NaNO_3$ 0,1 M contendo NaN_3 200 ppm.

IR = Índice de Refração

4.4.4. ANÁLISE ESPECTROSCÓPICA DE RMN DE ^{13}C DA GALACTANA P2S-3 OBTIDA DE *C. papillosus*

A fração homogênea P2S-3 foi submetida à análise de RMN de ^{13}C, obtendo-se o espectro da FIGURA 17. O espectro desta galactana apresenta poucos sinais, no entanto alargados, na região anomérica. Estes podem ser atribuídos a mais de uma unidade monossacarídica.

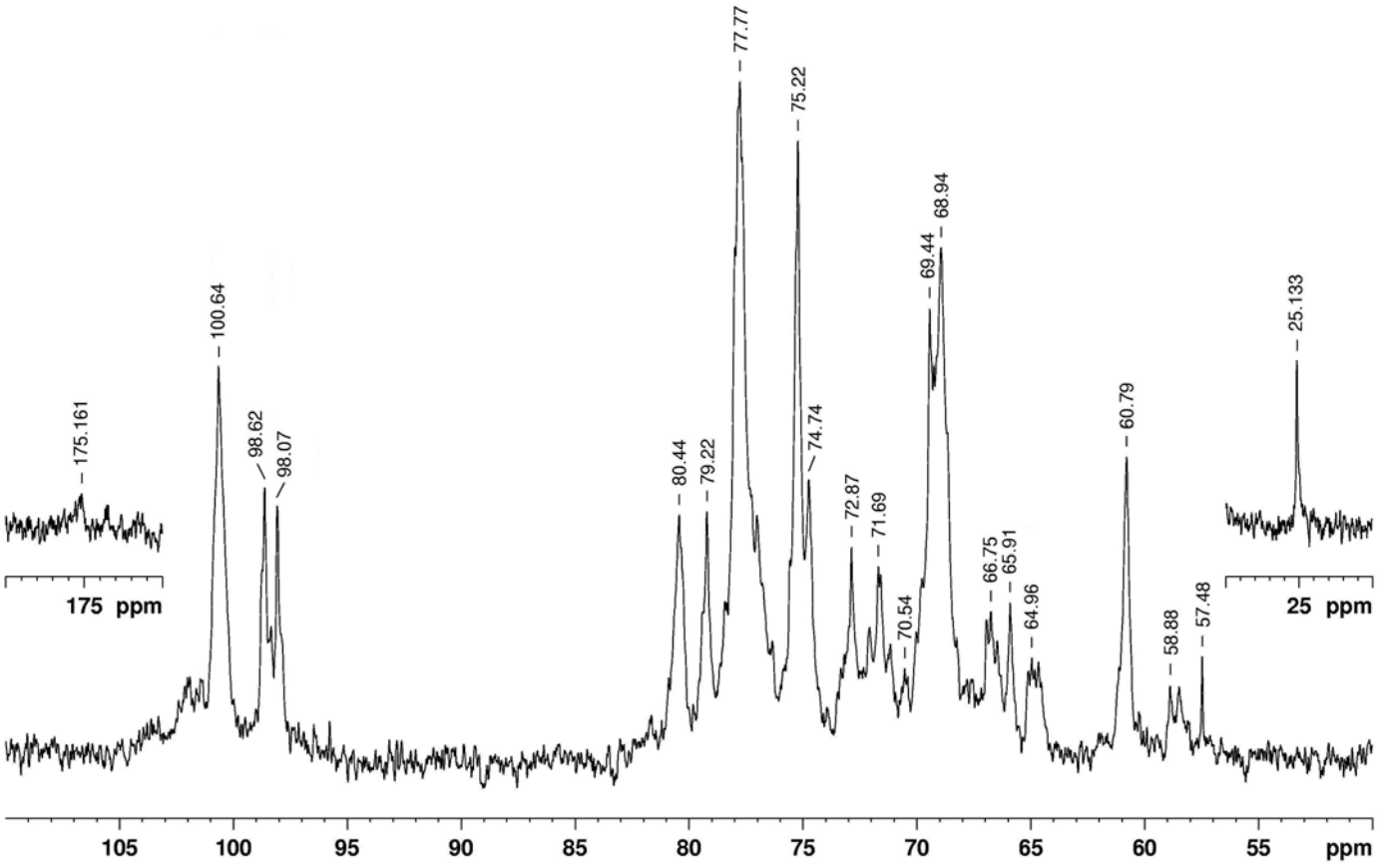
Nesta região é possível observar a presença de sinais em 102,4 ppm correspondente a unidades de β-D-galactopiranose ligadas a unidades de 3,6-anidro-α-L-galactopiranose, cujo sinal de C-1 aparece em 98,1 ppm e 3,6-anidro-2-*O*-metil-α-L-galactopiranose (C-1 em 98,6 ppm). Observa-se um sinal também em 101,4 ppm correspondente as unidades de β-D-galactopiranose 2 sulfato e/ou α-L-galactopiranose

O sinal alargado em 80,4 ppm é atribuído ao C-3 das unidades de β-galactopiranose ligada a 3,6-anidro-α-L-galactose, confirmando a presença desta díade na galactana P2S3 (MILLER; BLUNT, 2000a).

O sinal centrado em 100,6 ppm pode ser atribuído ao C-1 de β-D-galactose 2-sulfato, cujo sinal de C-2 sulfatado aparece bem pronunciado em 77,8 ppm juntamente com o sinal em 79,2 ppm correspondente ao C-3 desta unidade monossacarídica (MILLER; BLUNT, 2000b). O sinal em 100,7 ppm pode ser atribuído ainda ao C-1 de α-L-galactose, a qual pode estar sulfatada em C-6 (presença do sinal em 66,9 ppm) ou não substituído.

Na região do espectro abrangendo campo mais alto (55 – 70 ppm) observamos um sinal intenso centrado em 60,8 ppm correspondente ao C-6 livre das unidades de β-galactopiranose. Um sinal de menor intensidade em 66,9 atribuído as unidades de β-galactose sulfatadas em C-6 demonstra que a maior parte destas unidades não se apresentam sulfatada neste carbono.

FIGURA 17. ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DA GALACTANA P2S-3 OBTIDA DE *C. papillosus*



Os sinais em 175,1 e 25,1 ppm são correspondentes ao grupo carbonila (-C=O) e ao grupo metil (CH_3 -), de acetal de ácido pirúvico, respectivamente, (GAREGG *et al.*, 1979; CHIOVITTI *et al.*, 1997). Outros sinais em 71,8, 66,0 e 64,7 ppm, podem ser atribuídos aos carbonos 4, 5 e 6 de β-galactopiranose piruvatada, respectivamente (MILLER, 2003a). Geralmente a ressonância do carbono acetálico de ácido pirúvico não é observado no espectro de RMN de ^{13}C de galactanas de algas vermelhas. Segundo GORIN et al. (1982), o tempo de relaxamento (T_1) do carbono acetálico pode impedir a sua detecção por espectroscopia de RMN de ^{13}C, mesmo quando este substituinte está presente em uma quantidade significativa. Deste modo o sinal em 101,6 ppm, relativo ao carbono acetálico do acetal de ácido pirúvico não está definido e pode estar sobreposto a outros sinais na região anomérica.

No entanto, são observados sinais em 66,5 e 64,6 ppm correspondentes ao C-5 e C-6, respectivamente, das unidades de β-galactopiranose piruvatadas confirmando a presença deste substituinte nesta fração em estudo.

Estas unidades piruvatadas, 4,6-*O*-(1'-carboxietilideno)-β-D-galactopiranose, são freqüentemente encontrada em galactanas do tipo agarana e também se mostram presentes em algumas carragenanas (CHIOVITTI *et al.*, 1997 e 1998).

Segundo MILLER (1998), a piruvatação da unidade A não interfere significativamente nos deslocamentos químicos dos carbonos das unidades B, quando estas forem constituídas por unidades de 3,6-anidro-galactose (L- ou D), ou por α-L-galactose (MILLER, 2003a). No entanto, quando as unidades B são constituídas por α-D-galactose, a piruvatação causa um efeito significativo no deslocamento do carbono anomérico (MILLER, 2003a).

O espectro de RMN de ^{13}C de P2S3 não contém sinais correspondentes às unidades β-galactopiranose (piruvatada ou não) ligadas a unidades de α-D-galactopiranose.

Deste modo, pode-se dizer que o sinal em 102,4 ppm pode ser atribuído também a unidades β-D-galactopiranose (piruvatadas ou não) ligadas a 3,6-anidro-α-L-galactose e/ou 3,6-anidro-2-*O*-metil-α-L-galactopiranose.

Em resumo, estes resultados permitem a identificação de algumas díades na galactana P2S-3, bem como mostrando que algumas unidades A podem estar sulfatadas em C-2, substituídas ou não por acetal de ácido pirúvico ou sem esta substituição. As unidades B estão presentes na forma de: α-L-galactose sulfatada em C-6 (sinal em 66,7 ppm) ou não substituída neste carbono, 3,6-anidro-α-L-galactose que podem estar substituídos em C-2 por grupo metil ou sulfato.

4.4.5. DESSULFATAÇÃO SOLVOLÍTICA DA GALACTANA P2S-3 OBTIDA DE *C. papillosus*

Com o intuito de se determinar o posicionamento dos grupos sulfato a galactana P2S-3 foi submetida à dessulfatação solvolítica pelo método de NAGASAWA et al. (1979). A determinação do posicionamento dos grupos

sulfato se dá por análise comparativa de metilação da galactana nativa e dessulfatada e será mostrado posteriormente.

A galactana P2S-3 após dessulfatação solvolítica foi denominada P2S-3D (rendimento de 62,6%) com 4,4% de $NaSO_3$, o que corresponde a 78,2% de dessulfatação.

Os dados da TABELA 12 demonstram que o tratamento solvolítico não afetou significativamente a composição monossacarídica desta fração. Outra metodologia de dessulfatação, como a metanólise que é catalisada por ácido, de acordo com TAKANO et al, 2002, mostra uma grande perda de unidades anidrogalactosídicas, não sendo portanto, utilizada na dessulfatação de galactanas contendo unidades anidro-galactosídicas.

TABELA 12. COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES NATIVA (P2S-3) e DESSULFATADA (P2S-3D) DE *C. papillosus*

Fração	Monossacarídeos (% molar)[a]					
	Gal[b]	3,6-AnGal[b]	6Me-Gal[b]	2Me-AnGal[b]	Xil[b]	Man[b]
P2S-3	61,4	12,6	9,6	7,5	5,0	3,9
P2S-3D	60.3	15,0	12,8	6,9	5,0	-

[a] Monossocarídeos quantificados em moles%, na forma de acetatos de alditóis, por CG-EM (STEVENSON & FURNEAUX, 1991).

[b] Abreviatura dos monossacarídeos (Gal= galactose; 3,6 AG = 3,6-anidrogalactose; 2MeAG = 3,6-anidro-2-*O*-metilgalactose; 6MeGal = 6-*O*-metilgalactose e Man = manose).

Comparando os espectros de RMN de ^{13}C da fração nativa (P2S-3) e do seu respectivo polímero dessulfatado, P2S-3D (FIGURA 18), observamos que a dessulfatação modificou alguns sinais.

Apesar do espectro de RMN de ^{13}C da fração dessulfatada apresentar uma qualidade menor, devido ao aumento da linha de base em relação ao espectro da fração nativa, foi possível determinar a presença de sinais correspondentes a unidades de:

- β-D-galactopiranose (C-1 – C-6: 102,2; 69,7; 81,8; 68,4; 75,0; 60,9 ppm) ligadas a 3,6-anidro-α-L-galactose (C-1 – C-6: 97,9; 69,4; 80,0; 77,2; 75,3; 69,1 ppm) (LAHAYE et al., 1989);
- β-D-galactopiranose (C-1 – C-6: 102,2; 69,7; 82,3; 68,4; 75,0; 60,9 ppm) ligadas a 3,6-anidro-2-*O*-metil-α-L-galactose (C-1 – C-6: 98,3; 78,4; 78,0; 77,2; 75,3; 69,1 ppm) (LAHAYE et al., 1989);
- 4,6-*O*-(1'-carboxietilideno)-β-D-galactopiranose (C-1 – C-6: 102,0; 69,7; 79,6; 71,3; 66,2; 64,8 ppm) (LAHAYE et al., 1989);
- 6-*O*-metil-β-galactopiranose (C-3 – C-6; 81,8; 68,9; 73,1; 71,1 ppm)

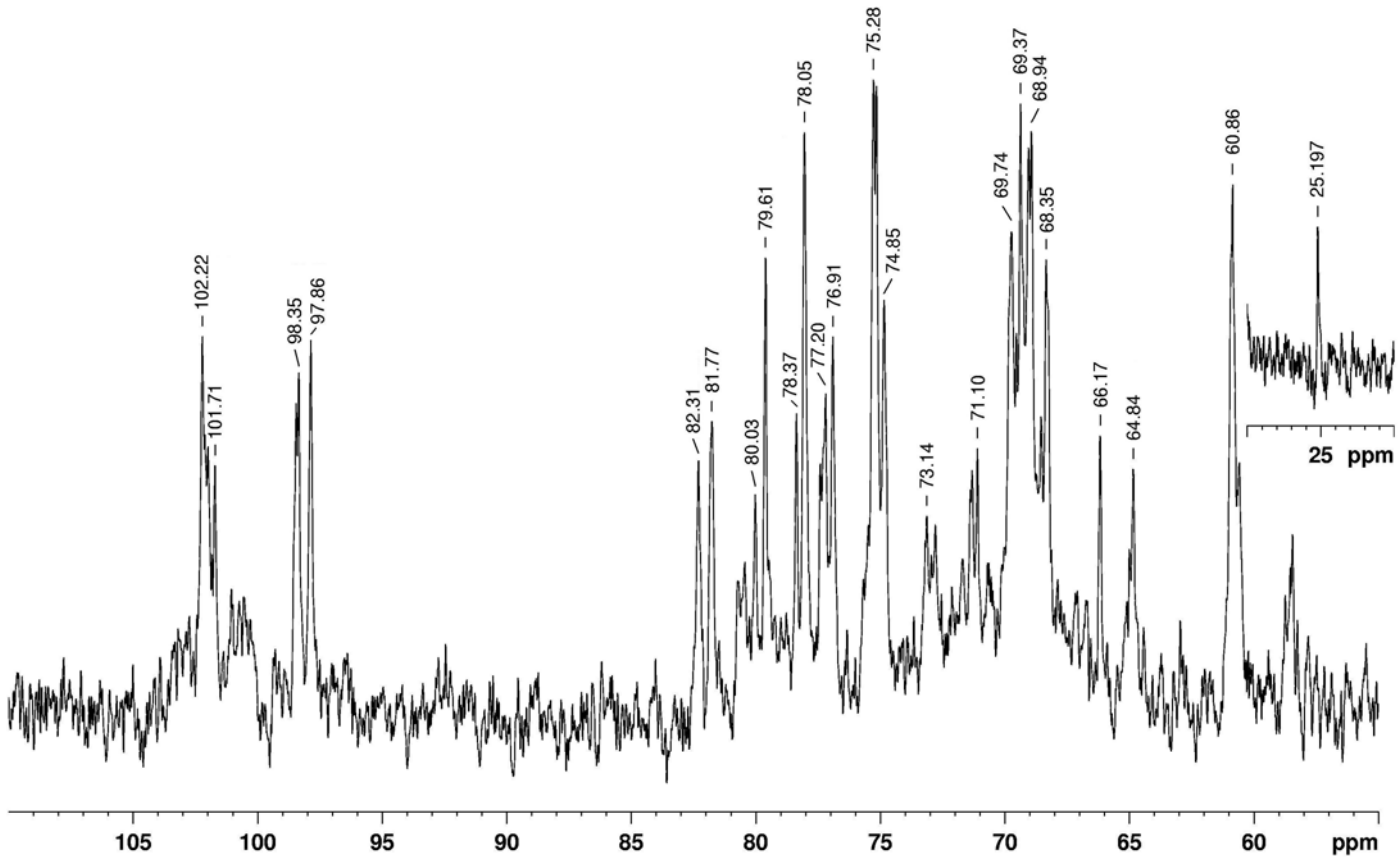
No espectro de P2S-3D foi possível ainda observar a presença dos sinais em 64,8 e 66,2 ppm, atribuídos ao C-6 e ao C-5 de 4,6-*O*-(1'-carboxietilideno)-β-D-galactopiranose. Estas unidades piruvatadas podem estar ligadas a 3,6-anidro-α-L-galactose ou a 3,6-anidro-2-*O*-metil-α-L-galactose.

Na região anomérica observa-se também a presença de um sinal agudo em 101,7 ppm que pode ser atribuído ao C-1 das unidades de xilose (USOV; 1984).

Na fração nativa (P2S-3) não se observa o sinal em 100,6 ppm presente, quando comparado ao da fração dessulfatada, atribuído ao C-1 das unidades de β-D-galactose 2-sulfato. Além disto, nota-se, no espectro da galactana P2S3D, o desaparecimento dos sinais localizados fora da região anomérica em 77,8 ppm e 79,2 ppm correspondentes ao C-2 e C-3 desta unidade monossacarídica, respectivamente (MILLER; BLUNT, 2000b). Estes resultados confirmam que na galactana nativa (P2S-3) as unidades A estão substituídas em C-2 por grupos sulfato

Outras alterações na região de campo mais alto do espectro da fração P2S3D, quando comparada ao da fração nativa, são a remoção do sinal em 66,7 ppm, atribuído ao C-6 das unidades de 6-*O*-metil-β-galactopiranose juntamente com o aumento do sinal em 60,8 ppm correspondente ao C-6 livre de β-galactose.

FIGURA 18. ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DA GALACTANA DESSULFATADA (P2S-3D) OBTIDA DE *C. papillosus*



4.4.6 ANÁLISE DE METILAÇÃO DAS GALACTANAS NATIVA (P2S-3) e DESSULFATADA (P2S-3D) OBTIDAS DE *C. papillosus*

A análise de metilação da galactana homogênea F2S-3 foi conduzida no polímero nativo e parcialmente dessulfatado (F2S3D) utilizando o método de CIUCANU e KEREK (1984). Os polissacarídeos permetilados foram hidrolisados utilizando o método de hidrólise redutiva descrito por FALSHAW e FURNEAUX (1994).

Uma vez que o posicionamento dos grupos sulfato no polímero original é obtido com a análise comparativa, do polissacarídeo nativo e após dessulfatação solvolítica, os resultados de análise de metilação do polímero nativo e dessulfatado serão discutidos conjuntamente.

A análise de composição monossacarídica da galactana dessulfatada (P2S-3D) é similar à da galactana nativa, indicando que não houve degradação desta fração durante o processo de dessulfatação solvolítica (TABELA 12).

TABELA 13. ANÁLISE DE METILAÇÃO DAS GALACTANAS NATIVA (P2S-3) e DESSULFATADA (P2S-3D) OBTIDAS DE *C. papillosus*

Derivado [a]	P2S-3	P2S-3D
Unidades A		
2,4,6-Gal	8,7	36.0
4,6-Gal	35,7	-
2,4-Gal	4,4	4,6
Gal	5,4	6,6
Unidades B		
2,3,6-Gal	-	6,0
2,3-Gal	3,2	1,9
2AG	21,6	14,1
AG	-	8,9
Unidades A e/ou B		
2,6-Gal	2,6	7,4
3/4-Gal	3,0	-
6-Gal	3,5	-
2-Gal	5,7	7,4
Unidades terminais		
2,3,4-Xil	4,9	5,2
2,3,4,6-Gal	1,3	1,9

[a]Mol% de monossacarídeo contendo grupos metil nas posições indicadas.

Como pode ser observado na TABELA 13 P2S-3 apresenta alta porcentagem do derivado 4,6-di-*O*-metilgalactose (35,7 mol%), que corresponde a unidades de β-D-galactose 2-sulfato. A presença de grupos

sulfato em carbono-2 é comprovada pela análise de metilação da fração dessulfatada (P2S-3D), onde este grupo é removido, originando o derivado 2,4,6-tri-*O*-metil-galactose (36,0 mol%). Deste modo a galactana P2S-3 apresenta a maior parte das suas unidades A na forma de β-galactose 2-sulfato, cujo posicionamento dos grupos sulfato está de acordo com os dados de RMN de ^{13}C anteriormente discutidos além de uma menor porcentagem (8,7 mol%) de unidades A não substituída (TABELA 13).

Ainda com relação às unidades A, podemos observar que a metilação de P2S-3 apresentou 5,4 mol% de galactose. Estes resultados são compatíveis com a presença de β-galactose 4,6-piruvatada e sulfatada em C-2. Estes valores mostram-se próximos aos observados entre os produtos de metilação de P2S-3D (6,6 mol%) o que pode indicar que o processo de dessulfatação não foi eficiente na remoção dos grupos sulfato presentes nestas unidades.

É observado ainda na metilação da galactana P2S-3 a presença dos derivados 2,6-di-*O*-metilgalactose (2,6 mol%) e 2-*O*-metilgalactose (5,7 mol%) os quais podem ser originados tanto da unidade A (β-galactose 4-*O*-substituída e β-galactose 4,6-di-*O*-substituída), quanto das unidades B (α-galactose 3-*O*-substituída e α-galactose 3,6-di-*O*-substituída) (MILLER et al., 1995).

Em menor proporção, a metilação de P2S-3 mostra a presença do derivado 2,4-di-*O*-metilgalactose (4,4 mol%) correspondente às unidades de galactose substituídas em C-6. Na galactana dessulfatada P2S-3D, 4,4% de $NaSO_3$, correspondente a 78,2% de dessulfatação, este mesmo derivado é observado em proporções semelhantes (4,6 mol%) sugerindo a substituição em C-6 destas unidades não por grupos sulfato, mas por unidades monossacarídicas. Deste modo, podemos concluir que as unidades de galactose substituídas em C-6 e C-2 da galactana P2S-3 (derivados 2,4-di-*O*-metilgalactose e 4,6-di-*O*-metilgalactose, respectivamente) são correspondentes às unidades de β-D-galactose 6-glicosil e β-D-galactose 2-sulfato, respectivamente. As unidades sulfatadas em C-2 após dessulfatação estariam presentes na forma do derivado 2,4,6-tri-*O*-metilgalactose, permanecendo as unidades 6-glicosiladas na forma do derivado 2,4-di-*O*-metilgalactose.

Unidades piruvatadas também podem ser observadas em P2S3, devido à presença de galactose na metilação da galactana nativa (5,4 mol%) correspondente a uma proporção aproximada de 1 unidade piruvatada para cada 18 unidades.

Unidades terminais não redutoras, também estão presentes (2,3,4,6-tetra-*O*-metil-galactose e 2,3,4-tri-*O*-metilxilose), tanto na metilação de P2S3 como de P2S3D. Estas unidades glicosídicas podem estar substituindo o carbono 6 das unidades de β-galactose. Na análise de metilação podemos observar a presença do derivado 2,4-di-*O*-metilgalactose que pode representar, em parte, unidades substituídas em C-6 por unidades glicosil, como mencionado anteriormente.

Com relação às unidades B observamos que os resultados obtidos em relação aos teores de 3,6-anidro-galactose e do seu derivado metilado 3,6-anidro-2-*O*-metilgalactose não são conclusivos, necessitando para tanto de novos estudos para a obtenção de dados mais esclarecedores.

A presença do derivado 2,3-di-*O*-metilgalactose na metilação de P2S-3 (3,2 mol%), indica a presença de unidades precursoras de 3,6-anidrogalactose (α-galactose 6-sulfato).

As unidades de α-galactopiranose de P2S-3 não estão presentes na forma não substituída tendo-se em vista que não é observada a presença do derivado 2,3,6-tri-*O*-metilgalactose no polissacarídeo nativo.

Não é observada a presença de unidades B substituídas por grupos sulfato em C-2, semelhantemente ao que acontece com as unidades A, tendo-se em vista que todos os derivados identificados atribuídos a esta unidade apresentam-se permetilados em C-2.

É observada, também, a presença dos derivados 2,6-di-*O*-metilgalactose (2,6 mol%) e 6-*O*-metilgalactose (3,5 mol%), os quais podem ser originados tanto da unidade A (β-galactose 4-*O*-substituída e β-galactose 2,4-di-*O*-substituída), como das unidades B (α-galactose 3-*O*-substituída e α-galactose 2,3-di-*O*-substituída) (MILLER et al., 1995). Os resultados de metilação da fração dessulfatada sugerem que as unidades de 6-*O*-metilgalactose encontram-se sulfatadas em C-2, onde após remoção destes substituintes pela solvólise, passam a constituir unidades de 2,6-di-*O*-metilgalactose (7,4 mol%).

Os resultados de metilação mostram a presença de unidades terminais de xilose tanto nos polissacarídeos nativo quanto dessulfatado (4,9 e 5,2 mol%, respectivamente) e galactose (1,3 e 1,9 mol%, respectivamente). Estas unidades glicosídicas podem estar substituindo o C-6 de unidades de β-galactose e/ou o C-3 de α-galactose, devido à presença do derivado 2,6-di-*O*-metilgalactose (2,6 mol%) na análise de metilação da galactana dessulfatada (P2S-3D).

Como foi discutida anteriormente, a presença de unidades de xilose tem sido encontrada em galactanas de diferentes espécies de algas vermelhas, as quais não parecem ter importância taxonômica. De acordo com a análise de metilação, estas unidades estão presentes como unidades terminais não redutoras (2,3,4-Xyl) que, como caracterizado por BARBAKADZE e USOV em 1978, se encontram ligadas a cadeia principal da galactana, como ramificações individuais.

4.4.7. ANÁLISE ESPECTROSCÓPICA DE RMN DE ^{13}C DA GALACTANA OBTIDA DE *C. flagelliferus* F2S-3

A fração obtida de *C. flagelliferus* F2S-3 foi submetida à análise de RMN de ^{13}C, obtendo-se o espectro da FIGURA 19. O espectro desta galactana apresenta mais sinais na região anomérica, quando comparado ao da fração P2S-3, o que demonstra uma maior diversidade estrutural desta fração.

O espectro de RMN de ^{13}C desta fração (FIGURA 19) apresentou os sinais anoméricos em 103,4 ppm referente às unidades β-D-galactose (USOV et al., 1980; LAHAYE et al., 1985). Este sinal pode também ser atribuído ao C-1 das unidades de xilose em C-6 de β-D-galactose (DUARTE, 2002).

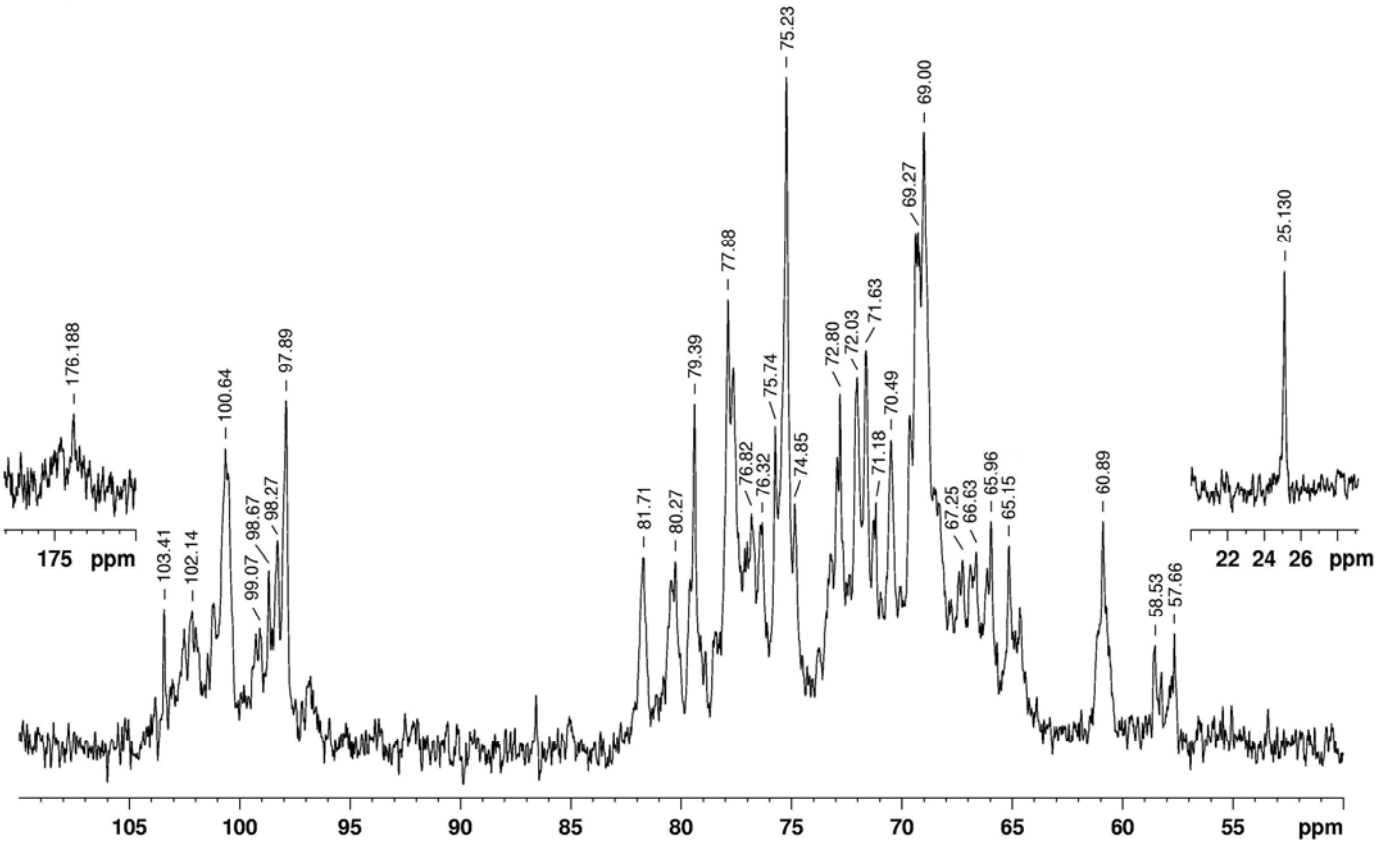
Unidades simples de xilose foram detectadas substituindo o C-6 das unidades β-D-galactose por USOV et al. (1997), MILLER e BLUNT (2000b) e ERREA e MATULEWICZ (2003), substituindo o C-3 das unidades α-L-galactose no polissacarídeo isolado da alga *Chondria macrocarpa* (FURNEAUX e STEVENSON, 1990) e na galactana de *Laurencia nipponica* (USOV e ELASHVILI, 1991). Substituição por xilose no C-4 foi detectada na galactana da alga *Georgiella confluens* (KOLENDER e MATULEWICZ, 2002).

A galactana P2S-3 apresenta sinais na região entre 102,0 – 102,5 ppm correspondentes a unidades de β-galactopiranose (que podem estar não substituídas, piruvatada ou 6-*O*-metilada) ligadas a unidades de 3,6-anidro-2-*O*-metil-α-L-galactose ou às unidades de 3,6-anidro-α-L-galactose (LAHAYE et al., 1989).

O sinal intenso em 100,6 ppm corresponde ao C-1 de β-D-galactose 2-sulfato (USOV et al., 1980; DUARTE et al., 2002), C-2 sulfatado em 77,8 ppm e C-3 em 79,4 ppm (MILLER; BLUNT, 2000b). O sinal em 100,6 ppm pode ainda ser atribuído ainda ao C-1 de unidades de α-L-galactose podendo esta estar sulfatada em C-6 (presença do sinal em 66,6 ppm) ou não substituída neste carbono.

Na região anomérica é possível observar também a presença de sinais correspondentes às unidades de 3,6-anidro-α-L-galactopiranose, cujo sinal de C-1 aparece bem definido em 97,9 ppm e de 3,6-anidro-2-*O*-metil-α-L-galactopiranose (98,3 ppm).

FIGURA 19. ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DA FRAÇÃO F2S3



Na região de campo mais alto observam-se vários sinais. Em 60,9 ppm correspondente ao C-6 livre das unidades de β-galactopiranose. Em 64,7 e 66,0 ppm sinais atribuídos ao C-6 e C-5, respectivamente, das unidades de β-galactose piruvatada.

Foi possível observar no espectro de F2S-3 a presença, também em campo mais alto, do sinal em 25,1 ppm, referente ao grupo metil (CH_3-) de acetal de ácido pirúvico bem como o sinal correspondente ao grupo carbonila deste substituinte (175,1 ppm) (GAREGG et al., 1979; CHIOVITTI et al., 1997).

De acordo com GAREGG et al. (1979), o sinal do grupo metil de acetal de ácido pirúvico em 25,0 ppm, corresponde à configuração R do acetal. É importante ressaltar que em polissacarídeos de algas vermelhas só foi encontrado este substituinte na configuração R.

Estes resultados mostram que, de forma semelhante ao observado para P2S-3, parte das unidades A podem estar sulfatadas em C-2, substituídas por

acetal de ácido pirúvico ou sem esta substituição. As unidades B estão presentes na forma de: α-L-galactose (sulfatada em C-6 ou não substituída neste carbono), 3,6-anidro-α-L-galactose e 2-*O*-metil-3,6-anidro-*α*-L-galactose.

4.4.8. DESSULFATAÇÃO SOLVOLÍTICA DA GALACTANA OBTIDA DE *C. flagelliferus* F2S-3

A dessulfatação solvolítica de galactanas isoladas de algas vermelhas é necessária para a determinação da posição dos grupos sulfato. As análises de metilação e de RMN de ^{13}C do polímero nativo e do dessulfatado permitem identificar a localização dos grupos sulfato no polímero original, sendo de fundamental importância para a determinação de sua estrutura química.

A galactana F2S-3 foi submetida à dessulfatação solvolítica pelo método de NAGASAWA et al. (1979), do mesmo modo que a galactana P2S-3, descrita anteriormente sendo denominada de F2S-3D (81% de rendimento). F2S-3D apresentou 5,0% de $NaSO_3$, correspondente a remoção de 76,5% dos grupos sulfato.

Os dados da TABELA 14 demonstram que o tratamento solvolítico não modificou significativamente a composição monossacarídica desta fração.

TABELA 14. COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES NATIVA (F2S-3) e DESSULFATADA (F2S-3D) DE *C. flagelliferus*

Fração	Monossacarídeos (% molar)[a]					
	Gal[b]	3,6-AnGal[b]	6Me-Gal[b]	2Me-AnGal[b]	Xil[b]	Man[b]
F2S-3	56,5	15,2	11,8	3,6	6,3	6,6
F2S-3D	61,9	18,3	12,1	2,5	5,2	-

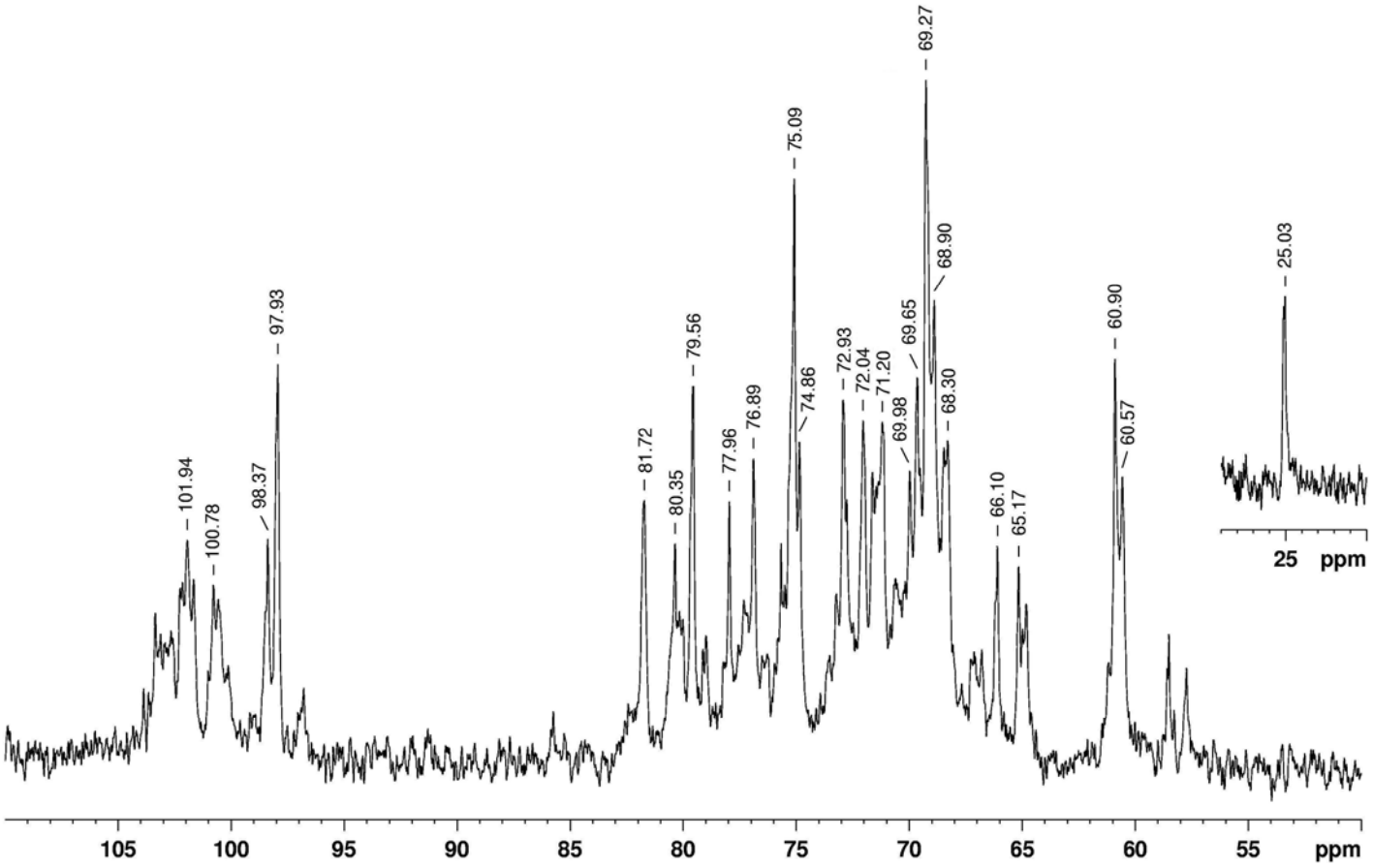
61,1

[a] Monossocarídeos quantificados em moles%, na forma de acetatos de alditóis, por CG-EM (STEVENSON & FURNEAUX, 1991).

[b] Abreviatura dos monossacarídeos (Gal= galactose; 3,6 AG = 3,6-anidrogalactose; 2MeAG = 3,6-anidro-2-*O*-metilgalactose; 6MeGal = 6-*O*-metilgalactose e Man = manose).

Comparando os espectros de RMN de ^{13}C da fração nativa (F2S-3) e do seu respectivo polímero dessulfatado (F2S-3D) (FIGURA 20), observamos que a dessulfatação modificou alguns sinais, apesar de não ter promovido uma simplificação significativa do mesmo.

FIGURA 20. ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DA GALACTANA DESSULFATADA (F2S-3D) OBTIDA DE *C. flagelliferus*



O sinal correspondente ao grupo metil (CH_3-), de acetal de ácido pirúvico em 25,1 ppm se encontra presente no espectro da galactana dessulfatada (F2S-3D), mostrando que o processo solvolítico além de não ter degradado as unidades anidrogalactosídicas não ocasionou depiruvatação do polissacarídeo.

No polímero dessulfatado os sinais da região anomérica podem ser agrupados em pares correspondentes ao C-1 das unidades que compõe as díades presentes no polímero, 103,3 ppm - 100,6 ppm (β-D-galactopiranose ligada a α-L-galactopiranose) (USOV et al., 1980), 102,0 ppm - 98,4 ppm (β-D-galactopiranose ligada a 3,6-anidro-2-*O*-metil-α-L-galactopiranose) e 102,0 ppm - 98,0 ppm (β-D-galactopiranose ligada a 3,6-anidro-α-L-galactopiranose) (LAHAYE et al., 1989).

As unidades de 3,6-anidrogalactopiranose (C-1 97,9 ppm), quando substituídas em C-2 por grupo metil, apresentam um deslocamento químico em C-1, de aproximadamente +0,5 ppm, o que está de acordo com o assinalamento em 98,4 ppm atribuído ao C-1 de 3,6-anidro-2-*O*-metil-α-L-galactopiranose (LAHAYE et al., 1989).

No espectro do polímero dessulfatado, além da atribuição dos sinais da região anomérica, observamos a redução significativa do sinal em 66,6 ppm, presente na galactana nativa (FIGURA 19), confirmando que algumas unidades de α-galactose são substituídas por sulfato em C-6.

Outra diferença ao compararmos os espectros de F2S-3D e F2S-3, foi a diminuição significativa do sinal em 77,9 ppm, observado no espectro da galactana nativa (FIGURA 19), e atribuído ao C-2 sulfatado de unidades de β-galactopiranose. Por outro lado, no espectro da galactana dessulfatada é definido o sinal de C-2 de β-galactose não substituída, em 69,6 ppm. Esta diferença, de aproximadamente +8,0 ppm para o sinal de C-2 sulfatado, está de acordo com os valores propostos por MILLER e BLUNT (2000b). O sinal em 102,0 ppm presente no espectro da fração F2S-3D corresponde ao C-1 de unidades de β-galactopiranose ligadas a unidades de 3,6-anidro-α-L-galactose ou unidadaes de 3,6-anidro-2-*O*-metil-α-L-galactopiranose (MILLER; BLUNT, 2000b).

No espectro de F2S-3D foi possível ainda observar a presença dos sinais em 65,2 e 66,1 ppm, atribuídos ao C-6 e ao C-5, respectivamente, de 4,6-*O*-(1'-carboxietilideno)-β-D-galactopiranose. Segundo MILLER (1998), a piruvatação da unidade A não interfere significativamente nos deslocamentos químicos dos carbonos das unidades B, quando estas unidades forem constituídas por unidades de 3,6-anidro-galactose (da série L- ou D-).

São observadas também alterações na região de campo mais alto do espectro da fração F2S-3D como o aumento do sinal em 60,9 ppm correspondente ao C-6 livre de β-galactose.

Na análise estrutural de polissacarídeos sulfatados, para se esclarecer as substituições, é realizado um estudo comparativo entre os polímeros nativo e dessulfatado. Como já foi mencionado anteriormente a galactana dessulfatada

não sofreu degradação, permitindo assim a correlação dos resultados do polímero nativo e do correspondente polímero dessulfatado.

Estas análises demonstram a semelhança estrutural entre as duas galactanas solúveis em KCl 2M (P2S-3 e F2S-3) sintetizadas pelas algas *C. papilosus* e *C. flageliifeurs*, respectivamente. Em ambas, as unidades A (β-D-galactose) estão principalmente 2-*O*-sulfatadas e piruvatadas. As unidades B (α-L-galactose) são formadas por 3,6-anidro-α-L-galactopiranose e 3,6-anidro-2-*O*-metil-α-L-galactose.

Ambas as galactanas possuem ainda substituição por unidades simples de xilose, a qual é um substituinte freqüente em galactanas de alga marinhas. Em *Chondria macrocarpa* e *Laurencia nipponica* as unidades de xilose glicosilam o C-3 das unidades de L-galactose-6-sulfato (FURNEAUX e STEVENSON, 1990) e USOV e ELASHIVILI (1991), respectivamente. Em *Laingia pacifica* parte das unidades de 3,6-anidro-α-L-galactose e de β-D-galactose estão substituídas por xilose em C-2 e em C-6, respectivamente, (KOCHETKOV et al., 1973). Em *Laurencia undulata* foi isolado um dissacarídeo constituído por β-D-galactose e 2-*O*-metil 3,6-anidrogalactose onde C-4 (da unidade A) apresentava xilose (HIRASE et al., 1982). As galactanas de *B. montagnei*, também apresentaram unidades de β-D-xilopiranose (C-1–C-5 em 103,9 ppm, 72,8 ppm, 75,7 ppm, 69,4 ppm e 65,2 ppm) glicosilando o C-6 de algumas unidades de β-D-galactopiranose (DUARTE et al., 2002).

Embora a presença de xilose tenha sido relatada em diversas galactanas de algas, são poucas as que tiveram o posicionamento desta unidade definitivamente determinado e até o momento não há relatos na literatura de xilose substituindo o C-2 das unidades α-L-galactose, como foi observado na galactana de *M. gelidium.*

4.5. PADRONIZAÇÃO DO MÉTODO DE QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDO PIRÚVICO EM MATERIAL POLISSACARÍDICO POR CLAE

Várias técnicas de separação, tais como cromatografia gasosa (CG), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e eletroforese capilar (EC) vêm se destacando na química analítica pela capacidade de realizarem análises qualitativas e quantitativas em amostras ambientais, farmacêuticas e biológicas e em alimentos (RIBANI et al., 2004).

Toda metodologia analítica deve ser avaliada para garantir que a mesma seja exata, específica e reprodutível. Esta avaliação assegura a credibilidade desta durante o uso rotineiro, sendo algumas vezes mencionada como parte do processo de validação, que fornece uma evidência documentada de que o método realiza aquilo para o qual é indicado fazer (VIEIRA & LICHTIG, 2004).

Desta forma, tendo em vista a disponibilidade de um sistema completo de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) já existente, a facilidade para preparo das amostras aliada à pequena quantidade de material necessária para a realização de tal análise, optou-se por utilizar a metodologia descrita por TROYANO et al. 1996 para a determinação do ácido pirúvico presente em amostras de carboidratos obtidos a partir de algas vermelhas (Rhodophyta) empregando-se CLAE com detecção na região do ultravioleta (UV).

Para isto ulilizou-se coluna Phenomenex Rezex 8% H. Organic Acid – ROA – (7,8 x 300 mm, 8μm), operada a 65 °C e precedida por uma pré-coluna Phenomenex modelo Carbo H+ (4 x 3,0 mm) sendo a fase móvel composta por água contendo 0,5 ml/l de ácido sulfúrico a uma vazão de 0,5 ml/min. sendo os componentes das amostras foram detectados por espectrofotometria de Ultra-Violeta (UV) a 210 nm. Todas as amostras, após hidrólise com TFA 1M a 120 °C por 6 horas, foram filtradas através de membrana HV (Durapore) em PVDF (Millipore®) com poros de 0,45 μm e injetadas diretamente no sistema cromatográfico utilizando-se um “loop” de 10 μL.

A conformidade da metodologia deve ter alguns parâmetros obrigatórios como linearidade, especificidade, exatidão, precisão, limite de detecção e limite de quantificação com o intuito de garantir a confiabilidade dos resultados analíticos obtidos (SANTOS et al, 2006).

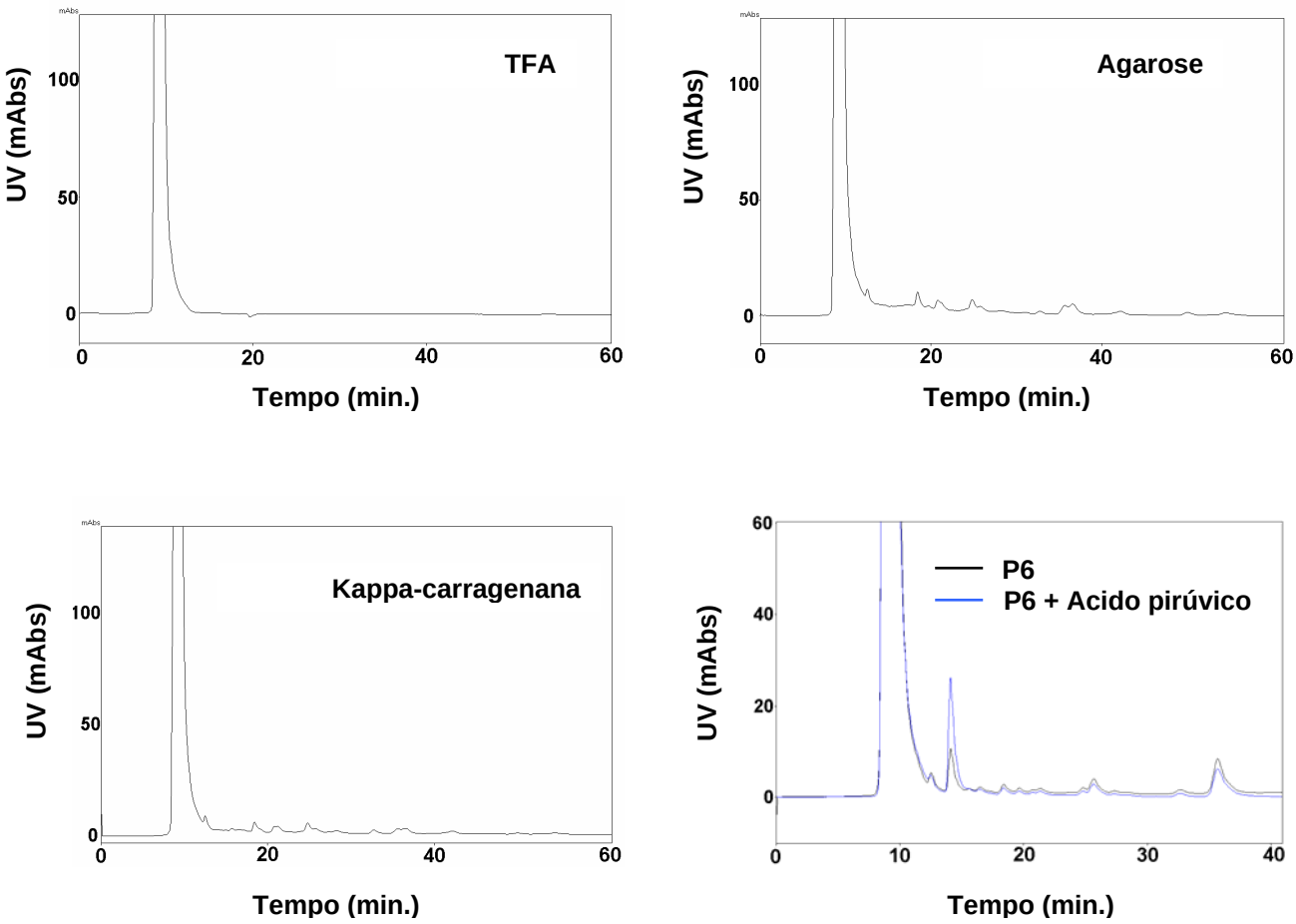
A primeira etapa de padronização de tal metodologia foi o estabelecimento das condições de análise a que seriam submetidas às amostras (fase móvel, temperatura e fluxo), a fim de assegurar a seletividade da técnica analítica empregada para o ácido pirúvico, obtendo-se os parâmetros descritos em Materiais e Métodos (Item 3.7.5). O tempo de retenção relativo ao ácido pirúvico (14,0 $\pm$ 0,1 minutos) foi obtido por meio da injeção direta de solução do padrão comercial disponível monitorado por espectroscopia do UV em 210 nm (EITEMAN & CHASTAIN, 1997).

A seletividade de um método instrumental de separação representa a capacidade de avaliar, de forma inequívoca, se a substância em exame na presença de componentes que poderiam interferir com a determinação numa mistura complexa. Corresponde ao grau de interferência de espécies, como as presentes em reagentes, impurezas e produtos de degradação, bem como outros compostos de propriedades similares que possam estar porventura presentes. Assim, garante que o pico de resposta seja exclusivamente do composto simples de interesse, isto é, que não existam interferentes naquele tempo de retenção. Se a seletividade não for assegurada, a linearidade, exatidão e a precisão estarão seriamente comprometidas (RIBANI et al. 2004).

Para a determinação da seletividade, inicialmente realizou-se a avaliação de interferentes presentes na fase móvel (ácido sulfúrico/água 0,5 ml/l) e nos reagentes de hidrólise, assim como a análise de matrizes isentas da substância de interesse submetidas à mesma condição hidrolítica utilizada para a obtenção do ácido pirúvico presente em polissacarídeos extraídos de algas vermelhas. Para tanto se empregou padrões comerciais de agarose e kappa-carragenana, obtendo-se os cromatogramas ilustrados na FIGURA 21.

A seletividade do método também foi avaliada através de injeções consecutivas de uma galactana piruvatada obtida de *C. papillosus* (P6, TABELA 1) inicialmente hidrolisada conforme descrito por TROYANO, et al. 1996 (TFA 1M por 6 horas a 120 ^{o}C) e após adição de uma pequena alíquota de padrão comercial de ácido pirúvico (FIGURA 21).

FIGURA 21. AVALIAÇÃO POR CLAE DA SELETIVIDADE DO MÉTODO PARA QUANTIFICAÇÃO DO ÁCIDO PIRÚVICO UTILIZANDO A COLUNA REZEX-ROA



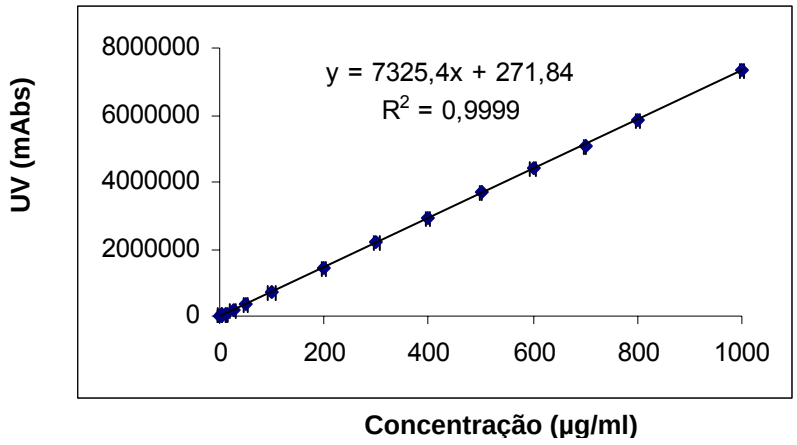
Após confirmação da seletividade do método avaliado foi realizada estimativa da linearidade e faixa de aplicação do mesmo.

A linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em exame, dentro de uma determinada faixa de aplicação. A relação matemática entre o sinal e a concentração da espécie de interesse deve ser determinada empiricamente, a partir de sinais medidos para concentrações conhecidas dessa espécie. Essa relação matemática pode ser expressa como uma equação de reta chamada de curva de calibração ou curva analítica (BARROS NETO, PIMENTEL & ARAÚJO, 2002).

Para métodos analíticos este estudo é geralmente desenvolvido preparando-se soluções padrões com, no mínimo, cinco níveis de concentração permitindo desta forma a detecção da curvatura dos dados plotados. A aceitabilidade da linearidade é geralmente julgada pela avaliação do coeficiente de correlação linear (r^2), obtido a partir do método matemático conhecido como regressão linear, definido pela interpolação da resposta do detector versus concentração do composto analisado. Um r^2 maior que 0,999 é geralmente considerado uma evidência de aceitabilidade dos dados obtidos e, conseqüentemente, da equação da reta (GREEN, 1996).

Para tanto, foi construída uma curva de calibração por padrão externo para quantificação do ácido pirúvico a partir de três soluções padrão preparadas individualmente cobrindo a faixa de linearidade de 1 a 1.000 µg/ml (FIGURA 22). Todos os pontos foram definidos a partir da média de três valores obtidos a partir de cada uma das soluções padrão, analisadas em diferentes dias. A equação obtida foi y = 7325,4x + 271,84 com o coeficiente de correlação linear igual a 0,9999. Desta forma, a relação linear confirma que os resultados são diretamente proporcionais à concentração (GREEN, 1996).

FIGURA 22. CURVA DE CALIBRAÇÃO* EM CLAE PARA O ÁCIDO PIRÚVICO

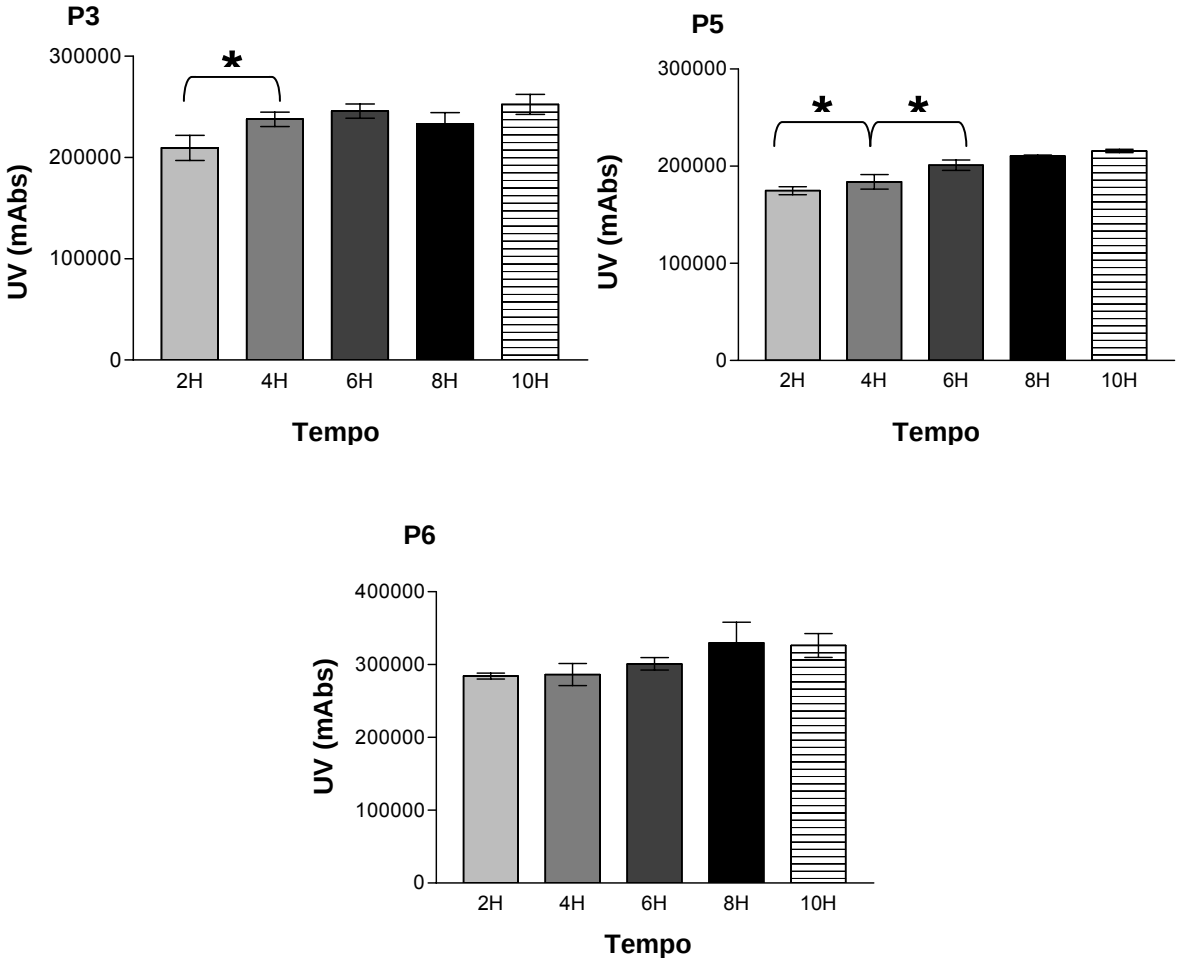


A partir destes dados realizou-se a construção de curvas de hidrólise com diferentes galactanas P3, P5 e P6 (TABELA 1) tendo-se como variável

unicamente o tempo de hidrólise das mesmas. Tal análise é justificada pelo fato que a técnica original descrita por TROYANO, et al. 1996 (TFA 1M por 6 horas a 120^{o}C) foi empregada na determinação do teor de ácido pirúvico presente em amostras de exopolissacarídeos produzidos por bactérias Gram-negativas, muito diferentes estruturalmente das galactanas sulfatadas presentes em algas vermelhas. Desta forma, as galactanas sulfatadas P3, P5 e P6 foram submetidas à hidrólise ácida (TFA 1M a 120 ^{o}C) com tempos variando de 2 a 10 horas.

Estes resultados estão demonstrados na FIGURA 23 correspondendo aos dados obtidos a partir da média mais ou menos o desvio padrão de três amostras diferentes tomadas individualmente para cada um dos tempos (2, 4, 6, 8 e 10 horas). Todas as amostras foram analisadas estatisticamente por ANOVA seguida do Teste de Tukey empregando-se o programa Graphpad Prism versão 3.02.

FIGURA 23. INFLUÊNCIA DO TEMPO DE HIDRÓLISE SOBRE O TEOR DE ÁCIDO PIRÚVICO OBSERVADO NAS GALACTANAS P3, P5 e P6



Valores expressos em relação à média mais ou menos o desvio padrão

* valores estatisticamente diferentes entre si ($p < 0,05$) por ANOVA e Teste de Tukey

Os dados desta forma obtidos indicam que para a fração P3, a partir do tempo igual há 4 horas, os valores de ácido pirúvico obtidos pela hidrólise com TFA 1M a 120 ^{o}C não apresentam diferenças significativas estatisticamente. De forma semelhante, os dados obtidos para a fração P5 indicam que a partir do tempo igual há 6 horas, os valores de ácido pirúvico obtidos pela hidrólise mostram-se estatisticamente equivalentes. A galactana P6 quando submetida à mesma análise no entanto, mostrou-se indiferente em relação ao tempo de

hidrólise, sendo que a partir de 2 horas já se observam valores para o teor de ácido pirúvico estatisticamente iguais.

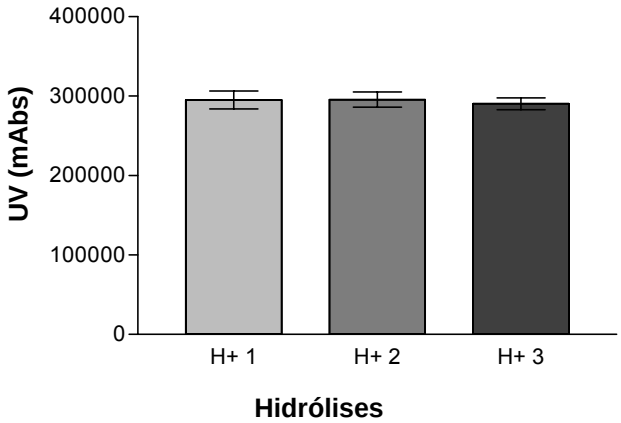
De posse destes dados pôde-se assumir o tempo de 6 horas como o mínimo necessário para a hidrólise total do ácido pirúvico presente em diferentes amostras de galactanas sulfatadas, sendo este tempo utilizado em todos os demais ensaios apresentados.

O próximo parâmetro avaliado em relação à padronização da metodologia analisada foi a repetitividade.

A repetitividade representa a concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo método, efetuado sob as mesmas condições de medição, chamadas condições de repetitividade: mesmo procedimento, mesmo analista, mesmo instrumento usado sob as mesmas condições, mesmo local, repetições em um curto intervalo de tempo (RIBANI, 2004).

O ensaio de repetitividade foi realizado empregando-se a amostra P5, sendo cada valor representativo da média mais ou menos o desvio padrão de três pontos diferentes da mesma amostra. Foram realizadas três hidrólises consecutivas em três dias distintos. Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente por ANOVA seguida do Teste de Tukey empregando-se o programa Graphpad Prism versão 3.02. (FIGURA 24).

FIGURA 24. TESTE DE REPETITIVIDADE DA METODOLOGIA EMPREGADA NA DETERMINAÇÃO DO TEOR DE ÁCIDO PIRÚVICO OBSERVADO NA GALACTANA P5



Valores expressos em relação à média mais ou menos o desvio padrão

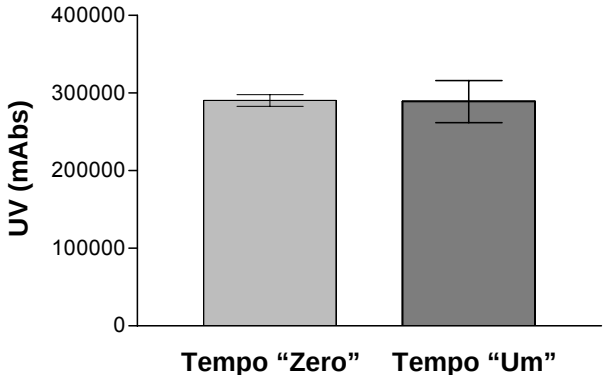
Os dados obtidos a partir do ensaio para repetitividade demonstram que a metodologia empregada é reprodutível quanto à determinação do teor de ácido pirúvico presente na amostra testada, sendo que entre as diferentes hidrólises analisadas não se observam valores estatisticamente diferentes entre si ($p < 0,05$) por ANOVA e Teste de Tukey.

O último teste ensaiado no processo de padronização da metodologia para determinação do teor de ácido pirúvico presente em amostras de polissacarídeos sulfatados obtidos de algas vermelhas avaliou a estabilidade das amostras.

A estabilidade é um aspecto essencial, pois avalia se o analito é estável em todo o sistema de solventes empregado durante o processo de análise, dentro das condições normais sob as quais a amostras será submetida (DADGAR & BURNETT, 1995).

No tempo “zero” a estabilidade do ácido pirúvico foi analisada por CLAE sendo as diferentes alíquotas da fração P5, após hidrólise com TFA 1M por 6 horas a 120 °C, foi imediatamente injetadas no sistema cromatográfico e avaliadas quanto a sua área. As amostras filtradas foram então armazenadas à temperatura de -15 °C por 48 horas, descongeladas até atingirem a temperatura ambiente e novamente injetadas no sistema cromatográfico, sendo este denominado o tempo “um” do ensaio. Os valores obtidos referem-se à média de três amostras diferentes da mesma fração, analisadas individualmente, mais ou menos o desvio padrão (FIGURA 25).

FIGURA 25. TESTE DE ESTABILIDADE NA DETERMINAÇÃO DO TEOR DE ÁCIDO PIRÚVICO OBSERVADO NA GALACTANA P5



Valores expressos em relação à média mais ou menos o desvio padrão

Os resultados para o ensaio de estabilidade indicam que as diferentes áreas obtidas não apresentam valores estatisticamente diferentes entre si ($p < 0,05$) por ANOVA e Teste de Tukey. Portanto, o ácido pirúvico é estável em todo o sistema de solventes assim como nas condições normais de análise empregadas, por até 48 horas, desde que as amostras sejam armazenadas sob temperatura de -15 °C ou inferiores.

A aplicabilidade de uma determinada metodologia analítica deve ser sempre verificada. A utilização de métodos já validados em outros laboratórios deve ser precedida por uma avaliação da conformidade ou revalidação desse método (VIEIRA & LICHTIG, 2004).

Pode-se ainda estabelecer que o objetivo de qualquer método analítico seja produzir resultados que reflitam o conteúdo do composto avaliado em amostras específicas com um padrão aceitável de acurácia (FEINBERG, 2007).

Desta forma, os resultados de padronização obtidos, realizados com a finalidade de avaliar alguns parâmetros analíticos relevantes como seletividade, linearidade, repetitividade e estabilidade do analito demonstraram que a metodologia proposta mostra-se adequada para a avaliação do teor de ácido pirúvico presente em polissacarídeos obtidos de algas vermelhas (Rhodophyta), gerando resultados seguros e confiáveis.

5. CONCLUSÕES

1 - A partir das algas vermelhas *Chondrophycus papillosus* e *Chondrophycus flagelliferus* (Ceramiales, Rhodophyta) mediante extração aquosa a 80 °C e precipitação fracionada com KCl, foram obtidos dois grupos de polissacarídeos: um insolúvel em diferentes concentrações de KCl e outro solúvel em KCl 2M.

2 - As análises químicas e espectroscópicas de RMN ^{13}C demonstraram que as frações solúveis em KCl 2M (P2S-3 e F2S-3) são compostas por agaranas constituídas principalmente por unidades dissacarídicas de β-D-galactose ligadas a α-L-3,6-anidrogalactose e β-D-galactose ligada a α-L-galactose. Observa-se também a presença nestas frações de unidades monossacarídicas de β-D-galactose 2-sulfato e substituição por acetal de ácido pirúvico na forma de 4,6-*O*-(1'-carboxietilideno)-β-D-galactopiranose.

3 - Os polissacarídeos insolúveis (P2d, P2e, F2a e F2b), precipitados em diferentes concentrações de KCl, foram caracterizados, mediante análises químicas e espectroscópicas, como xilomananas sulfatadas formadas por uma cadeia principal de unidade de β-D-manopiranose 4-*O*-ligadas, esterificadas por grupos sulfato em carbono 2 e parcialmente glicosiladas por unidades de β-D-xilose e β-D-manopiranose 2-sulfato em carbono 6. Ressalta-se que estas características estruturais são pela primeira vez descritas em algas vermelhas.

4 – O método descrito para a determinação da concentração de ácido pirúvico presente em galactanas sulfatadas de algas vermelhas, detectado por meio de espectroscopia de UV associada à CLAE, representa uma técnica simples, rápida, acurada e confiável.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUILAN J.T., BROOM J.E., HEMMINGSON J.A., DAYNT F.M., MONTAÑO M.N.E., DANCEL M.C.A., NIÑONUEVO M.R.; FURNEAUX R.H. Structural analysis of carragenan from farmed varieties of Philippine seaweed. **Bot. Mar., 46:** 179-192, 2003.

ARAKI, C.; HIRASE, S. Studies on the chemical constitution of agar-agar. XXI. Re-investigation of methylated agarose of *Gelidium amansii*. **Bull. Chem. Soc. Jap., 33:** 291-295, 1956.

ARAKI, C. Some recent studies on polysaccharides of agarophytes. **Proc. Int. Seaweed Symp., 5:** 3-16, 1966.

ASPINALL, G.O. **Polysaccharides**, First edition. Pergamon Press, New York. 228pp, 1970.

BARBAKADZE; V.V.; USOV, A.I. Polysaccharides of algae. XXVI. Methylation and periodate oxidation of polysaccharide from the red seaweed *Grateloupia divaricata* Okam. **Bioorgan. Khim., 4:** 1100-1106, 1978.

BARROS NETO, B.; PIMENTEL, M. F.; ARAÚJO, M. C. U. Recomendações para calibração em química analítica – Parte I. Fundamentos e calibração com um componente (calibração univariada). **Quim. Nova, 25:** 856-865. 2002.

BATEY, J.F.; TURVEY, J.R. The galactan sulphate of the red alga *Polysiphonia lanosa*. **Carbohydr. Res., 43:** 133-143, 1975.

BELLION, C., BRIGAND, G., PROME, JC., BOCIEK, D.W. Identification et caractérisation des précurseurs biologiques des carraghénanes par spectroscopie de RMN – ^{13}C. **Carbohydr. Res., 119:** 31-48, 1983.

BOCIEK, S. M.; IZZARD, M. J.; MORRISON, A.; WELTI, D. The ^{13}C-n.m.r. spectra of (1→6)-α-D-galactosyl-(1→4)-β-D-mannans. **Carbohydr. Res., 93:** 279-283, 1981.

BOWKER, D.M.; TURVEY, J.R. Water-soluble polysaccharides of the red alga *Laurencia pinnatifida*. Part I. Constituent units. **J. Chem. Soc. C.,** 983-988,1968a.

BOWKER, D.M.; TURVEY, J.R. Water-soluble polysaccharides of the red alga *Laurencia pinnatifida*. Part II. Methylation analysis of the galactan sulphate. **J. Chem. Soc.**, p. 989-992, 1968b.

CARLUCCI, M.J.; PUJOL, C.A.; CIANCIA, M.; NOSEDA, M.D.; MATULEWICZ, M.C.; DAMONTE, E.B.; CEREZO, A.S. Antiherpetic and anticoagulant properties of carrageenans from the red seaweed *Gigartina skottsbergii* and their cyclized derivatives: correlation between structure and biological activity. **Int. J. Biol. Macromol., 20:** 97-105, 1997.

CEREZO, A.S. The carrageenan system of *Gigartina skottsbergii* S. *et* G. Part I. Studies on a fraction of kappa-carrageenan. **J. Chem. Soc.,** (C), p. 992-997, 1967.

CEREZO, A.S.; LEZEROVICH, A.; LABRIOLA, R. A xylan from the red seaweed *Chaetangium fastigiatum*. **Carbohydr. Res., 19:** 289-296, 1971.

CHEN, P.; NIE, L-H.; YAO, S-Z. Determination of lactic acid and pyruvic acid in serum and cerebrospinal fluid by ion-exclusion chromatography with a bulk acoustic wave detector. **J. Chromat. B., 673:** 153-158, 1995.

CHIOVITTI, A.; LIAO, M-L.; KRAFT, G.T.; MUNRO, S.L.A.; CRAIK, D.; BACIC, A. Cell wall polysaccharides from australian red algae of family Solieriaceae (*Gigartinales*, Rhodophyta): Highly methylated carrageenans from the genus *Rhabdonia*. **Bot. Mar., 37:** 47-59, 1996.

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

CHIOVITTI, A.; BACIC, A.; CRAIK, D.J.; MUNRO, S.L.A.; KRAFT, G.T.; LIAO, M-L. Carrageenans with complex substitution patterns from red algae of the genus *Erythroclonium*. **Carbohydr. Res.**, **305:** 243-252, 1998.

CHIOVITTI, A.; BACIC, A.; CRAIK, D.J.; KRAFT, G.T.; LIAO, M.L. A nearly idealized 6'-*O*-methylated ι-carrageenan from the Australian red algae *Claviclonium ovatum* (Acrotylaceae, Gigartinales). **Carbohydr. Res., 339:** 1459-1466, 2004.

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

CHOPIN, T.; KERIN, B.F.; MAZEROLLE. Gigartinales symposium. Phycocolloid chemistry as a taxonomic indicator of phylogeny in the Gigartinales, Rhodophyceae: A review and current developments using Fourier transform infrared diffuse reflectance spectroscopy. **Phycol. Res., 47:** 167-188, 1999.

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

COLE, K.M.; SHEATH, R.G. **Biology of the red algae.** Cambridge University Press, Cambridge, 517pp, 1990.

DADGAR, D.; BURNETT, P. E. Issues in evaluation of bioanalytical method selectivity and drug stability. **J. Pharm. and Biom. Anal., 14:** 23-31, 1995.

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

DiNINNO, V.; McCANDLESS, E. L.; BELL, R. A. Pyruvic acid derivative of a carrageenan from a marine red alga (*Petrocellis* species). **Carbohydr. Res., 71:** C1-C4, 1979.

DOGSON, K.S.; PRICE, R.G. A note on the determination of the ester sulphate content of sulphated polysaccharides. **Biochem. J., 84:** 106-110, 1962.

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

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

DUARTE, M.E.R.; CAUDURO, J.P.; NOSEDA, M.D.; GOLÇALVEZ, A.G.; PUJOL, C.A.; DAMONTE, E.B; CEREZO, A.S. The structure of the agaran sulfate from *Acanthophora spicifera* (Rhodomelaceae, Ceramiales) and its antiviral activity. Relation between structure and antiviral activity in agarans. **Carbohydr. Res., 339:** 335-347, 2004.

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

DUCKWORTH, M; YAPHE, W. Definitive assay for pyruvic acid in agar and others algal polysaccharides**. Chem. Ind., 23**: 747-748, 1970.
DUCKWORTH, M; YAPHE, W. The structure of agar. Part I. Fractionation of a complex mixture of polysaccharides**. Carbohydr. Res., 16:** 189-197, 1971.

EITEMAN, M. A. & CHASTAIN, M. J. Optimization of the ion-exchange analysis of organic acids from fermentation. **Anal. Chim. Acta, 338:** 69-75, 1997.

ERREA, M. I.; MATULEWICZ, M. C. Hot water-soluble polysaccharides from tetrasporic *Pterocladia capillacea*. **Phytochem., 42:** 1071-1073, 1996.

ERREA, M.I.; MATULEWICZ, M.C. Unusual structures in the polysaccharides from the red seaweed *Pterocladiella capillacea* (Gelidiaceae, Gelidiales). **Carbohydr. Res., 338:** 943-953, 2003.

ESTEVEZ, J.M.; CIANCIA, M.; CEREZO, A.S. DL-Galactan hybrids and agarans from gametophytes of the red seaweed *Gymnogongrus torulosus*. **Carbohydr. Res., 331:** 27-41, 2001.

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

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

FALSHAW, R.; FURNEAUX, R.H.; WONG, H. Analysis of pyruvylated β-carrageenan by 2D NMR spectroscopy and reductive partial hydrolysis. **Carbohydr. Res., 338:** 1403-1414, 2003.

FALSHAW, R.; BIXLER, H.J.; JOHNDRO, K. Structure and performance of commercial κ-carrageenan extracts. Part III. Structure analysis and performance in two dairy applications of extracts from New Zealand red seaweed, *Gigartina arthropurpurea*. **Food Hydrocolloids,** Oxford, v. 17, p. 129-139, 2003b.

FARIAS, W.R.; VALENTE, A.P.; PEREIRA, M.S.; MOURÃO, P.A.S. Structure and anticoagulant activity of sulfated galactans. **J. Biol. Chem., 275:** 29299-29307, 2000.

FEINBERG, M. Validation of analytical methods based on accuracy profiles. **J. Chromat. A., 1158:** 174-183, 2007.

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

FLORES, M. L.; STORTZ, C. A.; CEREZO, A. S. Studies on the skeletal cell wall of the cystocarpic stage of the red seaweed *Iridaea undulosa* B. Part II. Fractionation of the cell wall and methylation analysis of tne inner core-fibrilar polysaccharides. **Intern. J. Biol. Macromol., 27:** 21-27, 2000.

FRIEDEMANN, T. E., HAUGEN, G. E., Pyruvic acid. II. The determination of keto acids in blood and urine. **J. Biol. Chem., 147:** 415-442, 1943.

FURNEAUX, R.H.; MILLER, I.J.; STEVENSON, T.T. Agaroids from New Zealand members of the Gracilariaceae (Gracilariales, Rhodophyta) – a novel dimethylated agar. **Hydrobiol., 204/205:** 645-654, 1990.

GARBARY, D. J.; HARPER, J. T. A phylogenetic analysis of the *Laurencia* complex (Rhodomelaceae) of red algae. **Cryptogamie Algologie 19:** 185-200, 1998.

GAREGG, P.J.; LINDBERG, B.; KVARNSTRÖM, I. Preparation and N.M.R. studies of pyruvic acid and related acetals of pyranosides: configuration at the acetal carbon atoms. **Carbohydr. Res., 77:** 71-78, 1979.

GLICKSMAN M. Utilization of seaweed hydrocolloids in the food industry. **Hydrobiologia.,** v. 151/152, p. 31-47, 1987.

GORIN, P.A.J.; ISHIKAWA, T. Configuration of pyruvic acid ketal, 4,6-*O*-linked to D-galactose units, in bacterial and algal polysaccharides. **Can. J. Chem., 45:** 521-532, 1967.

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

GREEN, J. M. A practical guide to analytical method validation. **Anal. Chem., 68:** 305A-309A, 1996.

GÜZEL-SEYDIM, Z. B.; SEYDIM, A. C.; GREENE, A. K. e BODINE, A. B. Determination of organic acids and volatile flavor substances in Kefir during fermentation. **J. Food Comp. Anal., 13:** 35-43, 2000.

HAINES, H. H.; MATULEWICZ, M.C.; CEREZO, A.S. sulfated galactans from the red seaweed *Nothogenia fastigiata* (Nemaliales, Rhodophyta). **Hydrobiologia, 204/205:** 637-643, 1990.

HIRASE, S. Studies on the chemical constitution of agar-agar. 19. Pyruvic acid as a constituent of agar-agar. (1). Identification and estimation of pyruvic acid in the hydrolysate of agar. **Bull. Chem. Soc. Jpn.**, **30:** 68-79,1957.

HIRASE, S.; ARAKI, C.; WATANABE, K. Component sugars of the polysaccharide of the red seaweed *Grateloupia elliptica*. **Bull. Chem. Soc. Jpn., 40:** 1445-1448, 1967.

HIRASE, S.; WATANABE, K. The presence of pyruvate residues in λ-carrageenan and a similar polysaccharide. **Bull. Inst. Chem. Res., Kyoto Univ.**, **50:** 332-336, 1972.

HIRASE, S.; WATANABE, K.; TAKANO, R.; TAMURA, J. Structural features of sulfated polysaccharide isolated from the red seaweed *Laurencia undulata*. International Carbohydrate Symposium, 11., Vancouver, 1982. **Abstracts**. Vancouver, 1982, p.III-12.

HÖIJE, A.; SANDSTRÖM, C.; ROUBROEKS, J. P.; ANDERSSON, R.; GOHIL, S.; GATENHOLMA, P. Evidence of the presence of 2-O-β-D-xylopyranosyl-α-l-arabinofuranose side chains in barley husk arabinoxylan. **Carbohydr. Res., 341:** 2959-2966, 2006.

HORTA, P.A.; OLIVEIRA, E.C. **Citação e referência a documentos eletrônicos** disponível em: <http://www.ib.usp.br/algamare-br/> Acesso em 29 de julho de 2007.

HUA, Y-f.; ZHANG, M.; FU, C-x.; CHEN, Z-h.; CHAN, G. Y. S. Structural characterization of a 2-*O*-acetylglucomannan from *Dendrobium officinale* stem. **Carbohydr. Res., 339:** 2219-2224, 2004.

ISHRUD, O.; ZAHID, M.; ZHOU, H.; YUANJIANG, P. A water-soluble galactomanan from the seeds of *Phoenix dactylifera* L. **Carbohydr. Res., 335:** 297-301, 2001.

JANSSON, P.; KENNE, L.; LIEDRGREN, H.; LINDEBERG, B.; JÖNNGREN, J. A pratical guide to the metylation analysis of carbohydrates. **Chem. Commun., 8:** 1-71, 1976.

JOL et al. . Novel High-Performance Anion-Exchange Chromatographic method for the analysis of carrageenans and agars containing 3,6-Anhydrogalactose. **Anal. Biochem., 268:** 213-222. 1999.

KARSTEN, U.; WEST, J.A.; ZUCCARELLO, G.C.; NIXDORF, O.; BARROW, K.D.; KING, R.J. Low molecular weight carbohydrate patterns in the Bangiophyceae (RHODOPHYTA). **J. Phycol., 35:** 967-976, 1999.

KARSTEN, U.; WEST, J.A.; ZUCCARELLO, G.C.; ENGBRODT, R.; YOKOYAMA, A.; HARA, Y.; BRODIE, J. Low molecular weight carbohydrate of the Bangiophyceae (RHODOPHYTA). **J. Phycol., 39:** 584-589, 2003.

KARSTEN, U.; MICHALIK, D.; MICHALIK, M.; WEST, J. A. A new unusual low molecular weight carbohydrate in the red algal genus *Hypoglossum* (Delesseriaceae, Ceramiales) and its possible function as an osmolyte. **Planta, 222:** 319-326, 2005.

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

KOEPSELL, H. J.; SHARPE, E. S. Microdetermination of pyruvic and α-ketoglutaric acids. **Archives of Biochemistry and Biophysics, 38:** 443-449, 1952.

KOLENDER, A.A.; MATULEWICZ, M.C.; CEREZO, A.S. Structural analysis of antiviral sulfated α-D-(1→3)-linked mannans. **Carbohydr. Res., 273:** 179-185, 1995.

KOLENDER, A.A.; PUJOL, C.A.; DAMONTE, E.B.; MATULEWICZ, M.C.; CEREZO, A.S. The system of sulfated α-(1→3)-linked D-mannans from the red seaweed *Nothogenia fastigiata*: Structures, antiherpetic and anticoagulant properties. **Carbohydr. Res., 304:** 53-60, 1997.

KOLENDER, A.A., MATULEWICZ, M.C. Sulfated polysaccharides from the red seaweed *Georgiella confluens.* **Carbohydr. Res.;** Amsterdam, v. 337, p. 57-68, 2002.

KOVAC, P.; HIRSCH, J. ^{13}C-N.M.R. spectra of xylo-oligosaccharides and their application to the elucidation of xylan structures. **Carbohydr. Res., 85:** 177-185, 1980.

KRAFT, G.T. Rhodophyta: morphology and classification. In: Lobban, C.S.; Wynne, M.J. **The Biology of seaweeds**, Berkeley: University of California, 1981.

LAHAYE, M.; YAPHE, W.; ROCHAS, C. ^{13}C-NMR-spectra analysis of sulfated and desulfated polysaccharides of the agar type. **Carbohydr. Res., 143:** 240-245, 1985.

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

LAHAYE, M.; RONDEAU-MOURO, C.; DENIAUD, E.; BULÉON, A. Solid-state ^{13}C spectroscopy studies of xylans in the cell wall of *Palmaria palmata* (L. Kuntze, Rhodophyta). **Carbohydr. Res., 338,** 1559-1569, 2003.

LEE, R.E. **Phycology**, Second edition. Cambridge University Press, Cambridge. 645pp, 1989.

LOBBAN, C.S.; HARRISON, P.J. **Seaweed ecology and physiology**. First edition. Cambridge University Press, Cambridge. 366pp, 1994.

MANZI, A. E.; CEREZO, A. S. High resolution ^{13}C spectroscopy of legume-seed galactomannans. **Carbohydr. Res., 148:** 189-197, 1986.

MATULEWICZ, M.C.; CEREZO, A.S. Alkali-soluble polysaccharides from *Chaetangium fastigiatum*: structure of a xylan. **Phytochem., 26:** 1033-1035, 1987a.

MATULEWICZ, M.C.; CEREZO, A.S Water-soluble sulfated polysaccharides from the red seaweed *Chaetangium fastigiatum*. Analysis of the system and the structure of the α-D-(1$\rightarrow$3)-linked mannans. **Carbohydr. Polym., 7:** 121-132, 1987b.

MATULEWICZ, M. C.; CIANCIA, M.; NOSEDA, M. D.; CEREZO, A. S. Carrageenan systems from tetrasporic and cystocarpic stages of *Gigartina skottsbergii*. **Phytochem., 28:** 2937-2941, 1989.

MATULEWICZ, M.C.; HAINES, H.H.; CEREZO, A.S. Sulphated xylogalactans from *Nothogenia fastigiata*. **Phytochem., 36:** 97-103, 1994.

McCANDLESS, E.L.; CRAIGIE, J.S. Sulfated polysaccharides in red and brown algae. **Annual Ver. Plant Physiology, 30:** 41-53, 1979.

McCANDLESS, E.L.; WEST, J.A.; GUIRY, M.D. Carrageenan patterns in Phyllophoraceae. **Biochem. Syst. Ecol., 10:** 275-284, 1982.

MELO, M.R.S.; FEITOSA, J.P.A.; FREITAS, A.L.P.; de PAULA, R.C.M. Isolation and characterization of soluble sulfated polysaccharide from the red seaweed Gracilaria cornea. **Carbohydr. Polym., 49:** 491-498, 2002.

MILLER, I.J.; FALSHAW, R.; FURNEAUX, R.H. The chemical structures of polysaccharides from New Zealand members of the Rhodomelaceae. **Bot. Mar.**, **36:** 203-208, 1993.

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

MILLER, I.J. The chemotaxonomic significance of the water soluble red algal polysaccharides. **Recent Res. Develop. Phytochem., 1:** 531-565, 1997.

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

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

MILLER, I. J.; BLUNT, J. W. New ^{13}C NMR methods for determining the structure of algal polysaccharides. Part 2. Galactans consisting of mixed diads. **Bot. Mar., 43:** 251-261, 2000a.

MILLER, I. J.; BLUNT, J. W. New ^{13}C NMR methods for determining the structure of algal polysaccharides. Part 3. The structure of the polysaccharide from *Cladhymenia oblongifolia*. **Bot. Mar., 43:** 263-271, 2000b.

MILLER, I.J.; BLUNT, J.W. Evaluation of the structure of the polysaccharides from *Chondria macrocarpa* and *Ceramium rubrum* as determined by ^{13}C-NMR spectroscopy. **Bot. Mar., 45:** 1-8, 2002.

MILLER, I.J. Evaluation of the structures of polysaccharides from two New Zealand members of the Rhodomelaceae by ^{13}C NMR spectroscopy. **Bot. Mar., 46:** 386-391, 2003a.

MILLER, I.J. Evaluation of the structures of polysaccharides from two New Zealand members of the Ceramiaceae. **Bot. Mar., 46:** 378-385, 2003b.

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

NAM, K. W. Morphology of *Chondrophycus undulata* and *C. parvipapillata* and its implications for the taxonomy of the *Laurencia* (Ceramiales, Rhodophyta) complex. **European Journal of Phycology 34:** 455-468, 1999.

NERINCKX, W.; BROBERG, A.; DUUS, J.O.; NTARIMA, P.; PAROLIS, L.A.S.; PARILIS, H.; CLAEYSSENS, M. Hydrolysis of *Nothogenia erinacea* xylan by xylanases from families 10 and 11. **Carbohydr. Res., 339**: 1047-1060, 2004.

NOSEDA, M.D. **Polissacarídeos sulfatados isolados da fase tetrasporofítica de *Gigartina skottisbergii* (Rhodophyta, Gigartinales).** Tese

de doutorado, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Paraná. 173p, 1994.

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

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

NUNN, J.R.; PAROLIS, H.; RUSSEL, I. Polysaccharides of red alga *Chaetangium erinaceum*. Part I. Isolation and characterization of the water-soluble xylan. **Carbohydr. Res., 26:** 169-180, 1973.

PAINTER, T.J., in ASPINALL, G.O. (Ed.) **The Polysaccharides**, Vol. 2, Academic Press, New York. pp 195-285, 1983.

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

RAMESH, H. P.; YAMAKI, K.; ONO, H.; TSUSHIDA, T. Two-dimensional NMR spectroscopic studies of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) galactomannan without chemical fragmentation. **Carbohydr. Polym., 45:** 69-77, 2001.

RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E. **Biologia Vegetal**, Quinta edição. Guanabara/Koogan, Rio de Janeiro. p 248-259, 2001.

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

RENN, D. Biotechnology and the red seaweed polysaccharide industry: status, needs and prospects. **Trends Biotechnol., 15:** 9-14, 1997.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Quim. Nova, 27:** 771-780, 2004.

SAITO, R.M.; OLIVEIRA, E.C. Chemical screening of Brazillian marine algae producing carrageenans**. Hydrobiol., 204/205**: 585-588, 1990.

SANTOS, A. F.; RIBEIRO, C. A.; POLESE, L.; ERNANDES, J. R.; KESSERLINGH, S. M.; NONATO, R. V. Determinação de parâmetros de validação de métodos cromatográficos para análise de 5-hidroximetilfurfural e açúcares em amostras de processos de produção de poímero biodegradável. **Ecl. Quim., 31:** 13-20, 2006.

SASSAKI, G.L.; GORIN, P. A. J.; SOUZA, L. M.,; CZELUSNIAK, P. A.; IACOMINI, M. Rapid synthesis of partially *O*-methylated alditol acetate standarts for GC-MS: some relative activities of hydroxyl groups of methyl glycopiranosides of Purdie methylation. **Carbohydr. Res., 340:** 731-739, 2005.
SATORU, K.; TANIGAWA, N.; NAKAGAWA, H.; SOEDA, S.; SHIMENO, H. Oversulfation of fucoidan enhances its anti-angiogenic and antitumor activities. **Biochem. Pharm., 65:** 173-179, 2003.

SEN, S.A.K; DAS, A. K.; SARKAR, K. K.; SIDDHANTA A. K; TAKANO, R.; KAMA, K.; HANA, R. An agaroid-carrageenan hybrid type backbone structure for the antithrombotic sulfated polysaccharide from *Grateloupia indica* Boergensen (Halymeniales, Rhodophyta). **Bot. Mar., 45:** 331-338, 2002.

SLONEKER, J. H.; ORENTAS, D. G. Pyruvic Acid, a Unique Component of an Exocellular Bacterial Polysaccharide. **Nature, 40:** 478-479, 1962.

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

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

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

STORTZ, C.A.; CEREZO, A.S. Novel findings in carrageenans, agarans and "hybrid" red seaweed galactans. **Curr. Topics Phytochem., 4:** 121-134, 2000.

TAKANO, R.; YOKOI, T.; KAMEI, K.; HARA, S.; HIRASE, S. Coexistence of agaroid and carrageenan structures in a polysaccharide from the red seaweed *Rhodomela larix* (Turner) C. Ag. **Bot. Mar., 42:** 183-188,1999.

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

TAKANO, R.; SHIOMOTO, K.; KAMEI, K.; HARA, S.; HIRASE, S. Occurrence of carrageenan structure in an agar from the red seaweed *Digenea simplex* (Wulfen) C. Agardh (Rhodomelaceae, Ceramiales) with a short review of carrageenan-agarocolloid hybrids in the Florideophycidae. **Bot. Mar., 46:** 142-150, 2003.

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

TROYANO, E.; LEE, S-P.; RHA, C. K.; SINSKEY, A. J. Presence of acetate and succinate in the exopolysaccharide produced by *Zoogloea ramigera* 115SLR. **Carbohydr. Polym., 31:** 35-40, 1996.

TRUUS, K.; VAHER, M.; USOV, A.I.; PEHK, T.; KOLLIST, A. Gelling galactans from the red algal community of *Furcellaria lumbricalis* and *Coccotylus truncatus* (the Baltic Sea, Estonia): a structure-properties study. **Int. Biol. Macromol., 21:** 89-96, 1997.

TRUUS, K., Tuvikene, R., Vaher, M., Kailas, T., Toomik, P., Pehk, T. Structural and compositional characteristics of gelling galactan from the red alga *Ahnfeltia tobuchiensis* (Ahnfeltiales, the Sea of apan). **Carbohydr. Polym., 63:** 130-135, 2006.

USOV, A.I.; ADAMYANTS, K.S.; YAROTSKY, S.V.; ANOSHINA, A.A.; KOCHETKOV, N.K. The isolation of a sulphated mannan and a neutral xylan from the red seaweed *Nemalion vermiculare* Sur. **Carbohydr. Res., 26:** 282-283, 1973.

USOV, A.I.; YAROTSKII, S.V.; SHASHKOV, A.S. ^{13}C-NMR spectroscopy of red algal galactans. **Biopolymers, 19:** 977, 1980.

USOV, A.I.; YAROTSKII, S.V.; ESTEVEZ, M.L. Polysaccharides of algae. XXXII. Polysaccharides of the red seaweed *Galaxaura squalida* Kjellm. **Zh. Obshch. Khim.7:** 1261-1270, 1981.

USOV, A.I.; IVANOVA, E.G.; SHASHKOV, A.S. Polysaccharides of algae. XXXIII: Isolation and ^{13}C-NMR spectral study of some new gel-forming polysaccharides from Japan sea red seaweeds. **Bot. Mar., 26:** 285-294, 1983.

USOV, A.I. NMR Spectroscopy of Red Seaweed Polysaccharides: Agars, Carrageenans and Xylans. **Bot. Mar., 27:** 189-202, 1984.

USOV, A.I.; IVANOVA, E.G. Polysaccharides of algae. XXXVII: Characterization of hybrid structure of substituted agarose from *Polysiphonia morrowii* (Rhodophyta, Rhodomelaceae) using β-agarase and ^{13}C-NMR spectroscopy. **Bot. Mar., 30:** 365-370, 1987.

USOV, A.I.; DOBKINA, I.M. Polysaccharides of algae. XXXVIII. Polysaccharide composition of the red seaweed *Liagora* sp. And the structure of sulfated xylomannan. **Bioorg. Khim. 14:** 642-651, 1988.

USOV, A.I; IVANOVA, E.G.; ELASHVILI, M.Y. Polysaccharides of the algae 41. Characterization of water-soluble polysaccharides from several representatives of the genus *Laurencia* (Ceramiales, Rhodophyta). **Bioorg. Khim., 15:** 1259-1267, 1989.

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

USOV, A.I.; KLOCHKOVA, N.G. Polysaccharides of algae. 45. Polysaccharide composition of red seaweeds from Kamachatka coastal waters (Notrhwestern Pacific) studied by reductive hydrolysis of biomass. **Bot. Mar., 35:** 371-378, 1992.

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., 303:** 93-102, 1997.

USOV, A.I.; ELASHVILI, M.Ya. Polysaccharides from algae. 51. Partial reductive hydrolysis of sulfated galactan from red alga *Laurencia coronopus* J. Ag. (Rhodophyta, Rhodomelaceae). **Russian J. of Bioorg. Chem.**, v. 23(6), p. 468-473, 1997.

USOV, A.I. Structural analysis of red Seaweed galactans of agar and carrageenan groups. **Food Hydrocolloids, 12:** 301-308, 1998.

VALIENTE, O.; FERNANDEZ, L.E.; PEREZ, R.M.; MARQUINA, G. Partial methanolysis of the agar-type sulfated galactan of the red seaweed *Laurencia gemmifera*. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 243, p. 191-197, 1993.

VAN DEN HOEK, C.; MANN, D.G.; JAHNS, H.M. **ALGAE, An introduction to phycology**, First edition. Cambridge University Press, Cambridge. 627pp, 1989.

VIANA, A.G.; NOSEDA, M.D.; DUARTE, M.E.R.; CEREZO, A.S. Alkali modification of carrageenans. Part V. The iota-nu hybrid carrageenan from *Eucheuma denticulatum* and its cyclization to iota-carrageenan. **Carbohydr. Polym., 58:** 455-460, 2004.

VIEIRA, E.; LICHTIG, J. Validação de métodos cromatográficos em análise de resíduos de pesticidas. **Arq. Inst. Biol., 71:** 303-305, 2004.

VERHOEF, R.; WAARD, P. de W.; SCHOLS, H. A.; SIIKA-AHO, M.; VORAGEN, A. G. J. *Methylobacterium* sp. isolated from a Finnish paper machine produces a highly pyruvated galactan exopolysaccharide. **Carbohydr. Res., 338:** 1851-1859, 2003.

YOO, K. S., PIKE, L. M. Determination of background pyruvic acid concentration in onions, *Allium* species, and other vegetables. **Scientia Horticulturae, 89:** 249-256 (2001).

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

ZIBETTI, R., G., M.; NOSEDA, M. D.; CEREZO, A. S.; DUARTE, M. E. R. The system of galactans from *Cryptonemia crenulata* (Halymeniaceae, Halymeniales) and the structure of two major fractions. Kinetic studies on the

alkaline ciclization of the unusual diad G2S→D(L)6S. **Carbohydr. Res., 340:** 711-722, 2005.

ZIBETTI, R.G.M. **Determinação da estrutura química de polissacarídeos isolados de algas pertencentes à ordem Halymeniales (Rhodophyta).** Tese de Doutorado. Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Parana. 198p, 2005.

ANEXOS

Available online at www.sciencedirect.com
ScienceDirect
Carbohydrate Research 342 (2007) 2766–2775
Carbohydrate RESEARCH

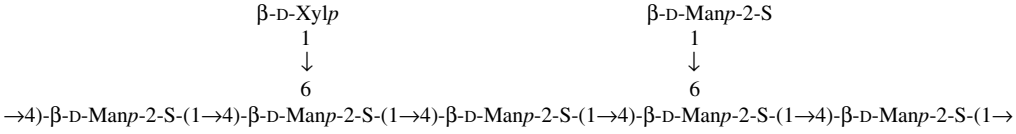
Sulfated xylomannans isolated from red seaweeds *Chondrophycus papillosus* and *C. flagelliferus* (Ceramiales) from Brazil

Marco A. Cardoso,[a] Miguel D. Noseda,[a] Mutue T. Fujii,[b] Rosiane G. M. Zibetti[c] and Maria E. R. Duarte[a,*]

[a]*Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Paraná, PO Box 19046, CEP 81531-990, Curitiba, Paraná, Brazil*
[b]*Instituto de Botânica, Seção de Ficologia, PO Box 3005, CEP 04301-012 São Paulo, São Paulo, Brazil*
[c]*Instituto de Ensino Superior Pequeno Príncipe, Curitiba, Paraná, Brazil*

Received 24 July 2007; received in revised form 29 August 2007; accepted 30 August 2007
Available online 7 September 2007

Abstract—Sulfated xylomannans were isolated from two species of genus *Chondrophycus* by aqueous extraction followed by KCl fractionation. Structural determination of the native, desulfated and Smith-degraded KCl-precipitated polysaccharides carried out by composition and methylation analysis and NMR spectroscopy (1D and 2D experiments) showed the following general structure:



These xylomannans present different degrees of branching (15–25%) by β-D-Xyl*p* (70–80%) and β-D-Man*p*-2-S (20–30%) and molecular weights (33–222 kDa). This is the first report of the presence of a sulfated xylomannan in species of order Ceramiales.
© 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Algal polysaccharides; Sulfated xylomannan; NMR spectroscopy; Methylation analysis; Red seaweeds; *Chondrophycus*; Ceramiales

1. Introduction

Carrageenans and agarans are the principal sulfated polysaccharides synthesized by the great majority of red seaweeds (Rhodophyta). They are constituted by alternating 3-linked β-D-galactopyranosyl and 4-linked α-galactopyranosyl (or 3,6-anhydrogalactopyranosyl) units. The configuration of the 4-linked units D- or L- defines the group of carrageenans and agarans, respectively.[1] A third group of galactans, named DL-hybrids,[2] described for some species, presents the 4-linked units in both D- and L-configuration. All these galactans can present substitution by sulfate and/or methyl groups, acetals of pyruvic acid and single stubs of xylose.[1,2]

Nevertheless, other types of polysaccharides are synthesized by red algae. Sulfated xylomannans[3–11] have been described for species of Nemaliales as well as neutral xylans were isolated from Nemaliales[12–15] and Palmariales.[15–17] The former are constituted by a main chain of 3-linked α-D-mannopyranosyl[3–10] or β-D-mannopyranosyl residues[11] with different patterns of substitution by sulfate groups and branches.

Here, we describe the structure of a xylomannan sulfate isolated from two species of order Ceramiales collected in northeastern and southern Brazil. *Chondrophycus flagelliferus* and *Chondrophycus papillosus* are

* Corresponding author. Tel.: +55 41 33611663; fax: +55 41 32662042; e-mail: eugenia.duarte@pq.cnpq.br

0008-6215/$ - see front matter © 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.
doi:10.1016/j.carres.2007.08.024

cosmopolitan algae and in Brazil both species are widely distributed along the coast.[18] As far as we know this is the first report of the presence of a xylomannan sulfate in red seaweeds of order Ceramiales.

2. Results and discussion

2.1. Extraction and fractionation of polysaccharides

The carefully cleaned and milled seaweeds *C. flagelliferus* and *C. papillosus* collected in the northeastern coast of Brazil were submitted to aqueous extraction at 25 °C giving rise to crude extracts F1 and P1 (3.0% and 3.1% w/w, respectively). The algal residues were further extracted with water at 80 °C yielding F2 and P2 (10.6% and 8.7% w/w, respectively). *C. flagelliferus* collected in the southern coast of Brazil was carefully examined to avoid contamination with epiphytes and endophytes, and its water-soluble polysaccharides were extracted at 80 °C, rendering FH fraction (15% w/w). The hot-water extracts F2, P2 and FH contain sulfate (17.5–22.2%) and are constituted by galactose (40.0–49.5 mol %), 3,6-anhydrogalactose (11.1–13.8), 3,6-anhydro-2-*O*-methylgalactose (1.0–1.3), 6-*O*-methylgalactose (5.9–9.0), xylose (7.4–11.0) and important amounts of mannose (20.3–26.0). Additionally, the fraction FH showed small amounts of 2-*O*-methylgalactose (Tables 1 and 2). Considering that red seaweeds from Ceramiales produce agarans[19–28] as the principal water-soluble polysaccharides, the monosaccharide composition of these crude extracts was suggestive of the presence of galactans besides other types of polysaccharides such as xylomannans, mannans and/or xylans.

In order to fractionate these extracts, F2 and P2 were treated with increasing concentrations of KCl (0–2 M) yielding the precipitated fractions F2a–F2d (24% w/w) and P2a–P2e (19% w/w) and the respective soluble fractions in 2 M KCl (F2-S and P2-S). FH was treated with 2 M KCl to afford the KCl-precipitated fraction FH-p (28% w/w) and the KCl-soluble fraction FH-S. Yields, analyses, optical rotations and monosaccharide composition of the crude extracts and fractions obtained by KCl treatment are given in Tables 1 and 2. Polysaccharidic fractions F2a and F2b showed an unusual monosaccharide composition, made up of mannose (90.7 and 85.0 mol %) and xylose (9.3 and 15.0 mol %), whereas F2c and F2d besides major amounts of the same sugars (Man plus Xyl ~64 mol %) contained the characteristic galactan units, such as galactose, 3,6-anhydrogalactose and/or its 6- and 2-methylated derivatives, respectively.

Likewise, P2 also gave rise to KCl-precipitated fractions (P2d and P2e) made up of only mannose and xylose, besides others containing the same set of monosaccharides (P2a–P2c) observed for F2c and F2d fractions. FH-p fraction contained principally mannose (68.2 mol %) and xylose (15.5 mol %) together with minor quantities of other monosaccharides. On the other hand, all the KCl-soluble fractions (F2-S, P2-S and FH-S) showed a different monosaccharide composition in relation to the precipitated ones, with galactose and

Table 1. Yield, analyses and optical rotation of the fractions obtained from *C. flagelliferus* and *C. papillosus*

Fractions[a]	Range of fractionation (M KCl)	Yield (%)	$[\alpha]_D$ (°)	Carbohydrate (%)	Sulfate (SO_3Na) (%)
F2	—	10.5[b]	−17.3	58.3	20.2
F2a	0.25	16.7[c]	−26.6	57.0	24.5
F2a-D	—	52.0	n.d.	n.d.	2.9
F2a-sm	—	70.0	n.d.	n.d.	n.d.
F2b	0.5	4.2[c]	−31.5	59.2	24.0
F2b-D	—	71.7	n.d.	n.d.	—
F2c	0.75	1.6[c]	−27.7	63.4	13.4
F2d	1.0	1.2[c]	−29.4	61.6	12.9
F2-S	Soluble 2.0	76.3[c]	−28.7	56.8	19.3
P2	—	8.7[b]	−12.0	61.2	17.5
P2a	0.25	9.1[c]	−28.8	51.5	19.1
P2b	0.5	2.6[c]	−36.2	44.0	20.9
P2c	0.75	0.6[c]	−40.3	45.2	17.4
P2d	1.0	3.2[c]	−31.9	67.0	28.1
P2d-D	—	75.3	n.d.	n.d.	—
P2e	1.5	3.7[c]	−32.4	55.7	25.1
P2e-D	—	58.8	n.d.	n.d.	3.4
P2-S	Soluble 2.0	80.8[c]	−27.4	57.2	16.6
FH	—	15.0[b]	−18.0	59.0	22.2
FH-p	2.0	28.0	−30.5	57.0	24.1
FH-S	Soluble 2.0	72.0[c]	−29.0	60.0	27.2

n.d. = not determined.

[a] Fractions are defined in the text.

[b] Percentage based on milled seaweed.

[c] Percentage based on material recovered from KCl fractionation. Yields of fractionation were 88.6, 88.4 and 93.0% for F2, P2 and FH, respectively.

Table 2. Monosaccharide composition of the fractions obtained from *C. flagelliferus* and *C. papillosus*

Fractions[a]	Monosaccharide (mol %)[b]						
	Xyl	Man	Gal	3,6-AnGal	6Me-Gal	2Me-AnGal	2Me-Gal
F2[c,d]	7.4	23.1	49.5	11.1	7.6	1.3	t.r.
F2a[e]	9.3	90.7	—	—	—	—	—
F2a-D[e]	10.0	90.0	—	—	—	—	—
F2a-sm[e]	—	100.0	—	—	—	—	—
F2a-sm-D[e]	—	100.0	—	—	—	—	—
F2b[e]	15.0	85.0	—	—	—	—	—
F2b-D[e]	15.0	85.0	—	—	—	—	—
F2c[c]	5.9	58.4	8.1	14.4	10.9	2.3	—
F2d[c]	10.0	54.6	26.2	5.3	3.9	—	—
F2-S[c,d]	5.7	4.1	66.8	10.8	11.3	1.3	t.r.
P2[c,d]	11.0	20.3	49.0	13.8	5.9	—	t.r.
P2a[c]	5.8	46.6	33.9	11.0	1.5	1.2	—
P2b[c]	5.3	47.7	29.6	13.9	1.8	1.7	—
P2c[c]	5.4	54.4	35.6	2.6	2.0	—	—
P2d[e]	6.1	93.9	—	—	—	—	—
P2d-D[e]	8.5	91.5	—	—	—	—	—
P2e[e]	13.2	86.8	—	—	—	—	—
P2e-D[e]	13.5	86.5	—	—	—	—	—
P2-S[c,d]	12.3	7.0	56.3	16.9	7.5	—	t.r.
FH[c,d]	10.0	26.0	40.0	12.0	9.0	1.0	2.0
FH-p[c]	15.5	68.2	10.5	3.5	2.5	—	—
FH-S[c,d]	5.0	5.6	64.0	8.6	14.8	t.r.	2.0

(—) Not detected.
t.r. Percentages lower than 1.0% are considered as trace amounts.
[a] Fractions are defined in the text.
[b] Gal corresponds to galactosyl, 3,6-AnGal to 3,6-anhydrogalactosyl, etc.
[c] Compositional analyses determined after reductive hydrolysis.[54,55]
[d] Normalized to exclude glucose, 3–5%.
[e] Compositional analyses determined after hydrolysis with M TFA for 4 h at 100 °C.

its derivatives as major components. The presence of these sugars, together with the negative optical rotations (Tables 1 and 2) and NMR data (see later) determined for KCl-soluble fractions indicative of agaran structures as major constituents.

Thus, the KCl-treatment of the polysaccharide extracts afforded three general types of fractions: one constituted exclusively by mannose and xylose, a second one indicative of agaran-like structures and a third one, with intermediate characteristics between the previous two. This last fraction type could result from the co- precipitation of agarans as observed in xylomannans and agarans fractionation carried out with the water-soluble polysaccharides obtained from *Nothogenia fastigiata*.[3–7]

2.2. Homogeneity analysis

HPSEC–MALLS analysis of F2a, F2b, P2d and P2e fractions gave a homogeneous profile with a MW of 180, 222, 33 and 41 kDa (*dn*/*dc* of 0.157, 0.131, 0.142 and 0.142), respectively. Figure 1 shows the HPSEC-RID elution profiles of fractions F2b and P2d. Considering the homogeneity, sugar composition and methylation analysis (see later), these fractions were named xylomannans. The KCl-soluble fractions (F2-S, P2-S and FH-S) showed an asymmetric peak when analyzed by the same technique, indicating that further purification of these fractions would be necessary.

2.3. Methylation analyses of native and desulfated polysaccharides

Xylomannans F2a, F2b, P2d and P2e were converted into the triethylammonium salt form[29] and methylated by the Ciucanu and Kerek method.[30] The results of linkage analyses are shown in Table 3. The principal derivatives were 3,6-Man (64.7–79.9 mol %) and 3-Man (9.6–15.1 mol %), indicating the presence of 2,4-di- and 2,4,6-trisubstituted mannopyranosyl residues, respectively. Furthermore the occurrence of 2,3,4-Xyl (5.5–11.5 mol %) and 3,4,6-Man (3.4–5.8 mol %) are indicative of xylopyranosyl single stubs and 2-substituted mannopyranosyl residues, respectively.

In order to determine the glycosidic linkages, sulfation and glycosylation positions, the xylomannans were submitted to solvolytic desulfation,[31] followed by methylation of the desulfated polymers. Compositional sugar analyses of the desulfated polysaccharides (F2a-D, F2b-D, P2d-D and P2e-D) gave similar xylose-to-mannose ratios than those obtained for the native polysaccharides, indicating lack of degradation during the

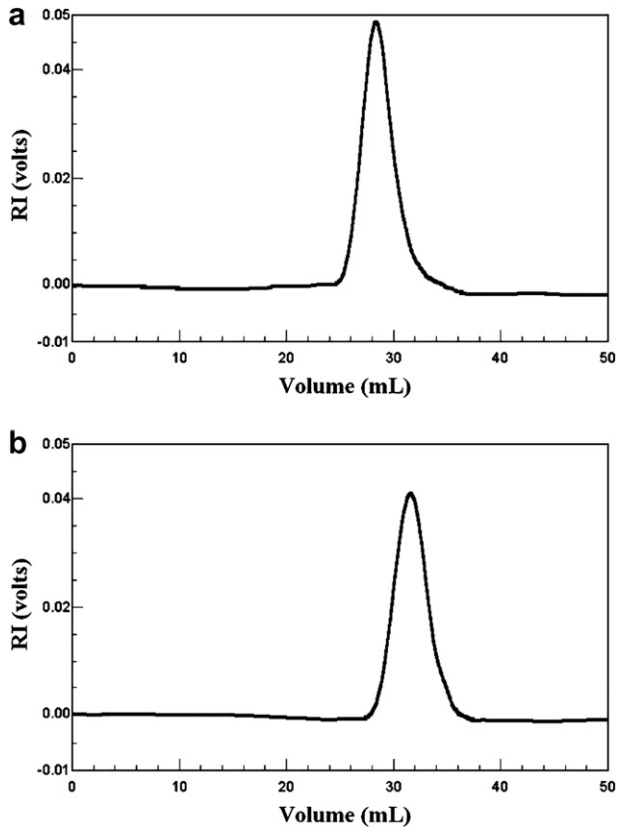


Figure 1. HPSEC elution profiles of F2b (a) and P2d (b), using a refractive index (RI) detector.

solvolytic treatment (Table 2). The xylomannans were completely (F2b and P2d) or highly (~85%, F2a and P2e) desulfated (Table 1). Methylation analyses of these polysaccharides, when compared with those of the native polymers, showed the appearance of 2,3,6-Man and 2,3-Man as major derivatives with the concomitant 3,6-Man and 3-Man disappearance and/or decrease (Table 3). These data are in agreement with the removal of C-2 sulfate from 4-linked and 4,6-disubstituted mannopyranosyl residues. As well as in the linkage analyses of the native polysaccharides, xylose was detected only as branching units (2,3,4-Xyl, 5.7–11.2 mol %, Table 3). However, these amounts are lower than those obtained for xylose in the native (6.1–15.0 mol %) and desulfated polymers (8.5–15.0 mol %), as shown in Table 2. This decrease can be due to oxidative degradation[32] and/or preferential losses of the 2,3,4-tri-*O*-methylxylose during the methylation/derivatization process.[33] Additionally, 3,4,6-Man was not detected amongst the permethylated desulfated derivatives along with the appearance of equivalent amounts of 2,3,4,6-Man (2.6–5.9 mol %) indicating the presence of non-reducing mannopyranosyl 2-sulfated units. Moreover, the amounts of 2,3-Man derivative present in permethylated products of F2a-D, F2b-D, P2d-D and P2e-D are consistent with 15, 25, 15 and 20% of glycosylation, respectively, by xylopyranosyl (~70–80% of branches) and mannopyranosyl 2-sulfated residues (~20–30% of branches).

2.4. Smith degradation and methylation of the degraded product

In order to determine the position of attachment of the branches, xylomannan F2a was submitted to Smith degradation,[34] giving rise to the Smith-degraded product (F2a-sm) that was also sequentially submitted to desulfation (F2a-smD). Monosaccharide composition of both products showed only mannose (Table 2) and their methylation analysis 98 mol % of 3,6-Man plus 2 mol % of 2,3,6-Man for F2a-sm and 100 mol % of 2,3,6-Man for F2a-smD, as reported in Table 3. These results combined with the methylation analysis described above of the native and desulfated xylomannans are in agreement with a 4-linked mannan 2-sulfated

Table 3. Methylation analysis of the native xylomannans (F2a, F2b, P2d and P2e), Smith-degraded (F2a-sm) and their partially desulfated (F2a-D, F2b-D, P2d-D, P2e-D and F2a-sm-D) products obtained from *C. flagelliferus* and *C. papillosus*

Fractions[a]	Derivative[b]						
	3,6-Man[c]	2,3,6-Man	3-Man[d]	2,3-Man	3,4,6-Man	2,3,4,6-Man	2,3,4-Xyl
F2a	72.6	2.0	13.9	—	5.0	—	6.5
F2a-D	6.5	69.9	—	13.5	—	4.0	6.2
F2a-sm	98.0	2.0	—	—	—	—	—
F2a-sm-D	—	100.0	—	—	—	—	—
F2b	64.7	2.9	15.1	—	5.8	—	11.5
F2b-D	—	62.9	—	20.0	—	5.9	11.2
P2d	79.5	t.r.	10.6	—	4.4	—	5.5
P2d-D	—	79.0	—	11.6	—	3.7	5.7
P2e	71.5	2.6	14.3	—	3.4	—	8.2
P2e-D	8.2	62.8	—	16.6	—	3.0	10.0

t.r. Percentages lower than 1.0% are considered as trace amounts.

[a] Fractions are defined in the text.

[b] Mol % of monosaccharide bearing methyl groups at the positions indicated.

[c] 3,6-Man analyzed as 1,2,4,5-tri-*O*-acetyl-3,6-di-*O*-methylmannitol, etc.

[d] Determined after acid hydrolysis, $NaBD_4$ reduction, acetylation and GC–MS analyses (*m*/*z* 139, 159, 190 and 219).

backbone, partially C-6 substituted by single stubs of mannopyranosyl 2-sulfate and xylopyranosyl units.

2.5. NMR analyses

^{13}C NMR spectra of native (F2a and P2d), desulfated (F2a-D and P2d-D) and Smith-degraded (F2a-sm) xylomannans are shown in Figures 2 and 3, and their chemical shift assignments are reported in Table 4.

^{1}H NMR spectra of the native xylomannans showed a singlet at 4.86 ppm attributed to H-1 of the mannopyranosyl residues and a doublet at 4.45 ppm ($J_{H\text{-}1,H\text{-}2}$ 7.2 Hz) assigned to H-1 of the xylopyranosyl residues in the β-configuration.[22,35] The anomeric configuration of the former residue was determined by ^{13}C NMR proton-coupled experiment. The C-1,H-1 coupling constant of 161 Hz is consistent with a β-linkage.[36]

^{13}C NMR spectra of the native xylomannans (F2a, F2b, P2d and P2e) were qualitatively similar, but differed slightly in the intensity of their signals. These spectra showed in the anomeric region a major signal at 99.1 ppm (F2a and F2b) or at 99.0 ppm (P2d and P2e) corresponding to 4-linked β-D-mannopyranosyl 2-sulfate residues (C-2 at 78.1 ppm). These signals are shifted upfield (~1.0 ppm) and downfield (8.1 ppm), respectively, when compared to the spectrum of its corresponding desulfated polymers (F2a-D, F2b-D; P2d-D and P2e-D), in accordance with the β- and α-effect of sulfation. Moreover, the spectra of F2a-D and P2e-D showed a very low intensity signal at 99.1 and 99.0 ppm, respectively, consistent with the presence of remaining sulfate groups after solvolytic desulfation (Table 1) and the corresponding derivative (3,6-Man, 6.5 and 8.2 mol %, respectively, Table 3) amongst the products of methylation of the partially desulfated polymers.

The signal at 103.4 ppm present in both native and desulfated xylomannans corresponds to C-1 of xylopyranosyl[22] single stub units attached to C-6 of the 4-linked mannan backbone. DEPT NMR spectrum of the desulfated xylomannan showed inverted signals at 68.3, 65.2 and 60.6 ppm, attributed to substituted C-6,[37] C-5 of xylose and non-substituted C-6, respectively (insert in Fig. 3b). C-6 and C-5 (73.6 ppm) signals of 4,6-disubstituted mannopyranosyl residues are shifted downfield (7.7 ppm) and upfield (1.4 ppm), respectively, in comparison with those of unbranched residues[37] (Table 4).

The signal of very low intensity at 66.8 ppm that was present only in the spectra of xylomannans P2d (Fig. 3a) and P2e was assigned to C-4 of the β-D-mannopyranosyl side chain units[38] in agreement with results of methylation. Considering that these xylomannans have low MW (33 and 41 kDa, respectively), 6.7–4-fold lower than those of F2a and F2b, part of this resonance would arise from C-4 of the β-D-mannopyranosyl non-reducing end of the main chain.[38]

The ^{13}C NMR spectrum of the Smith-degraded polysaccharide (F2a-sm, Fig. 2c) contains only six sharp

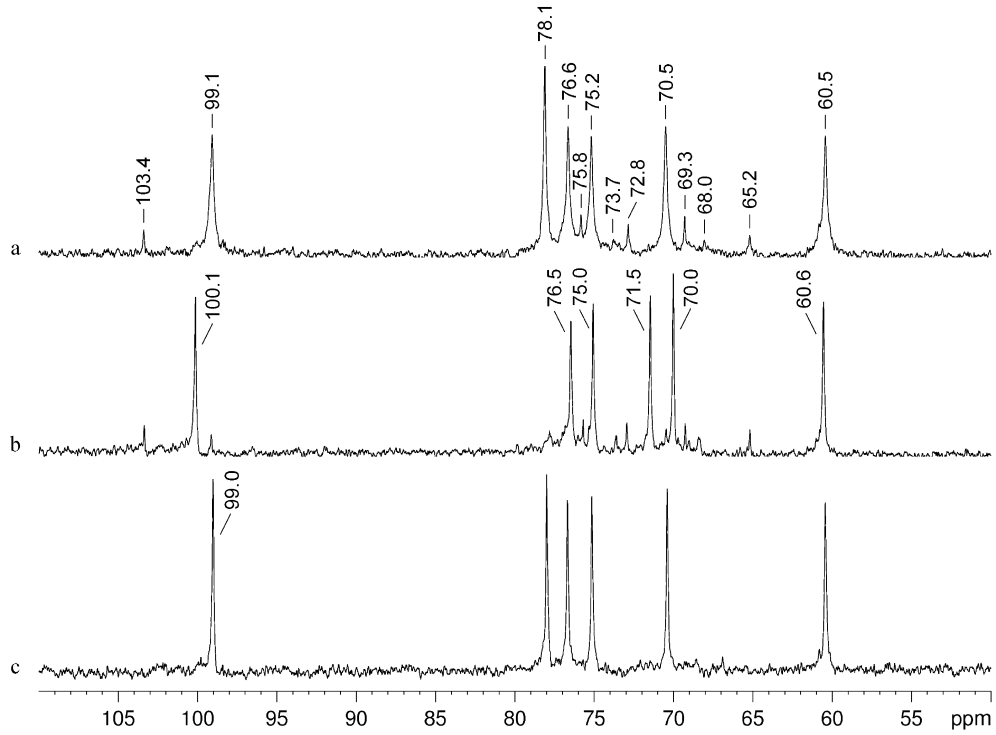


Figure 2. ^{13}C NMR spectra of the native xylomannan F2a (a), desulfated derivative F2a-D (b), Smith-degraded product F2a-sm (c) isolated from *C. flagelliferus*.

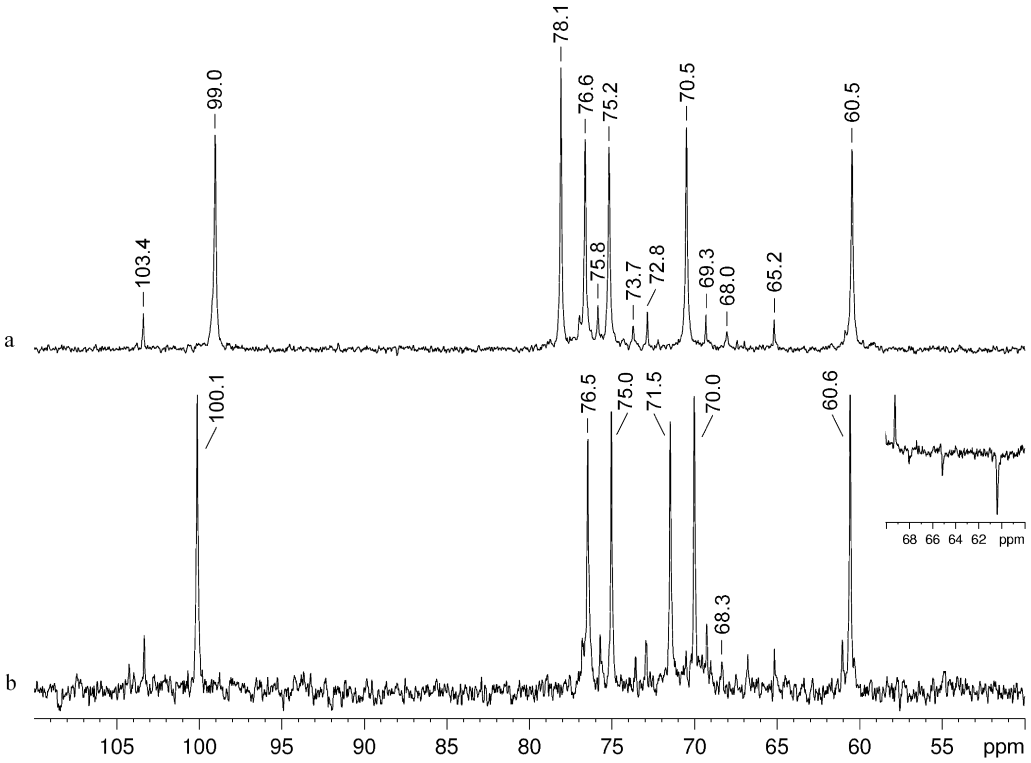


Figure 3. ^{13}C NMR spectra of the native xylomannan P2d (a), desulfated derivative P2d-D (b) isolated from *C. papillosus*.

Table 4. Chemical shift assignments of the NMR spectra of the native[a] xylomannans (F2a, F2b, P2d and P2e) and Smith-degraded[b] polysaccharide (F2a-sm) and desulfated[c] xylomannans (F2a-D, F2b-D, P2d-D and P2e-D)

Type of unit	Chemical shift (ppm)													
	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5a	H-5b	H-6a	H-6b
→4)-β-D-Man*p*-2-S-(1→														
Unbranched at O-6[a,b]	99.0	78.1	70.5	76.6	75.2	60.5	4.86	4.81	3.96	3.87	3.59		3.83	3.94
Branched at O-6[a,c]	99.0	78.1	70.5	76.6	73.7	68.0								
→4)-β-D-Man*p*-(1→														
Unbranched at O-6[c]	100.1	70.0	71.5	76.5	75.0	60.6								
Branched at O-6[c]	100.1	70.0	71.5	76.5	73.6	68.3								
β-D-Xyl*p*-(1→[a,c]	103.4	72.8	75.8	69.3	65.2		4.45	3.37	3.48	3.66	3.37	4.00		

[a] NMR signals in the spectrum of the native sulfated xylomannan. In F2a and F2b the C-1 signal appears at 99.1 ppm.
[b] NMR signals in the spectrum of the Smith-degraded polysaccharide.
[c] NMR signals in the spectrum of the desulfated xylomannan.

signals corresponding to C-1–C-6 of 4-linked mannopyranosyl 2-sulfate residues (Table 4) in agreement with the removal of the side-chain units and consistent with its methylation analysis.

The 2 M KCl-precipitated fraction, FH-p, obtained from a southern Brazilian sample of *C. flagelliferus* that was carefully examined to avoid contamination with epiphytes and endophytes, showed the same set of resonances present in the spectra of all the other native xylomannans (Fig. 4c). This result clearly shows that this type of polysaccharide is synthesized by *Chondrophycus* species and eliminates the possibility of exogenous contamination.

^{1}H chemical shifts of 4-linked β-D-mannopyranosyl 2-sulfate and β-D-xylopyranosyl residues were assigned using 1D and 2D COSY, TOCSY and HMQC NMR techniques. The HMQC spectrum of xylomannan P2d with its complete correlation assignment is shown in Figure 5. ^{1}H Assignments were in agreement with NMR data previously reported for methyl glycosides of mannose[39] and oligo- and polysaccharides containing 4-linked mannopyranosyl residues,[40–43] considering the deshielding effect of the sulfate group on geminal and vicinal protons.[44] Chemical shift assignments of β-D-xylopyranosyl side-chain residues are in accordance with the literature for terminal β-D-xylopyranosyl residues.[22]

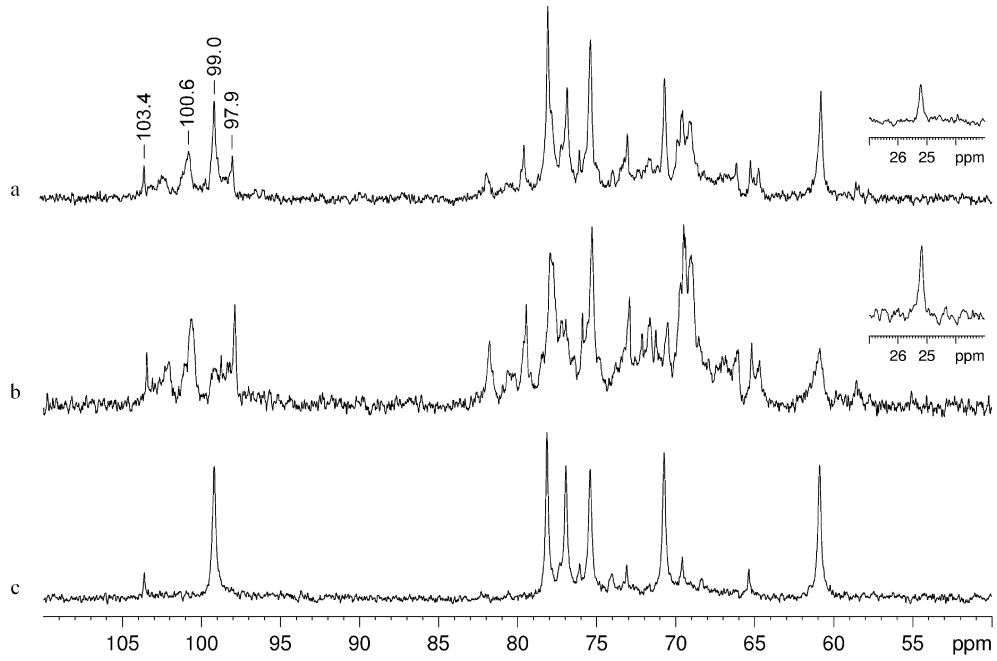


Figure 4. ^{13}C NMR spectra of the crude extract FH (a), 2 M KCl-soluble fraction FH-S (b), 2 M KCl-precipitated fraction FH-p (c) isolated from *C. flagelliferus*.

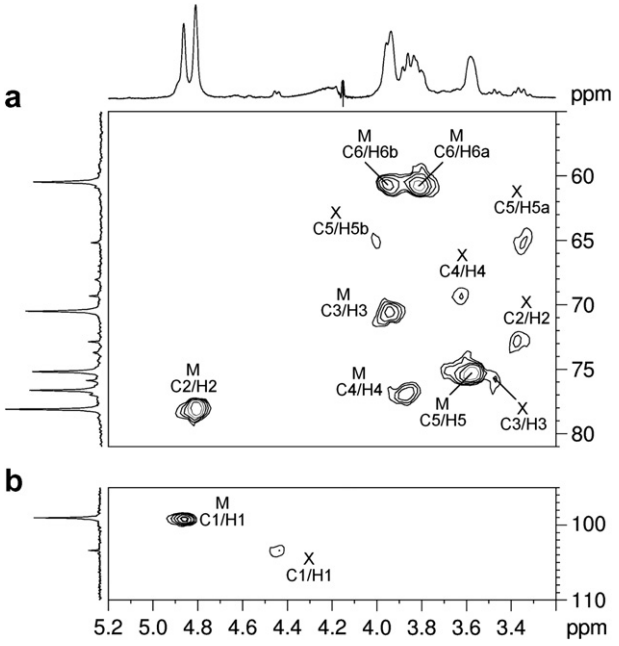


Figure 5. HMQC spectrum of P2d, C-2, C-6/H-2, H-6 region (a), anomeric region (b). M and X correspond to [→4)-β-D-Man*p*-2-S-(1→] and [β-D-Xyl*p*-(1→] residues, respectively.

Therefore, NMR data confirm methylation analyses in terms of glycosidic linkage, sulfate and side-chain positioning of the xylomannans isolated from *C. flagelliferus* and *C. papillosus* and additionally indicated that the sugar constituents were β-glycosidically linked.

Xylomannans have also been isolated from several red seaweeds of the order Nemaliales, but in this case, they are constituted by a α-D-mannopyranosyl 3-linked backbone.[3–10] Included in this group are the xylomannans isolated from *N. fastigiata*, sulfated on C-2 and/or C-6 and partially glycosylated by single stubs of β-D-xylopyranosyl units attached to C-2.[3–7] The α-mannan backbone of the water-soluble polysaccharide isolated from *Liagora valida* is sulfated on C-4 and C-6 and substituted on C-2 by single stubs of β-D-xylopyranosyl residues or less often on C-6 by short chains of 4-linked β-D-xylopyranosyl units or single stubs of β-D-xylopyranosyl or its 3-*O*-methylated derivative.[9] A structurally similar sulfated xylomannan has been described for *Nemalion vermiculare*.[8] In order Nemaliales there is only one description of a xylomannan backbone made up of β-D-mannopyranosyl residues.[11] This is the case of the xylomannan isolated from *Galaxaura squalida* in which the 3-linked β-D-mannopyranosyl backbone is substituted on C-4 by a sulfate group or xylopyranosyl or L-galactopyranosyl units.[11] Therefore, the structural characteristics described in the present work for the sulfated xylomannan produced by *Chondrophycus* species are different from those mentioned above and could represent a chemotaxonomic marker for this genus.

The KCl-soluble fractions (F2-S, P2-S and FH-S) gave similar ^{13}C NMR spectra between them with a complex anomeric region containing at least nine signals. The spectrum of one of these fractions (FH-S) is shown in Figure 4b. The major signal at 100.6 ppm

was attributed, at least in part, to C-1 of β-D-galactose 2-sulfate linked to 3,6-anhydro-α-L-galactose (C-1 at 97.9 ppm).[45] The signal of medium intensity at 25.1 ppm, besides that at ~175.8 ppm arose from methyl and carboxyl groups of the acetal of pyruvic acid in the *R* form.[46] These spectroscopic data, together with sugar composition and the negative optical rotations, are indicative of the presence of pyruvylated agaran structures as major water-extractable polysaccharides. Our results are in agreement with the agarophyte character of *Laurencia* complex species (genera *Laurencia*, *Chondrophycus* and *Osmundea*)[47,48] as reported by several authors.[19–24]

It is noteworthy that the ^{13}C NMR spectra of the crude extracts FH (Fig. 4a), F2 and P2 contain, besides the above-mentioned signals, one of high intensity at 99.0, 99.1 and 99.0 ppm, respectively (C-1 of 4-linked β-D-mannopyranosyl 2-sulfate). Combined with mannose and xylose detection, this signal could be used as a diagnostic resonance to indicate the presence of xylomannan 2-sulfate in crude extracts of other *Chondrophycus* species.

Agarans with different patterns of substitution have been described for representatives of Ceramiales.[19–28] Together with these polysaccharides, another type of galactan, DL-hybrid, has been isolated from some species of this order.[49,50] The isolation of a xylomannan sulfate from two species of *Chondrophycus* adds a new type of polysaccharide to this group of red seaweeds. Studies are underway to determine if this class of sulfated polysaccharide is a general feature of the red seaweeds from genus *Chondrophycus* or even of the *Laurencia* complex.

3. Experimental

3.1. Collection of specimens

The specimens of *C. flagelliferus* (J. Agardh) K. W. Nam and *C. papillosus* (C. Agardh) Garbary and Harper were collected from the northeastern coast of Brazil (Cabo, Pernambuco State, and in Praia do Forte, Bahia State, respectively). The voucher specimens were deposited in the herbarium of the Department of Botany, Federal University of Paraná (Curitiba, Brazil) with the herbarium numbers UPCB-55549 and UPCB-55343, respectively. The algal material was carefully cleaned by hand and washed with tap water and sun-dried. Whole thalli were used for polysaccharide extractions. A second sample of *C. flagelliferus* was collected on the southern coast of Brazil (Bombinhas, Santa Catarina State). For inspection of the existence of epiphytes and endophytes, the specimens were exhaustively examined using a stereomicroscope, and when necessary, a microscope. About 1 g of the apical regions of these thalli, free of any kind of contaminants, was selected to be used as standard material.

3.2. Extraction

The milled seaweeds *C. flagelliferus* and *C. papillosus* (both collected on the northeastern coast of Brazil) were separately extracted with water (3% w/v) at 25 °C with mechanical stirring for 16 h. After centrifugation the supernatants were concentrated and treated with EtOH (3 vols). The precipitated materials were resuspended in distilled water, dialyzed, concentrated and freeze-dried yielding the crude extracts F1 and P1, respectively (Table 1). The algal residues were sequentially extracted with water (3% w/v) at 80 °C with mechanical stirring for 3 h and treated as described above, giving the crude extracts F2 and P2, respectively. The polysaccharides from *C. flagelliferus* (collected on the southern coast of Brazil) were obtained by aqueous extraction with hot water (80 °C) as described above, to give the crude extract FH (Table 1).

3.3. Fractionation of the crude extracts with KCl

The crude extracts were submitted to KCl treatment.[51] Briefly, F2 and P2 were dissolved in water (0.25% w/v), and KCl was added under mechanical stirring so that the concentration was increased by 0.25 M each time, up to 2 M. After 2 h stirring at 25 °C, the materials were maintained at 4 °C for 15 h, and the precipitated polysaccharides were centrifuged, dialyzed, concentrated and freeze-dried.

Four and five KCl-insoluble fractions were obtained from F2 (F2a–F2d) and P2 (P2a–P2e), respectively. The ranges of precipitation of each fraction are shown in Table 1. The soluble materials (in 2.0 M KCl) were dialyzed, concentrated and freeze-dried yielding the KCl-soluble fractions F2-S and P2-S, respectively (Table 1). FH extract (0.25% w/v) was treated with 2 M KCl giving rise to the precipitated (FH-p) and soluble (FH-S) fractions.

3.4. Analytical methods

Optical rotations of aqueous solutions of the polysaccharide samples (0.2% w/v) were measured at 20 °C, using a 10-cm cell and the sodium D line (589.3 nm) with a Rudolph Autopol III automatic polarimeter. Total carbohydrate and sulfate contents were determined by the phenol–sulfuric acid method[52] and the turbidimetric method of Dodgson and Price,[53] respectively. For monosaccharide composition, fractions F2a, F2b, P2d, P2e and FH-p were hydrolyzed using M TFA at 100 °C for 4 h. Hydrolysis products were reduced with $NaBH_4$ and acetylated (Ac_2O, 1 h, 120 °C), and the resulting alditol acetates were analyzed by

GC–MS. Monosaccharide composition of the other fractions was carried out by reductive hydrolysis[54] using the modifications introduced by Jol et al.[55] GC–MS analyses were performed with a Varian 3800 chromatograph, equipped with a fused-silica capillary column (30 m × 0.25 mm) coated with DB-225MS (Durabond), and a Varian Saturn 2000 R ITD spectrometer. The chromatograph was programmed to run at 50 °C for 1 min, then 50–215 °C at 40 °C min^{-1}, using helium as carrier gas at 1 mL min^{-1}.

3.5. Smith degradation

F2a (50 mg) was oxidized[34] with $NaIO_4$ (0.05 M, 20 mL) in the dark, at 25 °C for 48 h. Following the addition of 1,2-ethanediol (2 mL), the solution was dialyzed for 48 h against distilled water, and concentrated, and the resulting polyaldehydes were reduced with $NaBH_4$ for 15 h. The solution was acidified with HOAc, and dialyzed, and the material was partially hydrolyzed with M TFA at 25 °C for 20 h. After neutralization with M NaOH, the oxidized and reduced material was dialyzed and freeze-dried to give the Smith-degraded fraction F2a-sm (70% yield).

3.6. Desulfation

Desulfation of the polysaccharides was carried out as previously described.[31] The polysaccharidic fractions, in the pyridinium salt form, were treated with a mixture of 89:10:1 Me_2SO–MeOH–pyridine, for 4 h at 100 °C. The native xylomannans F2a, F2b, P2d, P2e and the Smith-degraded fraction (F2a-sm) were submitted to this solvolytic treatment, giving rise to F2a-D, F2b-D, P2d-D, P2e-D and F2a-sm-D, respectively. Yields and chemical analyses of these fractions are shown in Tables 1 and 2.

3.7. Methylation

The native xylomannans (F2a, F2b, P2d and P2e), their desulfated fractions (F2a-D, F2b-D, P2d-D and P2e-D) and the Smith-degraded product before (F2a-sm) and after desulfation (F2a-sm-D) were methylated by the method of Ciucanu and Kerek[30] with the polysaccharides in the triethylammonium salt form.[29] The samples (10 mg) were dissolved in Me_2SO (1 mL), then powdered NaOH (200 mg) was added, and the mixture was stirred for 30 min at 25 °C, followed by CH_3I (1 mL) addition. After 15 h at 25 °C the reaction was interrupted by addition of water, neutralized with HOAc, dialyzed against distilled water and freeze-dried. The permethylated polysaccharides were obtained after two further steps of methylation carried out in the same way as described above. These polysaccharides were hydrolyzed with aq formic acid (45% v/v) for 16 h at 100 °C, followed by $NaBD_4$ reduction, acetylation and GC–MS analysis. Partially methylated alditol acetates were identified by their typical electron-impact breakdown profiles and retention times[56,57] using the same column and GC–MS conditions described above.

3.8. HPSEC–MALLS analysis

The determination of the homogeneity and molar mass (MW) was performed on a Waters High-Performance Size-Exclusion Chromatography (HPSEC) apparatus coupled to a refractive index detector (RID) and a Wyatt Technology Dawn-F Multi-Angle Laser Light Scattering detector (MALLS). Waters Ultrahydrogel Columns (2000, 500, 250 and 120) were connected in series and coupled with multi-detection equipment, using a $NaNO_2$ solution (0.1 M) as eluent, containing NaN_3 (200 ppm) as preservative. The samples (2 mL^{-1}) were dissolved in the same solvent under magnetic stirring for 2 h and filtered through 0.45- and 0.22-μm nitrocellulose membranes (GSWP, Millipore). HPSEC data were collected and analyzed by the Wyatt Technology ASTRA program. The light-scattering signal was detected simultaneously at 11 scattering angles, θ, ranging from 35° to 132°. All experiments were carried out at 25 °C.

3.9. Spectroscopic analysis

NMR spectra were recorded at 70 °C using a Bruker Avance DRX400 spectrometer, equipped with a 5-mm multi-nuclear inverse detection probe, at a base frequency of 100.63 MHz for ^{13}C and 400 MHz for ^{1}H nuclei. Chemical shifts are reported in ppm using acetone as internal standard at 30.2 and 2.224 ppm for ^{13}C and ^{1}H, respectively. For coupled and decoupled-^{13}C and ^{13}C–DEPT (DEPT135) analyses, the lyophilized samples were dissolved in D_2O (30–40 mg mL^{-1}). For ^{1}H and 2D NMR experiments, the samples were deuterium exchanged by successive freeze-drying steps in D_2O (99.9%) and then dissolved in D_2O (20–30 mg mL^{-1}). ^{1}H, ^{13}C and ^{13}C–DEPT acquisition parameters were previously reported.[58] 2 D ^{1}H, ^{1}H COSY, TOCSY and ^{1}H, ^{13}C HMQC experiments were carried out using the pulse programs supplied with the apparatus.

Acknowledgements

This work was supported by grants from Fundação Araucária/CNPq (PRONEX-Carboidratos) and CAPES. M.D.N., M.T.F. and M.E.D. are Research Members of the National Research Council of Brazil (CNPq). M.A.C. acknowledges a doctoral scholarship from CNPq.

References

1. Painter, T. J. In *The Polysaccharides*; Aspinall, G. O., Ed.; Academic: London, UK, 1983; Vol. 2, pp. 195–285.
2. Stortz, C. A.; Cerezo, A. S. *Curr. Top. Phytochem.* **2000**, *4*, 121–134.
3. Matulewicz, M. C.; Cerezo, A. S. *Carbohydr. Polym.* **1987**, *7*, 121–132.
4. Haines, H. H.; Matulewicz, M. C.; Cerezo, A. S. *Hydrobiologia* **1990**, *204–205*, 637–643.
5. Matulewicz, M. C.; Haines, H. H.; Cerezo, A. S. *Phytochemistry* **1994**, *36*, 97–103.
6. Kolender, A. A.; Matulewicz, M. C.; Cerezo, A. S. *Carbohydr. Res.* **1995**, *273*, 179–185.
7. Kolender, A. A.; Pujol, C. A.; Damonte, E. B.; Matulewicz, M. C.; Cerezo, A. S. *Carbohydr. Res.* **1997**, *304*, 53–60.
8. Usov, A. I.; Adamyants, K. S.; Yarotsky, S. V.; Anoshina, A. A. *Carbohydr. Res.* **1973**, *26*, 282–283.
9. Usov, A. I.; Dobkina, I. M. *Bioorg. Khim.* **1991**, *17*, 1051–1058.
10. Bilan, M. I.; Usov, A. I. *Russ. J. Bioorg. Chem.* **2001**, *27*, 2–16.
11. Usov, A. I.; Yarotskii, S. V.; Esteves, M. L. *Bioorg. Khim.* **1981**, *7*, 1261–1270.
12. Fujii, M. T.; Guimarães, S. M. P. B.; Gurgel, C. F. D.; Fredericq, S. *Phycologia* **2006**, *45*, 432–441.
13. Cerezo, A. S.; Lezerovich, A.; Labriola, R. *Carbohydr. Res.* **1971**, *19*, 289–296.
14. Matulewicz, M. C.; Cerezo, A. S.; Jarret, R. M.; Syn, N. *Int. J. Biol. Macromol.* **1992**, *14*, 29–32.
15. Matulewicz, M. C.; Cerezo, A. S. *Phytochemistry* **1987**, *26*, 1033–1035.
16. Kovać, P.; Hirsch, A. S.; Shashkov, A. I.; Usov, A. I.; Yarotsky, S. V. *Carbohydr. Res.* **1980**, *85*, 177–185.
17. Jerez, J. R.; Matsuhiro, B.; Urzúa, C. C. *Carbohydr. Polym.* **1997**, *32*, 155–159.
18. Lahaye, M.; Rondeau-Mouro, C.; Deniaud, E.; Buléon, A. *Carbohydr. Res.* **2003**, *338*, 1559–1569.
19. Bowker, D. M.; Turvey, J. R. *J. Chem. Soc. C* **1968**, 983–988.
20. Bowker, D. M.; Turvey, J. R. *J. Chem. Soc. C* **1968**, 989–992.
21. Usov, A. I.; Ivanova, E. G.; Elashvili, M. Ya. *Bioorg. Khim.* **1989**, *15*, 1259–1267.
22. Usov, A. I.; Elashvili, M. Ya. *Bot. Mar.* **1991**, *34*, 553–560.
23. Miller, I. J.; Falshaw, R.; Furneaux, R. H. *Bot. Mar.* **1993**, *36*, 203–208.
24. Valiente, O.; Fernandez, L. E.; Perez, R. M.; Maquina, G. *Carbohydr. Res.* **1993**, *243*, 191–197.
25. Duarte, M. E. R.; Noseda, M. D.; Cardoso, M. A.; Tulio, S.; Cerezo, A. S. *Carbohydr. Res.* **2002**, *337*, 1137–1144.
26. Duarte, M. E. R.; Cauduro, J. P.; Noseda, D. G.; Noseda, M. D.; Gonçalves, A. G.; Pujol, C. A.; Damonte, E. B.; Cerezo, A. S. *Carbohydr. Res.* **2004**, *339*, 335–347.
27. Miller, I. J.; Furneaux, R. H. *Bot. Mar.* **1993**, *40*, 333–339.
28. Furneaux, R. H.; Stevenson, T. T. *Hydrobiologia* **1990**, *204/205*, 615–620.
29. Stortz, C. A.; Cerezo, A. S. *Carbohydr. Res.* **1993**, *242*, 217–227.
30. Ciucanu, I.; Kerek, F. *Carbohydr. Res.* **1984**, *131*, 209–217.
31. Nagasawa, K.; Inoue, Y.; Kamaia, T. *Carbohydr. Res.* **1977**, *58*, 47–55.
32. York, W. S.; van Halbeek, H.; Darvill, A. G.; Albersheim, P. *Carbohydr. Res.* **1990**, *200*, 9–31.
33. Needs, P. W.; Selvendran, R. R. *Carbohydr. Res.* **1994**, *254*, 229–244.
34. Goldstein, I. J.; Hay, W. G.; Lewis, A. B.; Smith, F. *Methods Carbohydr. Chem.* **1965**, *5*, 361–370.
35. Altona, C.; Haasnoot, C. A. G. *Org. Magn. Reson.* **1980**, *13*, 417–429.
36. Perlin, A. S.; Casu, B. *Tetrahedron Lett.* **1969**, *34*, 2919–2924.
37. Grasdalen, H.; Painter, T. *Carbohydr. Res.* **1980**, *81*, 59–66.
38. Gorin, P. A. J.; Mazurek, M. *Can. J. Chem.* **1974**, *53*, 1212–1223.
39. Agarwal, P. K. *Phytochemistry* **1992**, *31*, 3307–3350.
40. Davis, A. L.; Hoffmann, R. A.; Russel, A. L.; Debet, M. *Carbohydr. Res.* **1995**, *271*, 43–54.
41. Takita, J.; Katohda, S.; Sugiyama, H. *Carbohydr. Res.* **2001**, *335*, 133–139.
42. Hua, Y.; Zhang, M.; Fu, C.; Chen, Z.; Chan, G. Y. S. *Carbohydr. Res.* **2004**, *339*, 2219–2224.
43. Schröder, R.; Nicolas, P.; Vincent, S. J. F.; Fischer, S. R.; Redgwell, R. J. *Carbohydr. Res.* **2001**, *331*, 291–306.
44. Harris, M. J.; Turvey, J. R. *Carbohydr. Res.* **1970**, *15*, 57–63.
45. Lahaye, M.; Yaphe, W.; Viet, M. T. P.; Rochas, C. *Carbohydr. Res.* **1989**, *190*, 249–265.
46. Garegg, P. J.; Lindberg, B.; Kvarnström, I. *Carbohydr. Res.* **1979**, *77*, 71–78.
47. Garbary, D. J.; Harper, J. T. *Cryptogamie Algol.* **1998**, *19*, 185–200.
48. Nam, K. W. *Eur. J. Phycol.* **1999**, *34*, 455–468.
49. Takano, R.; Yokoi, T.; Kamei, K.; Hara, S.; Hirase, S. *Bot. Mar.* **1999**, *42*, 183–188.
50. Takano, R.; Shiomoto, K.; Kamei, K.; Hara, S.; Hirase, S. *Bot. Mar.* **2003**, *46*, 142–150.
51. Matulewicz, M. C.; Ciancia, M.; Noseda, M. D.; Cerezo, A. S. *Phytochemistry* **1989**, *28*, 2937–2941.
52. Dubois, M.; Gilles, K. A.; Hamilton, J. K.; Rebers, P. A.; Smith, F. *Anal. Chem.* **1956**, *28*, 350–356.
53. Dodgson, K. S.; Price, R. G. *Biochem. J.* **1962**, *84*, 106–110.
54. Stevenson, T. T.; Furneaux, R. H. *Carbohydr. Res.* **1991**, *210*, 277–298.
55. Jol, C. N.; Neiss, T. G.; Penninkhof, B.; Rudolph, B.; De Ruiter, G. A. *Anal. Biochem.* **1999**, *268*, 213–222.
56. Janson, P. E.; Kenne, L.; Liedgren, H.; Lindberg, B.; Lönngren, J. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1976**, *41*, 1–70.
57. Sassaki, G. L.; Gorin, P. A. J.; Souza, L. M.; Czelusniak, P. A.; Iacomini, M. *Carbohydr. Res.* **2005**, *340*, 731–739.
58. Ascêncio, S. D.; Orsato, A.; França, R. A.; Duarte, M. E. R.; Noseda, M. D. *Carbohydr. Res.* **2006**, *341*, 677–682.