

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JULIANA EMANUELA FOGARI CASSOLATO

DETERMINAÇÃO DA ESTRUTURA QUÍMICA E ATIVIDADE
BIOLÓGICA DE HETERORAMNANAS SULFATADAS OBTIDAS
DE MACROALGAS VERDES (ULVALES - CHLOROPHYTA)

CURITIBA

2008

JULIANA EMANUELA FOGARI CASSOLATO

DETERMINAÇÃO DA ESTRUTURA QUÍMICA E ATIVIDADE
BIOLÓGICA DE HETERORAMNANAS SULFATADAS OBTIDAS
DE MACROALGAS VERDES (ULVALES - CHLOROPHYTA)

Tese apresentada ao Programa 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–Bioquímica.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Eugênia Duarte Nosedá

Co-orientador: Prof. Dr. Miguel Daniel Nosedá

CURITIBA

2008

Dedico esta tese ao Cassiano, meu amado marido,
pela dedicação incondicional e pelo amor revelado
nos pequenos e grandes gestos.

AGRADECIMENTOS

A Jesus e Maria, meus pais do céu, agradeço o dom da vida e a graça da constante busca pela entrega generosa de minha vida a Deus.

A Profa. Maria Eugênia D. Nosedá e ao Prof. Miguel D. Nosedá, por terem me acolhido e me ensinado a arte da pesquisa. Obrigada pela orientação, confiança, convivência e pelos excelentes momentos de descontração.

Ao Prof. Philip A. J. Gorin, pela correção dos relatórios e da tese. Obrigada pelas dicas e ensinamentos.

Ao meu marido, por todos os dias que passamos juntos, por todas as horas que sorrimos e por ter me escolhido para compartilhar sua vida. Amo você!!!

Aos meus pais, Neusa e João, que me ensinaram a ser uma pessoa honesta e responsável em todas as minhas atitudes. Mesmo longe vocês continuam sendo meus ídolos!

Às minhas irmãs Luciana e Mariana, minhas amigas, meus amores, meus exemplos, minhas discípulas, minhas madrinhas. Lu, obrigada por todos os anos que moramos juntas e pelo aprendizado que nós duas obtivemos dessa convivência; admiro demais você!!! Mari, o bebê da casa, você traz alegria pra minha vida!!!! Amo muito vocês!!!!

À Dulce, minha amiga e conselheira. Você me ensinou a ser uma pessoa melhor e acreditar mais em Deus e, conseqüentemente, acreditar mais em mim. Obrigada por ter me ajudado a fazer de minha vida uma benção!!!

Aos meus sogros, Adair e Azevir, e a Anelise e Cristiano, por me aceitarem em sua família e me acolherem sempre com carinho e respeito.

Ao projeto "Sonhar Acordado", que tem o dom de mudar a vida de muitos jovens e crianças carentes, e que também mudou a minha vida!!!! E aos amigos que consegui através dele Me, Lia, Gre, Ale, Carol, Saulo... Vamos mudar o mundo!!!

Às minhas amadas amigas Pati, Tays e Cláudia, pelo convívio e amizade sincera. Obrigada pelos telefonemas preocupados: “já entregou a tese?”, “vamos sair hoje?”, e a resposta: “Hoje não posso!”. Obrigada por não desistirem!

Ao meu primo, Junior, pelos almoços saborosos, pelos vinhos sofisticados, mas, especialmente, pela amizade e carinho compartilhados ao longo dos nossos 30 e poucos anos!!!! Adoro você.

Aos amigos que estão distantes: Fabiana, Mari Eltz, Tiago Eltz, Prima Adriana, Kátia Tookuni, Daniele Doro, Brasília e Saber, vocês são muito especiais para mim!

Aos eternos e jamais esquecidos amigos Adriano, Alan, Fernanda, Rosiane e Vassoler. Com vocês compartilhei 6 anos de minha vida, com vocês aprendi metilar, analisar RMN, fazer dosagens colorimétricas, etc. Mas acima de tudo, com vocês aprendi a tornar a vida mais feliz!!! Saudades!

A Luluuuu (Luciana Garcia), minha companheira de todos os dias, horas e minutos. Dinda, como é bom lembrar de todos os dias que passamos juntas, dentro e fora da bioquímica. Das nossas angústias, das comemorações, das discussões metodológicas!!!! Dos momentos diva; dos papos profundos no “bar da Ju”. Enfim, você é companheira pra toda hora!!!! Adoro ser sua amiga!!! Muita sorte!!!

Aos meus queridos Marco, Diogo e Alexandre. Meus irmãos de brincadeiras e brigas; companheiros de laboratório e ajudantes na arte de viver em comunidade. Estou com saudades das nossas briguinhas!!!!

Aos queridinhos da 248 e E3, Nirto, Fran, Robinson e Marinex. Vocês são umas “pestes”, mas conseguem ser os seres mais adoráveis que já tive o prazer de conhecer e conviver!!! Muito sucesso em suas vidas, pois vocês merecem!!!

A Nanna e João, pessoas que eu admiro, tanto pela competência quanto pela alegria de viver! Obrigada por tornarem os dias de minha vida mais coloridos!

À Elaine, pelo seu exemplo de dedicação e entusiasmo com o trabalho. Pelas análises e ensinamentos. Você é o máximo!!! Valeu pelos momentos sérios e de descontração!! Boa sorte nas próximas etapas de sua vida!!!

Ao Danilo, Ane, Tuca e Carol, pelo carinho e companheirismo, mesmo que por poucos minutos durante o dia!! Vocês são uns fofuchos do meu coração!!!!

À Graci, pela amizade recente, mas muito intensa e sincera! Foi muito bom compartilhar Salvador contigo minha “nega”!!! À RoseAdele, pela companhia sempre agradável, pelo ótimo humor e pelas peripécias em Salvador!!!

Ao Rodris Faria, companheiro de mestrado e doutorado, que comigo sofreu e foi feliz nos experimentos!!! Mais uma vez, nós conseguimos!!!! Ao Lauro, tiozão querido, sempre disposto a ajudar (“o que eu ganho em troca?”), sempre discreto (“ê tiazona!”), e sempre muito querido!!!! Gosto de você seu “palha”!!!

Aos amigos dos laboratórios vizinhos e técnicas, Ana Helena, Dirce, Fhernanda, Andréia, Thales, Heide, Talita, Daniel, Carols, Lucimara, Ruth, Andréia e Rosane. Obrigada pela amizade e por fazerem os dias de trabalho serem mais produtivos e felizes!

Ao Prof. Guilherme Sasaki, Prof. Miguel Daniel Nosedá e Elaine R. Carbonero pelo auxílio e disponibilidade em realizar as análises de RMN.

À Rosane e à Andréia pelas análises de CLG, CLG-EM e HPSEC-MALLS.

Ao Lauro, Diogo e Alan pelas análises de ESI-MS.

À Dra. Franciane M. Pellizzari, pela disponibilização da alga em estudo nesse trabalho.

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

À dona Marilza Lamour, secretária do Curso de Pós-graduação em Bioquímica, pelos auxílios prestados e conversas sempre agradáveis.

Ao CNPq, PRONEX-Carboidratos, Fundação Araucária e CAPES pelo apoio financeiro.

"Todo aquele que se dedica ao estudo da ciência chega a convencer-se de que nas leis do Universo se manifesta um Espírito sumamente superior ao do homem, perante o qual nós, com os nossos poderes limitados, devemos humilhar-nos."

Albert Einstein

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo a determinação da estrutura química e avaliação da atividade antiviral dos polissacarídeos sulfatados produzidos pela macroalga marinha *Gayralia oxysperma* (Chlorophyta). Paralelamente foram caracterizados os polissacarídeos sulfatados obtidos de algas do gênero *Ulva* (*U. lactuca* e *U. fasciata*). *G. oxysperma*, seca e moída, foi submetida a extrações aquosas a 25 °C e, seqüencialmente, a 80 °C, originando as frações Go1–Go6. As seis frações contêm ramnose como principal monossacarídeo, além de glucose, xilose, arabinose e manose. Análises de CLG-EM dos acetatos de aminoalditol demonstraram que a ramnose pertence à série enantiomérica L-. As frações Go1–Go6 contêm elevados teores de grupos sulfato (21,2–30,9%), além de ácidos urônicos (12,2–17,0%). A fração de maior rendimento, Go3, foi purificada por ultrafiltração em membrana (*cut-off* de 300 kDa), sendo obtidas uma fração retida (Go3r) e uma fração eluída (Go3e) (70% e 30% de rendimento, respectivamente). Go3r apresentou-se homogênea em relação à massa molecular (Mw de 1.519 kDa), com altos teores de ácidos urônicos (19,0%) e grupos sulfato (25,8%), sendo constituída por ramnose (77,0 mol%), xilose (18,2 mol%), glucose (4,9 mol%) e galactose (1,0 mol%). Análise de CLG-EM do polissacarídeo Go3r-R (carboxi-reduzido na presença de NaBD₄) demonstrou a presença de 1,6,6-trideutério glucitol e galactitol hexaacetato, o que está de acordo com a existência de 12,2 e 2,6 mol% de ácidos glucurônico e galacturônico, respectivamente, no polímero original. Análises de metilação foram conduzidas com Go3r-R e seu produto de dessulfatação (Go3r-RD). Adicionalmente, Go3r-R foi seqüencialmente metilada, dessulfatada e trideuteriometilada. Em conjunto, esses resultados demonstraram que Go3r é uma heteroramnana sulfatada e ramificada contendo unidades de ramnose 2,3-dissubstituídas, 3- e 2-ligadas na relação molar de 0,38:1,00:0,43, respectivamente, sugerindo a presença de um ponto de ramificação a cada cinco unidades de ramnose. As unidades 3- e 2-ligadas apresentam-se 4-sulfatadas (37%), 2-sulfatadas (27%) e dissulfatadas (17%). Adicionalmente, ~50% das unidades de ramnose 2,3-dissubstituídas são sulfatadas em C-4. O padrão de sulfatação da heteroramnana Go3r torna-se mais complexo pela presença de terminais não redutores de ácidos glucurônico e galacturônico sulfatados em C-2, além de ácido glucurônico 4-ligado 2-sulfatado. Análise de metilação do produto de degradação controlada de Smith dessulfatado (Go3r-RSD), quando comparada com a de Go3r-RD, mostrou aumento de ramnose 2-ligada, com concomitante diminuição das unidades 2,3-dissubstituídas, indicando que parte dos pontos de ramificação estão localizados no C-3 das unidades de ramnose 2-ligadas. Os deslocamentos químicos presentes nos espectros de RMN de ¹H e ¹³C do polissacarídeo nativo e de seus produtos modificados foram assinaladas utilizando experimentos de COSY, TOCSY e HMQC, e confirmaram os resultados de metilação. As frações Go3, Go4 e Go3r, apresentaram potente atividade antiherpética frente aos vírus HSV-1 e HSV-2. Considerando a alta atividade antiviral e a ausência de citotoxicidade, estes polímeros apresentaram elevado índice de seletividade, demonstrando o potencial uso das heteroramnanas sulfatadas, sintetizadas pela clorófito *G. oxysperma*, como promissores agentes antivirais. De modo diferente, *U. lactuca* e *U. fasciata* sintetizam polissacarídeos constituídos principalmente por [→4)-β-D-ácido glucurônico-(1→4)-α-L-ramnose 3-sulfato-(1→].

ABSTRACT

The present study was dedicated to determine the chemical structure and antiviral activity of the sulfated polysaccharides produced by the green seaweed *Gayralia oxysperma*. Additionally, the polysaccharides obtained from the *Ulva* genus (*U. lactuca* and *U. fasciata*) were chemically characterized. The milled alga was extracted with water at 25 °C and, sequentially, with the same solvent at 80 °C, giving rise to Go1–Go6. The six fractions contained rhamnose as the major monosaccharide, together with glucose, xylose, arabinose and mannose. GC-MS analysis of acetylated aminoalditol derivatives showed that rhamnose has the L-configuration. All the fractions had high sulfate content (21.2–30.9%) besides uronic acids (12.2–17.0%). Go3 was purified by ultrafiltration through a 300 kDa cut-off membrane, yielding a retained fraction, Go3r and an eluted fraction, Go3e (70% and 30% yield, respectively). HPSEC-MALLS-RI analysis of Go3r gave a homogeneous profile (MW of 1,519 kDa). Go3r was rich in uronic acids (19.0%) and sulfate groups (25.8%), presenting rhamnose (77.0 mol %), xylose (18.2 mol%), glucose (4.9 mol%) and galactose (1.0 mol%). GC-MS analysis of the carboxyl-reduced polysaccharide (Go3r-R) showed the presence of 1,6,6-trideuterio glucitol and galactitol hexaacetate, in agreement with the presence of 12.2 and 2.6 mol% of glucuronic and galacturonic acid residues, respectively, in the original polymer. Methylation analysis was carried out with Go3r-R and its desulfated product (Go3r-RD). In addition, Go3r-R was sequentially methylated, desulfated and trideuteromethylated. The results showed that Go3r is a branched and sulfated heterorhamnan with 2,3-disubstituted, 3- and 2-linked rhamnose residues in a molar ratio of 0.38:1.00:0.43, respectively, corresponding to one branching point at every five rhamnose residues. The 3- and 2-linked rhamnosyl residues were 4-sulfated (37%), 2-sulfated (27%) and disulfated (17%). Approximately 50% of the 2,3-disubstituted rhamnose residues were sulfated on C-4. The sulfation pattern complexity was increased by the presence of 2-sulfated glucuronic and galacturonic acids as non-reducing terminals and 4-linked glucuronic acid residues. When compared with Go3r-RD, the controlled Smith-degraded and desulfated product (Go3r-RSD) showed an increase of 2-linked rhamnosyl with concomitant decrease of 2,3-disubstituted rhamnosyl units. These results could indicate that, at least in part, the branches are located on C-3 of the 2-linked rhamnosyl residues in the heterorhamnan. The ¹H and ¹³C NMR spectra of the native polysaccharide and its modified products were assigned using COSY, TOCSY and HMQC experiments and confirmed that the sulfated heterorhamnan is composed by several types of sulfated 3-, 2-linked and 2,3-substituted rhamnosyl residues besides 2- sulfated glucuronic and galacturonic acids, as determined by methylation analysis. The extracts with higher yield, Go3 and Go4, and the purified fraction Go3r were screened for antiviral activity against strain F of HSV-1 and strain MS of HSV-2. Given the lack of cytotoxicity exhibited by the sulfated heterorhamnans, and the very good antiviral activity against the two tested serotypes of HSV, they had very high selectivity indices, indicating the specificity of the inhibitory effect against herpes viruses. On the other hand, *U. lactuca* and *U. fasciata* synthesize sulfated polysaccharides mainly composed by [→4)-β-D-glucuronic acid-(1→4)-α-L-rhamnose 3-sulfate-(1→].

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 –	ESQUEMA DA AUTO-HIDRÓLISE DE POLISSACARÍDEOS ÁCIDOS	43
FIGURA 2 –	ASPECTO GERAL DAS ALGAS VERDES <i>Gayralia oxysperma</i> (a), <i>Ulva lactuca</i> (b) E <i>U. fasciata</i> (c)	49
FIGURA 3 –	ESQUEMA DE EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS SINTETIZADOS PELA ALGA VERDE <i>G. oxysperma</i>	68
FIGURA 4 –	ESPECTROS DE RMN DE ^{13}C DAS FRAÇÕES BRUTAS Go1 (a), Go2 (b), Go3 (c), Go4 (d), Go5 (e), Go6 (f)	78
FIGURA 5 –	ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DA CARBODIIMIDA (CMC)	79
FIGURA 6 –	ESPECTROS DE RMN DE ^{13}C DAS FRAÇÕES BRUTAS CARBOXI-REDUZIDAS/DESSULFATADAS Go1-RD (a), Go3-RD (b), Go4-RD (c) e Go6-RD (d)	80
FIGURA 7 –	PERFIL DE ELUIÇÃO EM HPSEC COM DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO DAS FRAÇÕES BRUTAS Go3–Go6 OBTIDAS DE <i>G. oxysperma</i>	81
FIGURA 8 –	ESQUEMA DOS FRACIONAMENTOS CROMATOGRÁFICOS DA FRAÇÃO BRUTA Go3 OBTIDA DE <i>G. oxysperma</i>	83
FIGURA 9 –	CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO ESTÉRICA (HPSEC-MALLS-IR) DA FRAÇÃO RETIDA EM MEMBRANA DE 300 kDa Go3r	86
FIGURA 10 –	CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO ESTÉRICA (HPSEC-MALLS-IR) DA FRAÇÃO ELUÍDA EM MEMBRANA DE 300 kDa Go3e	87
FIGURA 11 –	PERFIL DE ELUIÇÃO EM HPSEC COM DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO DAS FRAÇÕES Go3, Go3r E Go3e	88

FIGURA 12 – SEQÜÊNCIAS METODOLÓGICAS UTILIZADAS PARA CARACTERIZAÇÃO DA ESTRUTURA QUÍMICA FINA DA HETERORAMNANA Go3r	91
FIGURA 13 – EXEMPLO DA CARBOXI-REDUÇÃO DA AMOSTRA Go3r NA PRESENÇA DE NaBD ₄ : (a) FORMAÇÃO DA HEXOSE DEUTERADA; (b) FRAGMENTO DE MASSA (CLG-EM)	93
FIGURA 14 – EXEMPLO DO PROCESSO DE TRIDEUTERIOMETILAÇÃO DE Go3r-R: (a) SEQUÊNCIA METODOLÓGICA; (b) FRAGMENTO DE MASSA (CLG-EM) – UTILIZANDO COMO EXEMPLO 4-RAM (4-Me E 4-CD ₃)	100
FIGURA 15 – PERFIL DE ELUIÇÃO EM HPSEC COM DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO DAS FRAÇÕES Go3r E Go3r-S	106
FIGURA 16 – ESPECTROS DE RMN DE ¹³ C DAS FRAÇÕES Go3 (a), Go3r (b) E Go3r-RD (c)	111
FIGURA 17 – ESPECTROS DE RMN DE ¹³ C DAS FRAÇÕES Go3r-S (a) E Go3r-SD (b)	114
FIGURA 18 – ESPECTROS DE RMN DE ¹ H DAS FRAÇÕES Go3r (a), Go3r-RD (b), Go3r-S (c) E Go3r-SD (d)	116
FIGURA 19 – ESPECTROS DE HMQC DAS FRAÇÕES DESSULFATADAS Go3r-RD (a) E Go3r-SD (b)	118
FIGURA 20 – PRINCIPAIS UNIDADES DE RAMNOSE PRESENTES NAS FRAÇÕES Go3r-RD (a) E Go3r-SD (b)	119
FIGURA 21 – PRINCIPAIS UNIDADES DE RAMNOSE PRESENTES NA HETERORAMNANA SULFATADA Go3r	120
FIGURA 22 – DETERMINAÇÃO DO TEOR DE AÇÚCARES REDUTORES EM FUNÇÃO DO TEMPO DE AUTO-HIDRÓLISE	123
FIGURA 23 – ESPECTROS DE RMN DE ¹³ C DAS FRAÇÕES OBTIDAS APÓS AUTO-HIDRÓLISE DA FRAÇÃO BRUTA Go4	124

FIGURA 24 – CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO DO HIDROLISADO Go4s EM BIO-GEL P-2	126
FIGURA 25 – ESPECTRO DE RMN DE ¹³ C DA FRAÇÃO OLIGOSSACARÍDICA Go4C	126
FIGURA 26 – CROMATOGRAFIA DE TROCA ANIÔNICA DA FRAÇÃO OLIGOSSACARÍDICA Go4A EM DEAE-Sephacel	127
FIGURA 27 – ESPECTRO DE HMQC DO OLIGOSSACARÍDEO oligo-W. REGIÕES: ANOMÉRICA (a) E C-2–C-5/H-2–H5 (b)	130
FIGURA 28 – ESI-MS (MODO NEGATIVO) DA FRAÇÃO OLIGOSSACARÍDICA oligo-A2	133
FIGURA 29 – ESPECTROS DE RMN DE ¹³ C DAS FRAÇÕES OLIGOSSACARÍDICAS oligo-A2 (a), oligo-18 (b) E oligo-D9 (c)	135
FIGURA 30 – PURIFICAÇÃO POR MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS DA FRAÇÃO OLIGOSSACARÍDICA oligo-A2: EXCLUSÃO EM BIO-GEL P-2 (a), TROCA ANIÔNICA EM DEAE-Sephacel (b)	136
FIGURA 31 – ESI-MS (MODO NEGATIVO) DAS FRAÇÕES OLIGOSSACARÍDICAS oligo-18 E oligo-D9 (b)	138
FIGURA 32 – ESTRUTURA ESQUEMÁTICA DO DECASSACARÍDEO PRESENTE NA FRAÇÃO oligo-D9	140
FIGURA 33 – ESQUEMA DE EXTRAÇÃO (a) E FRACIONAMENTO (b) DOS POLISSACARÍDEOS SINTETIZADOS PELA ALGA VERDE <i>U. lactuca</i>	145
FIGURA 34 – PERFIL DE ELUIÇÃO EM HPSEC DAS FRAÇÕES BRUTAS Uf OBTIDA DE <i>U. fasciata</i> (a) E Uv2–Uv4 OBTIDAS DE <i>U. lactuca</i> (b)	148
FIGURA 35 – PERFIL DE ELUIÇÃO EM HPSEC COM DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO DAS FRAÇÕES Uv2r E Uv2e	149
FIGURA 36 – ESPECTROS DE RMN DE ¹³ C DAS FRAÇÕES Uv2r (a), Uv2r-R (b) E Uv2r-RD (c)	155

FIGURA 37 – ESPECTROS DE RMN DE ^{13}C DAS FRAÇÕES Uf (a) E Uf-D (b)	156
FIGURA 38 – ESQUEMA DAS PRINCIPAIS DÍADES PRESENTES NAS FRAÇÕES Uv2r E Uf (a) E EM SEUS RESPECTIVOS PRODUTOS DE MODIFICAÇÕES QUÍMICAS: Uv2r-R (b) E Uv2r-RD E Uf-D (c)	158

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 –	CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS DOS POLISSACARÍDEOS EXTRAÍDOS DE ALGAS DA ORDEM ULVALES	33
TABELA 2 –	ESTRUTURA QUÍMICA DE OLIGOSSACARÍDEOS PRODUZIDOS A PARTIR DE ULVANAS	36
TABELA 3 –	RENDIMENTO DOS AÇÚCARES LIBERADOS DURANTE O PROCESSO DE PRÉ-HIDRÓLISE ÁCIDA (TFA 45') SEGUIDA DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA COM <i>Helix pomatia</i>	40
TABELA 4 –	RENDIMENTOS E ANÁLISES QUÍMICAS DAS FRAÇÕES BRUTAS OBTIDAS DE <i>G. oxysperma</i>	70
TABELA 5 –	MONOSSACARÍDEOS NEUTROS PRESENTES NAS FRAÇÕES BRUTAS OBTIDAS DE <i>G. oxysperma</i>	72
TABELA 6 –	RENDIMENTOS, ANÁLISES QUÍMICAS E MONOSSACARÍDEOS NEUTROS DAS FRAÇÕES BRUTAS CARBOXI-REDUZIDAS E CARBOXI-REDUZIDAS/DESSULFATADAS.....	74
TABELA 7 –	ANÁLISE DE METILAÇÃO DAS FRAÇÕES BRUTAS CARBOXI-REDUZIDAS	76
TABELA 8 –	RENDIMENTOS E ANÁLISES QUÍMICAS DAS SUB-FRAÇÕES OBTIDAS APÓS CROMATOGRAFIA DE TROCA ANIÔNICA DA FRAÇÃO BRUTA Go3	85
TABELA 9 –	RENDIMENTOS E ANÁLISES QUÍMICAS DAS FRAÇÕES Go3r E Go3e	89
TABELA 10 –	MONOSSACARÍDEOS NEUTROS PRESENTES NAS FRAÇÕES Go3r E Go3e.....	90
TABELA 11 –	RENDIMENTOS E ANÁLISES QUÍMICAS DAS FRAÇÕES Go3r-R E Go3r-RD.....	94

TABELA 12 – MONOSSACARÍDEOS NEUTROS PRESENTES NAS FRAÇÕES Go3r-R E Go3r-RD	94
TABELA 13 – ANÁLISE DE METILAÇÃO DAS FRAÇÕES Go3r-R E Go3r-RD.	97
TABELA 14 – ANÁLISES DOS DERIVADOS DE RAMNOSE OBTIDOS APÓS TRIDEUTERIOMETILAÇÃO DA FRAÇÃO Go3r-R.....	101
TABELA 15 – RENDIMENTOS, ANÁLISES QUÍMICAS E MONOSSACARÍDEOS NEUTROS DAS FRAÇÕES Go3r-S, Go3r-SD, Go3r-R E Go3r-RSD	105
TABELA 16 – ANÁLISE DE METILAÇÃO DAS FRAÇÕES Go3r-RS E Go3r-RSD.....	108
TABELA 17 – DESLOCAMENTOS QUÍMICOS ASSINALADOS A PARTIR DOS ESPECTROS MONO E BIDIMENSIONAIS DAS FRAÇÕES Go3r-RD E Go3r-SD	121
TABELA 18 – ANÁLISE DE METILAÇÃO DO OLIGOSSACARÍDEO oligo-W ...	128
TABELA 19 – DESLOCAMENTOS QUÍMICOS ASSINALADOS A PARTIR DOS ESPECTROS MONO E BIDIMENSIONAIS DA FRAÇÃO oligo-W	131
TABELA 20 – PRINCIPAIS ÍONS FORMADOS POR ANÁLISE DE ESI-MS (MODO NEGATIVO) DA FRAÇÃO OLIGOSSACARÍDICA oligo-A2.....	134
TABELA 21 – ATIVIDADE ANTIVIRAL DAS FRAÇÕES Go3, Go3r E Go4 OBTIDAS DE <i>G. oxysperma</i>	142
TABELA 22 – RENDIMENTOS E ANÁLISES QUÍMICAS DAS FRAÇÕES BRUTAS OBTIDAS DE <i>U. lactuca</i> (Uv) E <i>U. fasciata</i> (Uf)	146
TABELA 23 – MONOSSACARÍDEOS NEUTROS PRESENTES NAS FRAÇÕES BRUTAS OBTIDAS DE <i>U. lactuca</i> (U) E <i>U. fasciata</i> (Uf)	148
TABELA 24 – RENDIMENTOS E ANÁLISES QUÍMICAS DAS FRAÇÕES Uv2e, Uv2r, Uv2r-R, Uv2r-RD e Uf-D	151

TABELA 25 – MONOSSACARÍDEOS NEUTROS PRESENTES NAS FRAÇÕES Uv2e, Uv2r, Uv2r-R, Uv2r-RD E Uf-D	151
TABELA 26 – DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DAS PRINCIPAIS UNIDADES DISSACARÍDICAS OBTIDAS POR RMN DE ¹³ C DAS FRAÇÕES Uv2r, Uv2r-R, Uv2r-RD, Uf E Uf-D	157

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

δ – deslocamento químico (em ppm)

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

^{13}C – carbono 13

^1H – próton

BSA – soro albumina bovina

CC₅₀ – concentração citotóxica 50%

CCD – cromatografia em camada delgada

CD₃ – grupo metil trideuterado

CH₃ – grupo metil

CLG – cromatografia líquida gasosa

CLG-EM – cromatografia líquida gasosa acoplada a espectrometria de massa

CMC – 1-ciclohexil-3-(2-morfolinoetil) carbodiimida

COSY – *correlation spectroscopy*

D₂O – água deuterada

dn/dc – variação do índice de refração em relação a concentração

ESI-MS – *electrospray-ionization mass spectrometry*

FID – detector de ionização de chama

HMQC – *heteronuclear multiple quantum correlation spectroscopy*

HPSEC-MALLS-RI – cromatografia de exclusão estérica de alta resolução acoplada a detectores de índice de refração e espalhamento de luz

HSV-1 F – vírus herpes simplex tipo 1

HSV-2 MS – vírus herpes simplex tipo 2

IC₅₀ – concentração inibitória 50%

ICD₃ – iodometano trideuterado

ICH₃ – iodometano

IR – índice de refração

IV – infravermelho

IS – índice de seletividade

m/v – relação entre massa e volume

m/z – relação entre massa e carga

MEM – meio essencial mínimo de Eagle

MM – meio de manutenção

MTT – brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio

Mw – massa molecular ponderal média

NaBD₄ – borodeutério de sódio

NaBH₄ – boroidreto de sódio

m-NaIO₄ – metaperiodato de sódio

PFU – unidades formadoras de placas

ppm – partes por milhão

RMN – ressonância magnética nuclear

TFA – ácido trifluoracético

TOCSY – *total correlation spectroscopy*

v/v – relação entre volume e volume

Vo – volume morto

Go1-Go2 – frações brutas obtidas por extrações aquosas a 25 °C (*G. oxysperma*)

Go3-Go6 – frações brutas obtidas por extrações aquosas a 80 °C (*G. oxysperma*)

Go1-R, Go3-R, Go4-R, Go6-R – frações brutas carboxi-reduzidas

Go1-RD, Go3-RD, Go4-RD, Go6-RD – frações brutas carboxi-reduzidas e dessulfatadas

Go3e – fração eluída por ultrafiltração em membrana de 300 kDa

Go3r – fração retida por ultrafiltração em membrana de 300 kDa

Go3r-R – Go3r carboxi-reduzida na presença de NaBD₄

Go3r-RD – Go3r-R dessulfatada

Go3r-RS – Go3r-R após degradação controlada de Smith

Go3r-RSD – Go3r-RS dessulfatada

Go3r-S – Go3r após degradação controlada de Smith

Go3r-SD – Go3r-S dessulfatada

Go4i – fração insolúvel após auto-hidrólise de Go4

Go4s – fração solúvel em etanol após auto-hidrólise de Go4

Go4p – fração insolúvel em etanol após auto-hidrólise de Go4

Go4A, Go4B, Go4C, Go4D – frações obtidas após cromatografia de Go4s em Bio-Gel P-2

oligo-A2 – fração ácida obtida após cromatografia de troca iônica de Go4A

oligo-W – fração neutra obtida após cromatografia de troca iônica de Go4A

oligo-18 – fração ácida obtida após cromatografia do oligo-A2 em Bio-Gel P-2

oligo-D9 – fração ácida obtida após cromatografia de troca iônica do oligo-A2

Uv1-Uv2 – frações brutas obtidas por extrações aquosas a 25 °C (*U. lactuca*)

Uv3-Uv6 – frações brutas obtidas por extrações aquosas a 80 °C (*U. lactuca*)

Uv2r – fração retida por ultrafiltração em membrana de 500 kDa

Uv2r-R – Uv2r carboxi-reduzida

Uv2r-RD - Uv2r-R dessulfatada

Uf – fração bruta obtida por autoclavagem a 110 °C (*U. fasciata*)

Uf-D – Uf dessulfatada

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	24
1.1 OBJETIVO GERAL	25
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
2. REVISÃO DE LITERATURA	26
2.1 ALGAS VERDES (CHLOROPHYTA)	26
2.2 POLISSACARÍDEOS OBTIDOS DE ALGAS VERDES DA ORDEM ULVALES	31
2.3 PRODUÇÃO DE OLIGOSSACARÍDEOS ATRAVÉS DE AUTO- HIDRÓLISE DE POLISSACARÍDEOS ÁCIDOS	41
2.4 ATIVIDADE ANTIVIRAL DOS POLISSACARÍDEOS SULFATADOS OBTIDOS DE ALGAS VERDES.....	44
2.5 DISTRIBUIÇÃO DAS ALGAS VERDES EM ESTUDO	45
2.5.1 <i>Gayralia oxysperma</i>	45
2.5.2 <i>Ulva lactuca</i> e <i>Ulva fasciata</i>	46
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	48
3.1 POSICIONAMENTO SISTEMÁTICO DAS ESPÉCIES ESTUDADAS	48
3.2 COLETA E PROCESSAMENTO.....	49
3.3 EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS	50
3.4 ULTRAFILTRAÇÃO EM MEMBRANA	51
3.5 MÉTODOS ANALÍTICOS GERAIS	52
3.5.1 Carboidratos Totais.....	52
3.5.2 Açúcar Redutor	52
3.5.3 Proteínas Totais.....	52
3.5.4 Sulfato.....	52

3.5.5	Ácidos Urônicos.....	53
3.5.6	Polarimetria.....	53
3.5.7	Determinação da Configuração Enantiomérica da Ramnose	53
3.6	HIDRÓLISE ÁCIDA TOTAL.....	53
3.7	MODIFICAÇÕES QUÍMICAS DOS POLISSACARÍDEOS	54
3.7.1	Carboxi-Redução.....	54
3.7.2	Dessulfatação por Tratamento Solvolítico	55
3.7.3	Degradação Controlada de Smith.....	55
3.7.4	Auto-Hidrólise – Obtenção de Oligossacarídeos	56
3.8	ANÁLISE DE METILAÇÃO.....	57
3.8.1	Preparo do Sal de Trietilamônio	57
3.8.2	Metilação e Derivatização	57
3.8.3	Trideuteriometilação	58
3.9	MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS	58
3.9.1	Cromatografia de Troca Iônica (DEAE-Sephacel)	58
3.9.2	Cromatografia de Exclusão.....	58
3.9.3	Cromatografia Líquido-Gasosa (CLG)	60
3.9.4	Cromatografia Líquido-Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massa (CLG-EM)	60
3.9.5	Cromatografia de Exclusão Estérica de Alta Pressão (HPSEC) Acoplada a Detector de Índice de Refração (IR) Diferencial e Espalhamento de Luz em Multiângulos (MALLS).....	61
3.9.6	Cromatografia em Camada Delgada (CCD)	61
3.10	RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR	62
3.10.1	Técnicas de RMN Monodimensionais.....	62
3.10.2	Técnicas de RMN Bidimensionais	63

3.11 ELECTROSPRAY-IONIZATION MASS SPECTROMETRY (ESI-MS)	64
3.12 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIHERPÉTICA DAS HETERORAMNANAS OBTIDAS DE <i>G. oxysperma</i>	64
3.12.1 Ensaio de Citotoxicidade	65
3.12.2 Determinação da Atividade Antiviral <i>in vitro</i>	65
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	67
4.1 OBTENÇÃO E ANÁLISES DAS FRAÇÕES BRUTAS DE <i>G. oxysperma</i> ...	67
4.1.1 Extração e Obtenção dos Polissacarídeos	67
4.1.2 Análises Químicas das Frações Brutas	69
4.1.3 Composição Monossacarídica das Frações Brutas	71
4.1.4 Análise de Metilação das Frações Brutas Carboxi-Reduzidas	75
4.1.5 RMN de ¹³ C das Frações Brutas Nativas, Carboxi-Reduzidas e Carboxi- Reduzidas/Dessulfatadas	77
4.1.6 Homogeneidade das Frações Brutas Obtidas de <i>G. oxysperma</i>	81
4.2 PURIFICAÇÃO DA FRAÇÃO BRUTA Go3	82
4.2.1 Cromatografias de Troca Iônica e Exclusão da Fração Bruta Go3.....	82
4.2.2 Ultrafiltração em Membrana da Fração Bruta Go3	85
4.3 ANÁLISE ESTRUTURAL DA FRAÇÃO HOMOGÊNEA Go3r	88
4.3.1 Análises Químicas	88
4.3.2 Composição Monossacarídica.....	89
4.3.3 Carboxi-Redução da Fração Go3r.....	92
4.3.4 Dessulfatação Solvólítica (Solvólise) da Fração Go3r-R	95
4.3.5 Análise de Metilação das Frações Go3r-R e Go3r-RD	95
4.3.5.1 Trideuteriometilação da fração Go3r-R.....	99
4.3.6 Degradação Controlada de Smith e Dessulfatação Solvólítica dos Produtos	103

4.3.7	Análise de Homogeneidade do Produto de Degradação controlada de Smith Go3r-S	106
4.3.8	Análise de Metilação das frações Go3r-RS e Go3r-RSD.....	107
4.3.9	Análises de RMN das Frações Go3r, Go3r-RD, Go3r-S e Go3r-SD.....	109
4.4	OBTENÇÃO E ANÁLISE DOS OLIGOSSACARÍDEOS	122
4.4.1	Auto-Hidrólise Analítica	122
4.4.2	Auto-Hidrólise Preparativa e Purificação dos Oligossacarídeos	125
4.4.3	Análise Estrutural do Oligossacarídeo Neutro oligo-W	128
4.4.4	Análise Estrutural da Fração Oligossacarídica Ácida oligo-A2	132
4.5	ATIVIDADE ANTIVIRAL DAS HETERORAMNANAS SULFATADAS ISOLADAS DE <i>G. oxysperma</i>	141
4.5.1	Teste de Citotoxicidade das Heteroramnanas Go3, Go3r e Go4	141
4.5.2	Teste da Atividade Antiviral das Heteroramnanas Contra HSV-1 e HSV-2	141
4.6	CARACTERIZAÇÃO GERAL DAS ULVANAS EXTRAÍDAS DE <i>Ulva lactuca</i> E <i>U. fasciata</i>	144
5.	CONCLUSÕES	159
	REFERÊNCIAS	161
	ANEXO	172

1. INTRODUÇÃO

Várias espécies de algas verdes estão distribuídas ao longo do litoral brasileiro, desde a região Nordeste até a região Sul do país. Apesar dessa ampla distribuição, são poucos os estudos estruturais com seus polissacarídeos, tanto em âmbito nacional, como internacional, sendo que as informações mais detalhadas sobre a estrutura química fina dos polissacarídeos sulfatados obtidos de tais organismos são provenientes de estudos com espécies das ordens Bryopsidales e Ulvales. Esses polímeros apresentam uma grande diversidade estrutural em termos de composição monossacarídica, tipos de ligações glicosídicas, grau de ramificação, teor e posicionamento de grupos sulfatos. Dentro da ordem Ulvales são encontrados principalmente dois tipos de estruturas polissacarídicas, as glucuronoxiloramnanas (denominadas ulvanas) e as ramnanas sulfatadas, produzidas por algas dos gêneros *Ulva* e *Enteromorpha*, e *Monostroma*, respectivamente. Tais estruturas assemelham-se por serem constituídas majoritariamente por ramnose e apresentarem elevados teores de grupos sulfato, e diferem-se pela presença de ácidos urônicos na primeira, e ausência dos mesmos na segunda.

Os polissacarídeos sulfatados obtidos de clorófitas marinhas são compostos conhecidamente bioativos, apresentando atividades anticoagulante, antioxidante, antihiperlipidêmica e antiviral. Os agentes antivirais são encontrados em menores quantidade e diversidade dentro das classes de fármacos existentes e, com frequência, levam a resistência. Nesse aspecto os polissacarídeos sulfatados obtidos a partir de algas marinhas são promissores agentes com atividade biológica, pois normalmente apresentam alta seletividade e são atóxicos.

Assim, considerando que estudos sobre a estrutura química fina dos polissacarídeos biossintetizados por clorófitas marinhas são escassos, a grande biodiversidade nacional de macroalgas marinhas verdes e a bioatividade apresentada pelos mesmos, a análise estrutural e a avaliação de atividades biológicas dos polissacarídeos sulfatados produzidos por macroalgas marinhas verdes poderá abrir um novo campo no aproveitamento dessa biomassa.

1.1 OBJETIVOS GERAIS

- ❖ A presente tese de doutorado teve por objetivo geral o estudo da estrutura química dos polissacarídeos solúveis em meio aquoso, obtidos da macroalga marinha *Gayralia oxysperma* (Kützinger) K.L. Vinogradova ex Scagel et al.
- ❖ Avaliar a atividade antiviral dos polissacarídeos sulfatados de *G. oxysperma*
- ❖ Caracterizar estruturalmente os polissacarídeos solúveis em meio aquoso sintetizados pelas algas verdes *Ulva lactuca* Linnaeus e *Ulva fasciata* Delile

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Extrair os polissacarídeos solúveis em meio aquoso a 25 °C e 80 °C;
- Purificar os polissacarídeos solúveis obtidos por extração aquosa;
- Determinar a estrutura química da principal fração polissacarídica por métodos químicos (hidrólise total, carboxi-redução, dessulfatação solvolítica, análise de metilação);
- Determinar a estrutura química da principal fração polissacarídica por métodos espectroscópicos (infravermelho, ressonância magnética nuclear monodimensional e bidimensional);
- Avaliar a atividade antiherpética dos polissacarídeos sulfatados de *G. oxysperma*;
- Produzir oligossacarídeos, a partir dos polissacarídeos;
- Caracterizar as principais frações oligossacarídicas;
- Caracterizar estruturalmente os polissacarídeos produzidos por *Ulva lactuca* e *U. fasciata*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

A vida, assim como é conhecida, começou nos oceanos, e as algas estão entre os organismos vivos mais antigos do mundo (PAINTER, 1983). Há pelo menos 3,8 bilhões de anos atrás a vida surgiu no planeta sob a forma de seres unicelulares heterotróficos. Há 3,2 bilhões de anos surgiram as primeiras “algas” caracterizadas pela sua capacidade autotrófica de sobrevivência. Há 2,0 bilhões de anos as mesmas transformaram radicalmente o planeta Terra, sendo responsáveis pela atmosfera oxidante que nos envolve até hoje (CARVALHO, 2004).

Esses organismos, que são abundantes neste planeta aquoso, são importantes no ciclo do carbono, transformando o dióxido de carbono em carboidratos, através da fotossíntese, e em carbonato de cálcio, pela calcificação (RAVEN, EVERT e EICHHORN, 2001).

As paredes celulares das algas marinhas, assim como de plantas superiores, podem ser entendidas como um sistema de duas fases: a *fase cristalina* (o esqueleto) que se encontra embebida em uma *fase amorfa* (a matriz). Elas diferem das plantas terrestres por apresentarem maior abundância de componentes da matriz quando comparados com os componentes do esqueleto e pela prevalência de polissacarídeos polianiônicos sobre os neutros. Além disso, paredes celulares de algas e plantas marinhas contêm polissacarídeos sulfatados, não observados em plantas terrestres e algas de água doce. Isto sugere que os polissacarídeos sulfatados da matriz extracelular têm funções específicas em relação ao ambiente marinho, sendo postulado que os mesmos estão relacionados com a regulação mecânica, osmótica ou iônica (KLOAREG e QUATRANO, 1988).

2.1 ALGAS VERDES (CHLOROPHYTA)

As algas verdes marinhas estão largamente distribuídas pelo litoral brasileiro, sendo encontrada uma grande variedade de espécies desde a região nordeste até o sul do Brasil. A presença das algas *Gayralia oxysperma* (Kützing) K.L. Vinogradova

ex Scagel et al., *Ulva lactuca* Linnaeus e *U. fasciata* Delile, objetos de estudo dessa tese, foi relatada em todos os estados da região sul do Brasil (OLIVEIRA et al., 1999).

Embora a maioria das clorófitas seja aquática, elas são encontradas em uma ampla variedade de habitats, tais como a superfície da neve (algas unicelulares do gênero *Chlamydomonas* e *Chloromonas*), troncos de árvores (por exemplo, algas do gênero *Trentepohlia*), em associações simbióticas com fungos (constituindo os líquens), dentre outros. Dentre várias classes de algas verdes, a Ulvophyceae é predominantemente constituída por espécies marinhas, embora haja alguns representantes de água doce, os quais provavelmente migraram do hábitat marinho no passado (RAVEN, EVERT e EICHHORN, 2001). A maioria dos organismos representantes dessa classe está incluída nas ordens Ulvales, Cladophorales, Bryopsidales e Dasycladales (WYNNE, 2005).

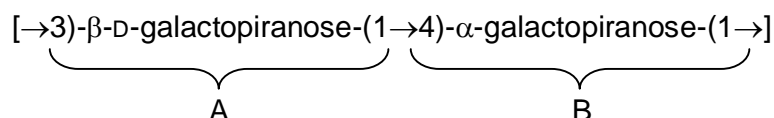
Algumas clorófitas pertencentes à ordem Ulvales são utilizadas por vários povos como alimento (“vegetais marinhos”) (RAY e LAHAYE, 1995a; LAHAYE, 1998; PELLIZZARI, OLIVEIRA e YOKOYA, 2004). As algas marinhas suprem as necessidades de sais, assim como de inúmeras vitaminas e elementos-traço importantes e, por isso, são alimentos suplementares valiosos. Algumas algas verdes, tais como *Ulva* spp., ou “alface-do-mar”, também são consumidas como verduras (RAVEN, EVERT e EICHHORN, 2001).

Estudos realizados com a alga *Monostroma undulatum* demonstraram que a mesma é uma boa fonte de cálcio, fósforo, potássio e sódio, além de apresentar elevado conteúdo de vitamina C (superior a recomendação diária - RDA) e fibras solúveis (RISSO et al., 2003). Ortiz et al. (2006) estudaram a composição nutricional de exemplares da espécie *U. lactuca* obtidos no Chile, e verificaram que a mesma era rica em aminoácidos essenciais, em fibras solúveis e insolúveis, tocoferóis e ácidos graxos monoinsaturados (MUFAs), sugerindo que essa Chlorophyta é um alimento de alto valor nutritivo para a dieta humana e animal.

As algas verdes marinhas sintetizam polissacarídeos sulfatados de interesse comercial, seja pelas suas propriedades geleificantes (LAHAYE e AXELOS, 1993; CHEN e CHEN, 2001), atividades biológicas (SANTOS et al., 1999; LEE et al., 2004;

RAYMUNDO, HORTA e FETT, 2004) ou pelo seu valor nutricional (RISSO *et al.*, 2003; PÁDUA, FONTOURA e MATHIAS, 2004; ORTIZ *et al.*, 2006).

Os polissacarídeos que constituem a matriz extracelular, na parede celular dessas algas, apresentam uma grande diversidade estrutural, não havendo uma estrutura repetitiva de unidades monossacarídicas como é observado nos polissacarídeos obtidos de algas vermelhas, as quais biossintetizam galactanas sulfatadas, onde as unidades de galactose estão dispostas em uma cadeia linear com alternância de unidades designadas por A e B (AB_n). A unidade A está ligada através dos carbonos C-1 e C-3, enquanto que a unidade B está ligada através dos carbonos C-1 e C-4, podendo estar totalmente ciclizada na forma de 3,6-anidro-galactose:



Além disso, estudos relacionados à estrutura química fina dos polissacarídeos biossintetizados por clorófitas são encontrados em menores quantidades quando comparados aos estudos relacionados aos polissacarídeos de algas vermelhas.

Alguns autores classificaram os diferentes tipos estruturais de polissacarídeos obtidos de algas verdes em dois grupos, sendo os mesmos denominados de xilogalactoarabinanas (ou xiloarabinogalactanas) e glucuronoxiloramnanas (PAINTER, 1983; KLOAREG e QUATRANO, 1988). Com o avanço das técnicas e dos estudos da estrutura química dos polissacarídeos biossintetizados por tais organismos, foi confirmada a grande variedade estrutural de tais polímeros e a classificação acima mencionada não tem sido adotada.

Na classificação proposta por Painter (1983) e Kloareg e Quatrano (1988), o grupo das **xilogalactoarabinanas** (ou **xiloarabinogalactanas**) era constituído por polissacarídeos sulfatados, biossintetizados por algumas algas verdes das ordens Cladophorales e Bryopsidales (WYNNE, 2005). Tais polímeros continham unidades

não redutoras de xilose e galactose, sendo a cadeia principal constituída por blocos de L-arabinose 4-ligadas separadas por unidades de D-galactose.

Ramana e Rao (1991) identificaram polissacarídeos semelhantes aos descritos acima, obtidos da alga *Cladophora socialis* (ordem Cladophorales), como sendo xiloarabinogalactanas sulfatadas, constituídas por uma cadeia principal de galactose e arabinose, as quais se apresentam ligadas através dos C-3 e C-4, respectivamente. A presença de unidades laterais de xilose substituindo tanto a galactose como a arabinose, assim como sulfatação em C-3 da arabinose e C-4 e C-6 da galactose, foram confirmados por análises de dessulfatação, metilação e hidrólise parcial.

De modo diferente, *Chaetomorpha anteninna*, que pertence à mesma ordem da alga anteriormente citada, biossintetiza uma ramnogalactoarabinana sulfatada, cuja cadeia principal é constituída majoritariamente por unidades de [\rightarrow 4)-L-arabinopiranosose-(1 \rightarrow 4)-D-galactopiranosose], com baixos teores de L-ramnose 4-ligada, havendo sulfatação em diferentes posições, além da presença de unidades laterais de arabinose 4-sulfato (RAO e RAMANA, 1991).

A alga *Spongomorpha indica* biossintetiza polissacarídeos sulfatados semelhantes àqueles descritos para a ordem Cladophorales, a qual ela pertence, porém, tais polímeros são adicionalmente constituídos por unidades de α -L-arabinofuranose. Essas xiloarabinogalactanas sulfatadas apresentam como cadeia principal unidades de α -L-arabinofuranose 2- e 3-ligadas (esta última pode conter grupo sulfato em C-2), α -L-arabinopiranosose 4-ligada 2-sulfato, além de β -D-galactopiranosose e β -D-glucopiranosose 4-ligada. Esses polímeros apresentam ainda unidades de β -D-galactopiranosose 2,3-dissulfatadas, além de unidades laterais de α -D-xilose e α -L-arabinose 3-sulfato (RAO, RAO e RAMANA, 1991).

Caulerpa taxifolia, ordem Bryopsidales, biossintetiza uma xilomanogalactana, na qual a cadeia principal é constituída por unidades de xilose 4-ligadas, manose 4,6-ligadas e galactose com diferentes padrões de ligação: 4-ligada, sulfatada ou não em C-3, 6-ligada e como terminal não redutor (RAO e RAO, 1986). Diferentemente, foi extraído de *C. racemosa* uma xiloarabinogalactana ramificada,

na qual os principais sítios de sulfatação são o C-3 de arabinose 4-ligada e C-6 de galactose 3-ligada (CHATTOPADHYAY *et al.*, 2007a).

Vários trabalhos têm demonstrado que *Codium* spp. (Bryopsidales) sintetizam diferentes tipos de polissacarídeos sulfatados, porém são poucos os relatos da estrutura química fina de tais polímeros. Como exemplo, é descrito a presença de arabinogalactana (LOVE e PERCIVAL, 1964), arabinana (UEHARA, TAKESHITA E MAEDA, 1992), galactoarabinoglucana (SIDDHANTA *et al.*, 1999), glucogalactana (MATSUBARA *et al.*, 2001) e galactanas (FARIAS *et al.*, 2008).

Ciancia *et al.* (2007) isolaram de *C. fragile* e *C. vermilara*, através de extrações aquosas em diferentes temperaturas, frações sulfatadas ricas em galactose e arabinose, com variados teores de acetal de ácido pirúvico, e frações ricas em manose. Como os autores não utilizaram metodologias de purificação, eles não puderam afirmar se as primeiras frações eram constituídas por arabinanas, galactanas e/ou arabinogalactanas.

Farias *et al.* (2008) isolaram de *C. isthmocladum* uma galactana sulfatada e piruvatada, constituída principalmente por unidades de β -D-galactopiranosose 3-ligadas e sulfatadas em C-4, e em menores proporções as unidades de β -D-galactopiranosose 3-ligadas 4,6-dissulfatadas, β -D-galactopiranosose 6-ligadas 4-sulfatadas e terminais não redutores piruvatados através dos carbonos C-3 e C-4. Estrutura semelhante havia sido descrita para os polissacarídeos obtidos de *C. yezoense* (BILAN *et al.*, 2007).

Diferente das estruturas polissacarídicas mencionadas acima, o grupo denominado de **glucuronoxiloramnanas** era composto por polissacarídeos sulfatados e carboxilados, obtidos de algumas espécies das ordens Ulvales, Acrosiphoniales e Urosporales. Tais polímeros continham em sua cadeia principal unidades de β -D-ácido glucurônico ligado a α -L-ramnose, além de unidades de xilose, sendo que todos os monossacarídeos encontravam-se ligados através do C-4 e poderia haver sulfatação em C-2 das unidades de ramnose e/ou de xilose (PAINTER, 1983; KLOAREG e QUATRANO, 1988). Essas características foram descritas nos primeiros trabalhos realizados com espécies dos gêneros *Ulva* (BRADING, GEORG-PLANT e HARDY, 1954; PERCIVAL e WOLD, 1963) e

Enteromorpha (McKINNELL e PERCIVAL, 1962a; GOSSELIN, HOLT e LOWE, 1964).

Em contrapartida, ramnanas sulfatadas foram obtidas de espécies do gênero *Monostroma* (Ulvaes) (MAEDA *et al.*, 1991), o que mais uma vez demonstrou que não era possível dividir os polissacarídeos obtidos de algas verdes em grupos estruturais, como proposto por Painter (1983) e Kloareg e Quatrano.

Apesar de existirem vários artigos sobre polissacarídeos sulfatados obtidos de algas verdes, são poucos os que avaliam a estrutura química fina dos mesmos, sendo que as referências mais detalhadas sobre tais estruturas são provenientes de estudos com algas da ordem Ulvaes.

2.2 POLISSACARÍDEOS OBTIDOS DE ALGAS VERDES DA ORDEM ULVALES

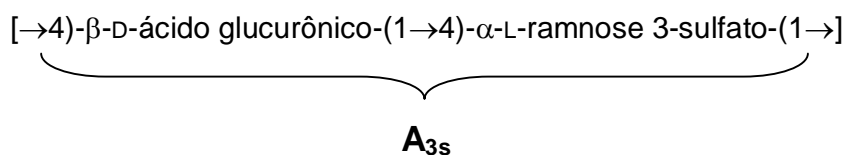
Muitos dos estudos mais atuais realizados com polissacarídeos da parede celular das algas verdes são provenientes de algas da ordem Ulvaes. Várias espécies dessa ordem são consumidas como alimentos, as quais são ricas em fibras, minerais e vitaminas (LAHAYE e AXELOS, 1993; RAY e LAHAYE, 1995a; RISSO *et al.*, 2003; ORTIZ *et al.*, 2006).

Dentre os diferentes gêneros encontrados na ordem acima citada, o gênero *Ulva* é o mais estudado quanto à estrutura química dos polissacarídeos presentes na matriz da parede celular de tais organismos. Esses polímeros foram denominados **ulvanas** por Lahaye e Axelos (1993), sendo constituídos por unidades de ramnose, xilose e ácido glucurônico formando a cadeia principal, podendo tais unidades apresentar ramificação, sulfatação ou ainda estarem como terminais não redutores (PERCIVAL e WOLD, 1963; GOSSELIN, HOLT e LOWE, 1964; RAY e LAHAYE, 1995a,b; RAY, 2006; LAHAYE e ROBIC, 2007) (TABELA 1). O estudo dos polissacarídeos obtidos de *U. lactuca*, realizado por Brading, Georg-Plant e Hardy (1954), foi um dos primeiros relatos da presença de ramnose em polissacarídeos de algas. Posteriormente, foi isolado da mesma espécie um dissacarídeo formado por unidades de [β-D-ácido glucurônico-(1→4)-L-ramnose], o que confirmou a presença desses dois monossacarídeos no polímero nativo (McKINNELL e PERCIVAL,

1962b). Além disso, foi identificado o C-2 das unidades de ramnose como principal sítio de sulfatação, além da presença de tais grupamentos em C-2 de unidades de xilose (PERCIVAL e WOLD, 1963).

Atualmente, em uma série de trabalhos foi estudada a estrutura química dos polissacarídeos obtidos da espécie *Ulva rigida*, sendo descrito que a mesma biossintetiza uma ulvana, na qual a cadeia principal é constituída por unidades de [→4)-β-D-ácido glucurônico-(1→], [→4)-α-L-ramnopiranosose 3-sulfato-(1→] e [→4)-β-D-xilopiranosose-(1→]. Após hidrólise parcial e análise dos oligossacarídeos obtidos, foi possível confirmar a presença das três unidades monossacarídicas acima citadas como constituintes da cadeia principal, além da presença de unidades de ramnose não sulfatadas em C-3 e substituídas em C-2 por terminais não redutoras de ácido glucurônico, sendo que o C-2 de xilose também foi descrito como sítio de sulfatação (RAY e LAHAYE, 1995 a,b; LAHAYE e RAY, 1996; LAHAYE, 1998) (TABELA 2).

Outros estudos realizados com diferentes espécies do gênero *Ulva* demonstraram a presença de unidades semelhantes às verificadas em *Ulva rígida*, diferindo somente nos teores de tais unidades e no grau de sulfatação (LAHAYE, BRUNEL e BONNIN, 1997; LAHAYE *et al.*, 1999). Assim, a presença da estrutura dissacarídica:



foi considerada como a principal seqüência estrutural presente nas ulvanas, sendo denominada **ácido ulvanobiurônico 3-sulfato A (A_{3s})** (LAHAYE e RAY, 1996; LAHAYE, INIZAN e VIGOUROUX, 1998) (TABELA 2). Adicionalmente, outras estruturas dissacarídicas foram descritas, sendo que nestas as unidades de ácido glucurônico são substituídas por ácido idurônico 4-ligado ou xilose 4-ligada (sulfatada ou não em C-2) (TABELA 2).

TABELA 1 – CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS DOS POLISSACARÍDEOS EXTRAÍDOS DE ALGAS DA ORDEM ULVALES

Espécie	Extração Rendimento ^a	Monossacarídeo (%)							Sulfato	Ácido Urônico	Características gerais ^c
		Ram ^b	Xil	Glc	Gal	Man	GlcA	IdoA			
<i>Ulva lactuca</i> ¹	100 °C; 20,0	55	16	13	—	—	16	n.d.	(16)	n.d.	Fração purificada. Metilação nativo: Ram 2,3,4L, 4L, TNR; Xil 2,3,4L, 4L, TNR; Glc 4L
<i>U. lactuca</i> ²	25 °C; 21,0	53	36	11	tr.	tr.	n.d.	n.d.	(15)	(19)	Fração parcialmente purificada. Infravermelho: Ram 2S Tratamento alcalino: Xil 2S
<i>U. "rigida"</i> ^{3,4}	100 °C ^d ; 20,0	24	12	3	tr.	tr.	n.d.	n.d.	36	25	Fração bruta. Metilação nativo e dessulfatado: Ram 4L3S2R, 4L3S, TNR; Xil 4L2S, 4L; GlcA 4L, TNR.
<i>U. "rigida"</i> ^{3,4}	20 °C ^e ; 3,5	20	21	10	tr.	1	n.d.	n.d.	27	21 (15)	Fração bruta.
<i>U. "rigida"</i> ^{3,4}	20 °C ^e	26	13	1	tr.	1	n.d.	n.d.	39(21)	20 (19)	Fração purificada. Metilação nativo, carboxi-reduzido, dessulfatado: Ram 4L3S2R, 4L3S, 4L2R, 4L; Xil 4L2S, 4L; GlcA 4L, TNR
<i>U. armoricana</i> ⁵	100 °C	48	10	18	3	—	15	6	(16)	(29)	Fração bruta. RMN ¹³ C: [→4)-β-D-GlcA-(1→4)-α-L-Ram 3S-(1→]; [→4)- α-L-IdoA-(1→4)-α-L-Ram 3S-(1→]
<i>U. rotundata</i> ⁵	100 °C	47	15	14	3	—	20	1	(17)	(22)	Fração bruta. RMN ¹³ C: [→4)-β-D-GlcA-(1→4)-α-L-Ram 3S-(1→]
<i>Enteromorpha compressa</i> ⁶	100 °C; 16,8	45	15	6	—	—	—	—	16	18	Fração parcialmente purificada. Infravermelho: Ram 2S
<i>E. spp.</i> ⁷	23 °C; 19,3	55	33	11	—	—	—	—	(16)	(16)	Fração bruta. Contém 3-Me ramnose. Metilação nativo: Ram 2,3,4L, 3,4L, 3L, 4L, TNR; Xil 4L, 2,4L.
<i>E. compressa</i> ⁸	80 °C ^d ; 23,0	62	15	15	4	tr.	—	—	(13)	(18)	Fração bruta. Contém 4% de Me-Hexose
	80 °C ^d	67	28	3	1	—	—	—	(17)	(16)	Fração purificada. Metilação nativo, dessulfatado, carboxi-reduzido/dessulfatado: Ram 4L3S2R, 4L3S; Xil 4L2S, 4L; GlcA 4L, TNR; Glc 4L

Continuação...

Espécie	Extração Rendimento ^a	Monossacarídeo (%)							Sulfato	Ácido Urônico	Características gerais ^c
		Ram ^b	Xil	Glc	Gal	Man	GlcA	IdoA			
<i>E. compressa</i> ⁹	82 °C; 18,0	57	15	18	10	—	—	—	(6)	(14)	Fração parcialmente purificada. Metilação nativo, dessulfatado, carboxi-reduzido e dessulfatado: Ram 4L3S2R, 4L3S, 4L; Xil 4L2S, 4L; GlcA 4L, TNR; Glc 4L
<i>Monostroma nitidum</i> ¹⁰	100 °C; 8,6	63	11	12	6	5	—	—	(20)	(3)	Fração bruta. Contém 3% de Ara
<i>M. nitidum</i> ^{10,11}	100 °C	91	7	2	—	—	—	—	(28)	-	Fração purificada. Metilação nativo e dessulfatado: Ram 3L2S, 3L, 2L
<i>M. latissimum</i> ¹¹	25 °C; 5,0	79	8	2	—	7	—	—	(6)	(7)	Fração bruta. Contém 4% de Ara
<i>M. latissimum</i> ¹¹	100 °C; 11,4	68	8	12	5	2	—	—	(5)	(8)	n.d. Contém 5% de Ara
<i>M. latissimum</i> ¹¹	100 °C	86	5	5	2	1	—	—	(7)	(4)	Fração purificada. Metilação nativo e dessulfatado: Ram 2L3S, 2L4S, 2L, 3L
<i>M. nitidum</i> ¹²	100 °C	92	7	1	—	—	—	—	(28)	tr.	Fração purificada. Metilação nativo e dessulfatado: Ram 3L2S, 3L2R ou 2L3R, 2L, TNR
<i>M. latissimum</i> ¹³	100 °C	79	8	12	—	2	—	—	(21)	(11)	Fração purificada. Metilação nativo: Ram 2,3,4L, 2,4L, 2,3L, 2L, 3L

— = não detectado; n.d. = não determinado; Entre parênteses: valores obtidos por dosagem; ^a calculado em porcentagem com relação ao peso seco da alga; ^b Ram= ramnose, Xil= xilose, Glc= glucose, Gal= galactose, Man= Manose, GlcA= ácido glucurônico, IdoA= ácido idurônico; ^c L, S, R correspondem a ligação, sulfatação e ramificação no carbono indicado, respectivamente; TNR= terminal não redutor; ^d extração com oxalato de sódio; ^e extração com KOH 4M; Ref.: 1= BRADING, GEORG-PLANT e HARDY (1954); 2= PERCIVAL e WOLD (1963); 3= RAY e LAHAYE (1995a); 4= RAY e LAHAYE (1995b); 5= LAHAYE *et al.* (1999); 6= McKINNEL e PERCIVAL (1962a); 7= GOSSELIN, HOLT e LOWE (1964); 8= RAY (2006); 9= CHATTOPADHYAY *et al.* (2007b); 10= MAEDA *et al.* (1991); 11= LEE *et al.* (1998); 12= HARADA e MAEDA (1998); 13= ZHANG *et al.* (2008).

Como citado anteriormente, Percival e Wold (1963) obtiveram de *U. lactuca* um polímero semelhante ao extraído de *U. rigida*, diferindo, porém, pela presença de grupos sulfato substituindo C-2 das unidades de ramnose, identificado pela vibração em 850 cm^{-1} na análise de infravermelho (IV), e pela presença de unidades não redutoras de xilose. As diferenças observadas nas estruturas dos polímeros foram atribuídas às diferenças naturais que podem ocorrer entre as espécies e as condições fisiológicas que cada um dos exemplares apresentava. Além disso, esses mesmos autores discutem que as absorvâncias na região de $810\text{--}860\text{ cm}^{-1}$ no espectro de IV não podem ser utilizadas para prever com exatidão a posição dos grupos sulfatos (RAY e LAHAYE, 1995b).

Os primeiros estudos realizados com polissacarídeos sulfatados isolados de espécies do gênero *Enteromorpha* também descreveram a presença de glucuronoxiloramnanas cujas unidades de ramnose encontravam-se principalmente sulfatadas em C-2. Assim como referido acima, a posição dos grupos sulfato foi caracterizada pela vibração em 850 cm^{-1} na análise de IV (McKINNEL e PERCIVAL, 1962a), sendo que atualmente vêm sendo descrito sulfatação em C-3 da ramnose dos polissacarídeos obtidos de tais espécies (RAY, 2006; CHATTOPADHYAY *et al.*, 2007b), o que mais uma vez reforça que a vibração em 850 cm^{-1} no IV não caracteriza corretamente a posição dos grupos sulfato nas ulvanas.

TABELA 2 – ESTRUTURA QUÍMICA DE OLIGOSSACARÍDEOS PRODUZIDOS A PARTIR DE ULVANAS

Oligossacarídeos	Símbolo	Alga	Histórico
Hidrólise ácida: ácido sulfúrico N, 100 °C/5 h β -D-GlcA-(1→4)-L-Rha		<i>Ulva lactuca</i> ¹	Primeira vez isolado o ácido aldobiuurônico do gênero <i>Ulva</i>
Hidrólise ácida: 0,1 M TFA 100 °C/75 min α -L-Rha-(1→4)-D-Xyl β -D-GlcA-(1→4)-[β -D-GlcA (1→2)]-L-Rha β -D-GlcA-(1→4)-[β -D-GlcA (1→2)]- α -L-Rha-(1→4)-D-Xyl β -D-GlcA-(1→2)- α -L-Rha-(1→4)-D-Xyl β -D-GlcA-(1→4)-L-Rha 3S		<i>Ulva "rigida"</i> ² Ulvana dessulfatada Ulvana nativa	Primeira referência ao nome ácido ulvanobiurônico: β -D-GlcA-(1→4)-L-Rha 3S
Hidrólise enzimática: enzima ulvano-liase Δ -(1→4)-L-Rha 3S Δ -(1→4)- α -L-Rha 3S-(1→4)- β -D-Xyl-(1→4)-L-Rha 3S Δ -(1→4)- α -L-Rha 3S-(1→4)- β -D-GlcA-(1→4)-L-Rha 3S Δ -(1→4)- α -L-Rha 3S-(1→4)- α -L-IdoA-(1→4)-L-Rha 3S Δ -(1→4)- α -L-Rha 3S-(1→4)- β -D-GlcA-(1→4)- β -D-GlcA-(1→4)-L-Rha 3S	A_{3s} $A_{3s}-U_{3s}$ $A_{3s}-A_{3s}$ $A_{3s}-B_{3s}$ $A_{3s}-GlcA-A_{3s}$	<i>Ulva</i> sp. ³ (alface do mar)	Utilizam as denominações: ✓ ácido ulvanobiurônico 3-sulfato A ✓ ácido ulvanobiurônico 3-sulfato B
Auto-Hidrólise: pH=1,9; 80 °C/24 h α -L-Rha 3S-(1→4)- β -D-GlcA-(1→4)-L-Rha 3S α -L-Rha 3S-(1→4)- α -L-IdoA-(1→4)-L-Rha 3S →4)- β -D-GlcA-(1→4)- α -L-Rha 3S-(1→	- A_{3s} - B_{3s} Bloco A_{3s}	<i>Ulva</i> sp. ⁴ (alface do mar)	Introduzem as denominações: ✓ ácido ulvanobiurônico 3-sulfato A β -D-GlcA-(1→4)-L-Rha 3S ✓ ácido ulvanobiurônico 3-sulfato B α -L-IdoA-(1→4)-L-Rha 3S

Continuação...

Oligossacarídeos	Símbolo	Alga	Histórico
Hidrólise enzimática: enzima ulvano-liase		<i>Ulva rigida</i> ⁵	Introduzem os símbolos:
Δ -(1→4)-L-Rha 3S	A _{3s}	(Ilhas Canárias)	
Δ -(1→4)- α -L-Rha 3S-(1→4)- β -D-Xyl-(1→4)-L-Rha 3S	A _{3s} -U _{3s}		✓ ácido ulvanobiurônico 3-sulfato A
Δ -(1→4)- α -L-Rha 3S-(1→4)- β -D-Xyl 2S-(1→4)-L-Rha 3S	A _{3s} -U _{2's,3s}		A _{3s}
Δ -(1→4)- α -L-Rha 3S-(1→4)- β -D-Xyl-(1→4)- α -L-Rha 3S-(1→4)- β -D-Xyl-(1→4)-L-Rha 3S	A _{3s} -U _{3s} -U _{3s}		✓ ácido ulvanobiurônico 3-sulfato B B _{3s}
Δ -(1→4)- α -L-Rha 3S-(1→4)- β -D-Xyl 2S-(1→4)- α -L-Rha 3S-(1→4)- β -D-Xyl-(1→4)-L-Rha 3S	A _{3s} -U _{2's,3s} -U _{3s}		Introduzem as denominações e símbolos:
Δ -(1→4)- α -L-Rha 3S-(1→4)- β -D-Xyl 2S-(1→4)- α -L-Rha 3S-(1→4)- β -D-Xyl-(1→4)- α -L-Rha 3S-(1→4)- β -D-Xyl-(1→4)-L-Rha 3S	A _{3s} -U _{2's,3s} -U _{3s} -U _{3s}		✓ ulvanbiose 3-sulfato β -D-Xyl-(1→4)- α -L-Rha 3S = U _{3s}
Δ -(1→4)-L-Rha 3S	A _{3s}	<i>Ulva rigida</i> ⁵	✓ ulvanbiose 2',3-sulfato
Δ -(1→4)- α -L-Rha 3S-(1→4)- β -D-Xyl-(1→4)-L-Rha 3S	A _{3s} -U _{3s}	(Brittany)	β -D-Xyl 2S-(1→4)- α -L-Rha 3S = U _{2's,3s}
Δ -(1→4)- α -L-Rha 3S-(1→4)- β -D-Xyl 2S-(1→4)-L-Rha 3S	A _{3s} -U _{2's,3s}		✓ β -D-GlcA-(1→4)-[β -D-GlcA (1→2)]- α -L-Rha 3S = A _{2g,3s}
Δ -(1→4)- α -L-Rha 3S-(1→4)- β -D-GlcA-(1→4)-L-Rha 3S	A _{3s} -A _{3s}		
Δ -(1→4)-[β -D-GlcA (1→2)]- α -L-Rha 3S-(1→4)- β -D-Xyl-(1→4)-L-Rha 3S	A _{2g,3s} -U _{3s}		
Δ -(1→4)-[β -D-GlcA (1→2)]- α -L-Rha 3S-(1→4)- β -D-Xyl 2S-(1→4)-L-Rha 3S	A _{2g,3s} -U _{2's,3s}		

Adaptado de: LAHAYE e ROBIC (2007); Ref.: 1= MCKINNELL e PERCIVAL (1962b); 2= LAHAYE e RAY (1996); 3= LAHAYE, BRUNEL e BONNIN (1997); 4= LAHAHYE, INIZAN e VIGOUROUX (1998); 5= LAHAYE (1998).

Dando continuidade aos estudos da estrutura química das ulvanas, Quemener, Lahaye e Bobin-Dubigeon (1997) desenvolveram uma metodologia para melhor quantificação das unidades monossacarídicas presentes nestes polímeros, desde que é sabido que a ligação glicosídica entre ácidos urônicos e açúcares neutros é mais estável que as demais ligações (BeMILLER, 1967). Os autores hidrolisaram ulvanas obtidas de diferentes espécies pela combinação de métodos de hidrólise ácida parcial e hidrólise enzimática, utilizando como ferramenta, para detecção e quantificação dos monossacarídeos formados, cromatografia de troca aniônica de alta eficiência e detecção amperométrica pulsada. Além dos monossacarídeos esperados (ramnose, ácido glucurônico e xilose), também foram identificadas diferentes proporções de ácido idurônico nas amostras analisadas, sendo o primeiro relato da presença de tal unidade em polissacarídeos de algas. A presença de unidades de ácido idurônico é comum em glicosaminoglicanas como a heparina e o dermatan sulfato (SUDO *et al.*, 2001). No trabalho acima citado foi também avaliada a composição monossacarídica das ulvanas obtidas de *U. lactuca*, sendo identificado que tais polímeros também contêm unidades de ácido idurônico (TABELA 3).

Logo após a descrição de tal metodologia, Lahaye, Brunel e Bonnin (1997) isolaram uma endo-liase, a partir de bactérias obtidas de extratos de *Ulva* spp., coletados em regiões de “maré verde” (eutroficação). Essa enzima foi capaz de hidrolisar ulvanas obtidas de diferentes algas verdes e por isso foi denominada de ulvano-liase. Os oligossacarídeos formados após hidrólise enzimática eram sempre constituídos por terminais redutores de ramnose 4-ligada 3-sulfato e por terminais não redutores do derivado 4-deoxi-L-*threo*-hex-4-ácido enopiranosidurônico (denominado “ Δ ”), o qual é produto da hidrólise sobre o ácido glucurônico 4-ligado. A utilização dessa enzima para a degradação de ulvanas obtidas de diferentes espécies de algas do gênero *Ulva* conduziu a obtenção de diferentes oligossacarídeos, porém todos contendo os terminais acima citados. A obtenção de um tetrassacarídeo contendo a seqüência Δ -(1 \rightarrow 4)- α -L-ramnopiranosose 3-sulfato-(1 \rightarrow 4)- α -L-ácido iduronopiranosose-(1 \rightarrow 4)-L-ramnopiranosose 3-sulfato, confirmou a presença de unidades de ácido idurônico em ulvanas (LAHAYE, BRUNEL e BONNIN, 1997). Além disso, tal unidade foi verificada em diferentes espécies de

algas pertencentes a ordem Ulvales, tanto pela metodologia de dosagem como pela degradação com a ulvano-liase (LAHAYE, INIZAN e VIGOUROUX, 1998; LAHAYE *et al.*, 1999) (TABELAS 2 e 3).

Dando continuidade aos estudos de caracterização estrutural das ulvanas obtidas de *Ulva rigida*, foram estudadas espécies coletadas em diferentes regiões (Espanha e França) para comparação de suas estruturas polissacarídicas. A partir de hidrólise enzimática com a ulvano-liase foram obtidos oligossacarídeos constituídos principalmente por unidades terminais não redutores do produto “Δ”, além de diferentes teores de ramnose 4-ligada 3-sulfato ligada a unidades de xilose 4-ligada (sulfatada ou não em C-2). A partir desses dados o autor concluiu que nessas ulvanas as unidades de xilose substituíam as unidades de ácidos urônicos na estrutura dissacarídica denominada ácido ulvanobiurônico 3-sulfato. Desta forma, foram introduzidas duas novas denominações às estruturas dissacarídicas encontradas nas ulvanas: ulvanobiose 3-sulfato (U_{3s}) e ulvanobiose 2',3-sulfato (U_{2's,3s}), referindo-se a: [→4)-β-D-Xyl-(1→4)-α-L-Rha 3S-(1→] e [→4)-β-D-Xyl 2S-(1→4)-α-L-Rha 3S-(1→], respectivamente (LAHAYE, 1998) (TABELA 2).

Estudos mais recentes realizados com *Enteromorpha compressa* têm confirmado que a mesma biossintetiza polissacarídeos semelhantes aos encontrados em algas do gênero *Ulva*, sendo os mesmos referidos como ulvanas por alguns autores (QUEMENER, LAHAYE e BOBIN-DUBIGEON, 1997; RAY, 2006; CHATTOPADHYAY *et al.*, 2007b). Tais polímeros são constituídos por unidades de ramnose, xilose e ácido glucurônico, todos unidos através dos C-4 na cadeia polissacarídica, sendo que os sítios de sulfatação são os C-3 e C-2 da deoxi e da pentose, diferindo assim dos dados obtidos por McKinnel e Percival (1962a) e confirmando sua semelhança com os polissacarídeos obtidos de *Ulva*. Adicionalmente, *Enteromorpha compressa* apresenta unidades de glucose 4-ligadas e como terminais não redutores, não sendo discutido a presença ou não de amido nas frações estudadas (RAY, 2006; CHATTOPADHYAY *et al.*, 2007b).

TABELA 3 – RENDIMENTO DOS AÇÚCARES LIBERADOS DURANTE O PROCESSO DE PRÉ-HIDRÓLISE ÁCIDA (TFA 45 min) SEGUIDA DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA COM *Helix pomatia*

Ulvana	Ram ^a	Xil	Glc	Gal	GlcA	IdoA
<i>Ulva rigida</i>	16,8 ± 0,5	5,8 ± 0,2	0,5 ± 0,0	0,2 ± 0,0	8,4 ± 0,1	0,7
<i>Ulva lactuca</i>	20,8 ± 1,1	3,5 ± 0,4	2,8 ± 0,3	0,7 ± 0,1	16,0 ± 0,2	3,7
<i>Ulva</i> “maré-verde”	29,3 ± 0,2	2,1 ± 0,2	4,9 ± 0,3	0,5 ± 0,0	16,3 ± 0,1	9,1
<i>Enteromorpha compressa</i>	28,4 ± 1,3	7,8 ± 0,2	3,0 ± 0,1	2,0 ± 0,1	14,7 ± 0,9	2,4 ± 0,3

Adaptado de: QUEMENER, LAHAYE e BOBIN-DUBIGEON (1997); ^a rendimento expresso em termos de porcentagem da ulvana seca.

Diferentemente da estrutura verificada nas ulvanas obtidas de *Ulva* e *Enteromorpha*, as análises dos polissacarídeos biossintetizados por espécies do gênero *Monostroma* (Ulvaes) demonstraram que tais algas são produtoras de homopolissacarídeos denominados ramnanas sulfatadas (MAEDA *et al.*, 1991; LEE *et al.*, 1998; HARADA e MAEDA, 1998; ZHANG *et al.*, 2008). Após purificação das ramnanas sulfatadas obtidas a partir de *M. nitidum* e *M. latissimum*, as mesmas foram caracterizadas como sendo constituídas por unidades de ramnose 3- e 2-ligadas. Nos polímeros de *M. nitidum* a substituição por grupos sulfato é observada principalmente em C-2 das unidades ligadas através do C-3, e nos de *M. latissimum*, a sulfatação ocorre em C-3 ou C-4 das unidades ligadas através do C-2. Ainda, foi descrito que a ramnana sulfatada obtida de *M. nitidum* apresenta pontos de ramificação em C-2 ou C-3 das unidades de ramnose 3- ou 2-ligadas, respectivamente (LEE *et al.*, 1998; HARADA e MAEDA, 1998; ZHANG *et al.*, 2008).

2.3 PRODUÇÃO DE OLIGOSSACARÍDEOS ATRAVÉS DE AUTO-HIDRÓLISE DE POLISSACARÍDEOS ÁCIDOS

Polissacarídeos ácidos obtidos de algas verdes apresentam grande complexidade estrutural (PAINTER, 1983; MAEDA *et al.*, 1991; LAHAYE e AXELOS 1993; LAHAYE, BRUNEL e BONNIN, 1997; HAYAKAWA *et al.*, 2000; RAY, 2006). A produção de oligossacarídeos e o estudo dos produtos obtidos são importantes para auxiliar a elucidação da estrutura do polímero nativo (LEE *et al.*, 1998; LAHAYE, BRUNEL e BONNIN, 1997; LAHAYE, INIZAN e VIGOUROUX, 1998).

Dentre as várias metodologias utilizadas para produção de oligossacarídeos, o processo de auto-hidrólise utiliza as características ácidas dos polissacarídeos para sua própria hidrólise, sendo tal procedimento eficaz em polímeros que contêm ácidos urônicos, grupos sulfatos ou fosfatos, desde que esses apresentam em solução aquosa pH entre 1,5 e 3,0 (STORTZ e CEREZO, 1987; NOSEDA e CEREZO, 1993). Assim, vários trabalhos apresentam o estudo da estrutura química de gomas e carragenanas através da produção de oligossacarídeos utilizando esta metodologia (HIRST e JONES, 1938; SMITH, 1939; STORTZ e CEREZO, 1987; CIANCIA *et al.*, 1991; NOSEDA e CEREZO, 1993)

Os primeiros trabalhos utilizando a metodologia da auto-hidrólise foram realizados com gomas e identificaram que ligações glicosídicas entre pentoses furanosídicas e deoxiaçúcares eram mais susceptíveis a auto-hidrólise (HIRST e JONES, 1938; SMITH, 1939). Posteriormente foi demonstrado que tal método é bastante dependente das condições experimentais utilizadas, desde que a auto-hidrólise de polissacarídeos ácidos que não continham ligações lábeis foi eficiente em produzir diferentes oligossacarídeos (CEREZO, STACEY e WEBBER, 1969).

Smidsröd, Haug e Larsen (1966) estudaram a influência do pH na hidrólise de diferentes carboidratos, demonstrando que o aumento do pH favorecia a hidrólise de compostos contendo ácidos urônicos. Uma das explicações apresentadas foi a de que em pH mais elevado os prótons presentes estariam próximos às cargas negativas presentes nos açúcares ácidos, o que facilitaria a hidrólise da ligação glicosídica vizinha a este ambiente químico. Esse mecanismo é aplicado ao

processo de auto-hidrólise, desde que os prótons presentes em solução são produzidos somente pela ionização dos grupos ácidos da molécula.

A auto-hidrólise é também utilizada para a produção de oligossacarídeos sulfatados a partir de carragenanas (STORTZ e CERREZO, 1987; CIANCIA *et al.*, 1991; NOSEDA e CERREZO, 1993). Com esses estudos, foi possível demonstrar que:

- ❖ Sulfatação em C-2 tende a desestabilizar os intermediários formados durante a hidrólise, tornando a ligação glicosídica mais resistente à auto-hidrólise;
- ❖ Sulfatação em C-4 sempre exerce efeito positivo no processo de auto-hidrólise, tornando as ligações glicosídicas próximas a ele mais susceptíveis a hidrólise;
- ❖ As condições experimentais devem ser rigorosamente planejadas para se obter a hidrólise das ligações glicosídicas específicas.

Considerando as observações apresentadas acima, chegou-se à conclusão de que o processo de auto-hidrólise é dependente das condições experimentais, é influenciada pelo tipo de ligação glicosídica e pela localização dos grupos ácidos dos polissacarídeos (FIGURA 1).

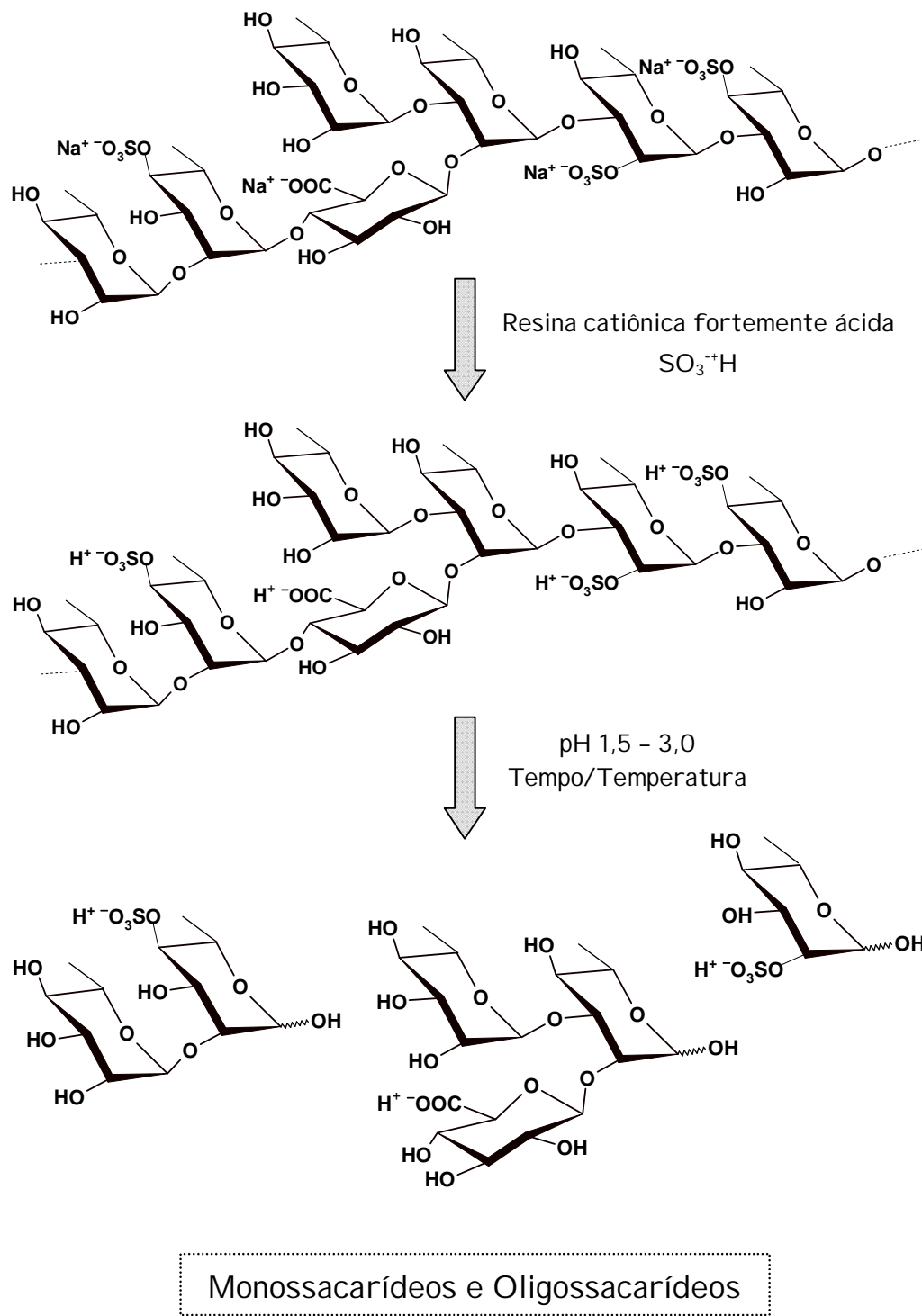


FIGURA 1 – ESQUEMA DA AUTO-HIDRÓLISE DE POLISSACARÍDEOS ÁCIDOS

2.4 ATIVIDADE ANTIVIRAL DOS POLISSACARÍDEOS SULFATADOS OBTIDOS DE ALGAS VERDES

Os polissacarídeos sulfatados obtidos a partir de algas marinhas têm sido amplamente estudados quanto às suas atividades biológicas, sejam elas atividades antivirais (LEE *et al.*, 1999; SANTOS *et al.*, 1999; DUARTE *et al.*, 2004; TALARICO *et al.*, 2004; FARIA-TISCHER *et al.*, 2006), anticoagulantes (MAEDA *et al.*, 1991; CHEVOLOT *et al.*, 1999; FARIAS, 2008), antihiperlipidêmicas (KUDA *et al.*, 1997; PENGZHAN *et al.*, 2003a,b) e antioxidantes (QI *et al.*, 2005; QI *et al.*, 2006). Estudos demonstraram que a diversidade e complexidade estrutural dos carboidratos, além dos teores e disposição dos grupamentos sulfato, estão relacionadas com as diversas funções exercidas por essas moléculas em sistemas biológicos (WITCZAK, 1997; DUARTE *et al.*, 2004).

Frações polissacarídicas, extraídas de diferentes espécies de algas verdes, foram estudadas quanto às suas atividades antivirais contra diferentes tipos de vírus envelopados, como o vírus herpes simplex (HSV), vírus da imunodeficiência humana (HIV) e citomegalovírus (HCMV) (SANTOS *et al.*, 1999; LEE *et al.*, 1999; LEE *et al.*, 2004; GHOSH *et al.*, 2004).

O vírus herpes simplex tipo 1 (HSV-1) é capaz de infectar uma ampla variedade de células humanas e pode causar várias doenças em indivíduos imunodeprimidos (SANTOS *et al.*, 1999). A infecção envolve a ligação do vírus à membrana da superfície celular, chamada de etapa de adsorção viral, a qual é realizada pela interação entre regiões carregadas positivamente presentes nas glicoproteínas virais, denominadas gB e gC, com o heparan sulfato da superfície da célula alvo (WUDUNN e SPEAR, 1989; LYCKE *et al.*, 1991; HEROLD *et al.*, 1995). Após a adsorção do vírus à célula, a glicoproteína do envelope viral (gD) se liga aos receptores HVEM (*herpes virus entry mediators*), o que permite a penetração do vírus na célula por fusão do envelope viral com a membrana plasmática celular, conduzindo a entrada do DNA viral.

A mínima seqüência do heparan sulfato para a ligação da gC do envelope viral é a estrutura $[\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-L}\text{-}(1\text{C}_4)\text{-IdoA } 2\text{S}\text{-}(1\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D}\text{-}(4\text{C}_1)\text{-GlcN } 6\text{'S}\text{-}(1\rightarrow]$, com no

mínimo 10-12 unidades repetitivas (FEYZI *et al.*, 1997). O efeito inibitório dos polissacarídeos sulfatados sobre o HSV deve-se, principalmente, a inibição da etapa de adsorção do vírus a célula hospedeira. Deste modo, estruturas análogas à descrita acima devem ser a responsável pelas atividades antivirais apresentadas por polissacarídeos sulfatados. Dados estruturais que justificam o exposto foram obtidos pelos estudos realizados com as agaranas sulfatadas biossintetizadas por *Acanthophora spicifera*, que demonstraram que o padrão médio de sulfatação desses polímeros é similar à seqüência mínima do heparan sulfato, ou seja, $[\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-(}^4\text{C}_1\text{)-Galp 2S-(1}\rightarrow\text{4)-}\alpha\text{-L-(}^1\text{C}_4\text{)-Galp 6'S-(1}\rightarrow\text{)]$. A presença desta díade, aliada a outros fatores estruturais (conformação, massa molecular, grau de sulfatação) poderia ser responsável pela formação do complexo agarana-gC e, conseqüentemente, pela atividade antiviral apresentada por essas moléculas (DUARTE *et al.* 2004).

Nesse aspecto, a maioria dos polissacarídeos sulfatados obtidos de clorófitas com atividade antiviral, não tiveram sua estrutura química fina definida. Assim, a determinação detalhada de tais estruturas polissacarídicas é de grande importância para o entendimento de seus mecanismos de ação.

2.5 DISTRIBUIÇÃO DAS ALGAS VERDES EM ESTUDO

2.5.1 *Gayralia oxysperma*

A alga *G. oxysperma* (FIGURA 2a) é uma alga verde monostromática, obtida de ambiente marinho, comestível (PELLIZZARI *et al.*, 2007). No Brasil, sua presença tem sido observada em vários pontos ao longo da costa, estando presente desde o litoral nordeste até o litoral sul do país (OLIVEIRA *et al.*, 1999; BRAGA, FUJII e CORDEIRO-MARINO, 1997).

Segundo Pellizzari, Oliveira e Yokoya (2008) espécies de *Gayralia* coletadas no Brasil têm sido erroneamente identificadas como *Monostroma oxyspermum* (Kützinger) Doty e *Ulvaria oxysperma* (Kützinger) Bliding.

A espécie *G. oxysperma* foi obtida de cultivo marinho, sendo o mesmo realizado na baía de Paranaguá, município de Paranaguá-PR. Os exemplares da alga foram cedidos pela Doutora Franciane M. Pellizzari (Departamento de Ciências Biológicas - Faculdade Estadual do Paranaguá), que realizou estudos para o cultivo dessa alga na região acima citada (PELLIZZARI *et al.*, 2007). Esta espécie é coletada pela população local e vendida como alimento para restaurantes japoneses, porém, tal atividade é esporádica desde que se restringe a disponibilidade do produto no meio ambiente. Sendo assim, o objetivo da autora foi estudar as características de desenvolvimento de *G. oxysperma* e assim desenvolver técnicas de cultivo que permitissem a produção dessa espécie durante todo o ano (PELLIZZARI *et al.*, 2007; PELLIZZARI, OLIVEIRA e YOKOYA, 2008).

Não existe relato na literatura de estudos referentes a estrutura química fina dos polissacarídeos biossintetizados pela alga verde *G. oxysperma*. Dessa maneira, é de grande interesse a descrição de tais estruturas desde que diferentes algas comestíveis da ordem Ulvales apresentam atividade biológica (IVANOVA *et al.*, 1994; LEE *et al.*, 1999; PENGZHAN *et al.*, 2003a,b). Além disso, as espécies de clorófitas são pouco estudadas quanto a seus constituintes polissacarídeos (LAHAYE e AXELOS, 1993).

2.5.2 *Ulva lactuca* e *Ulva fasciata*

Amplamente encontradas na costa brasileira, e de forma geral no mundo, a abundância dessas espécies cosmopolitas está relacionada a quantidade de nutrientes na água marinha, sendo comuns grandes florações destas algas sobre costões rochosos em regiões de eutroficação (UNIVERSITY OF HAWAII, 2004) (FIGURA 2b,c).

U. lactuca foi estudada quanto a sua composição polissacarídica nas décadas de 50 e 60 (BRADING, GEORG-PLANT e HARDY, 1954; MCKINNELL e PERCIVAL, 1962b; PERCIVAL e WOLD, 1963) e as diferenças apresentadas entre tais estudos e os estudos atuais realizados com outras espécies do gênero *Ulva* contribuíram

para uma nova investigação da estrutura química fina dos polissacarídeos obtidos dessa espécie.

A fração polissacarídica (ulvana) obtida de *U. fasciata* foi testado *in vivo* quanto a sua capacidade de proteger plantas de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) contra antracnose (doença causada pelo fungo *Colletotrichum lindemuthianum*). Na concentração de 10 mg/mL e aplicada quatro dias antes da inoculação do fungo, a ulvana apresentou possível indução de resistência na planta (PAULERT, 2005). A caracterização dessa fração polissacarídica foi realizada para se comparar a estrutura da ulvana produzida por *U. fasciata* com a produzida por *U. lactuca*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 POSICIONAMENTO SISTEMÁTICO DAS ESPÉCIES ESTUDADAS

Super-Reino: Eucariota

Reino: Planta

Sub-reino: Viridaeplantae

Filo: Chlorophyta

Classe: Ulvophyceae

Ordem: Ulvales

Família: Gayraliaceae

Gênero: *Gayralia*

Espécie:

***Gayralia oxysperma* (Kützing) K.L. Vinogradova ex Scagel et al.**

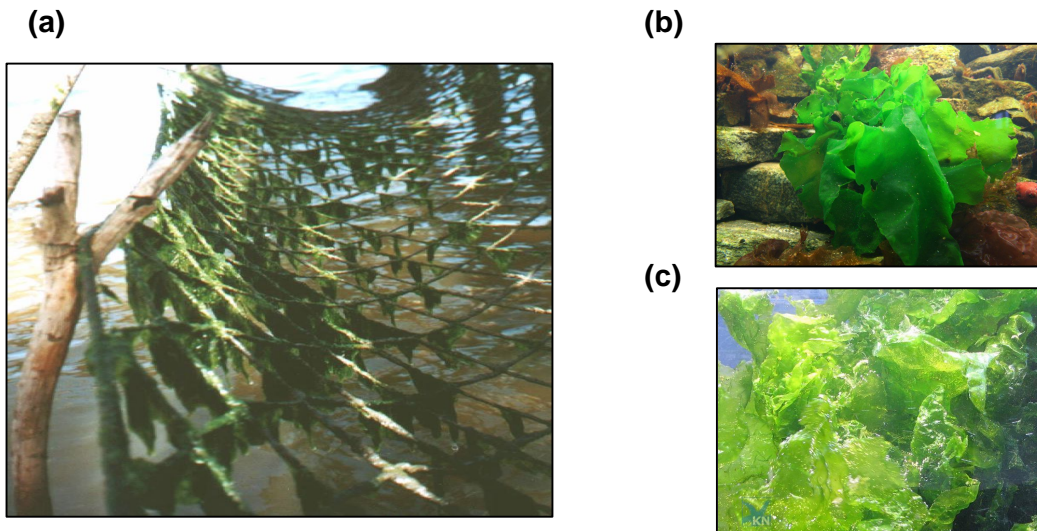
Família: Ulvaceae

Gênero: *Ulva*

Espécies:

***Ulva lactuca* Linnaeus**

***Ulva fasciata* Delile**



FONTE: (a) redes de cultivo em mar (foto cedida pela Dra. Franciane M. Pellizzari); (b) <http://www.jonolavsakvarium.com/blog/200708/ulva.jpg> (acessado em 11 Fev. 2008); (c) <http://www.meerwasser-aquaristik.de/onlineshop/catalog/images/Meeressalat.jpg> (acessado em 11 Fev. 2008).

FIGURA 2 – ASPECTO GERAL DAS ALGAS VERDES *Gayralia oxysperma* (a), *Ulva lactuca* (b) e *Ulva fasciata* (c)

3.2 COLETA E PROCESSAMENTO

Os exemplares da alga verde *Gayralia oxysperma* (Kützinger) K.L. Vinogradova ex Scagel et al. foram cultivados na baía de Paranaguá, Paranaguá-PR e coletados no mês de Junho de 2004. *G. oxysperma* foi gentilmente cedida para estudos pela Dra. Franciane M. Pellizzari do Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade Estadual de Filosofia, Ciências e Letras de Paranaguá, sendo identificada pelo Dr. Eurico Cabral de Oliveira do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo.

Os espécimes de *Ulva lactuca* Linnaeus foram coletados no litoral norte da Ilha de Santa Catarina, município de Florianópolis, em Setembro de 2004 e identificados pela Dra. Diclá Pupo Santos do Instituto de Botânica da Universidade de São Paulo.

As exsiccatas de ambas as espécies foram depositadas no herbário do Departamento de Botânica da Universidade Federal do Paraná sob os números UPCB 58059 e UPCB 58058, respectivamente.

As algas verdes *G. oxysperma* e *U. lactuca* foram lavadas com água doce, secas ao sol ou em estufa a 25–30 °C, moídas em moinho de faca (Wiley Mill), resultando em 107,3 g e 116,0 g de algas secas e moídas, respectivamente, as quais foram submetidas aos processos de extração.

Os espécimes de *U. fasciata* foram coletados na praia da Armação, no município de Florianópolis-SC, em junho de 2005 e foram identificados pela Dra. Zenilda Laurita Bouzon do Departamento de Biologia Celular da Universidade Federal de Santa Catarina. Os polissacarídeos (já extraídos) foram fornecidos para estudo de sua estrutura química a partir de uma parceria entre o grupo de Carboidratos de Algas Marinhas, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFPR, e o Dr. Marciel J. Stadnik do Departamento de Biotecnologia da UFSC. O processo de extração realizado é descrito no item 3.3.

3.3 EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS

As algas *G. oxysperma* e *U. lactuca*, secas e moídas (107,3 e 116,0 g, respectivamente), foram submetidas a extrações aquosas (5% m/v) sob agitação mecânica, em temperatura de 25 °C por 4 horas, sendo este processo realizado por duas vezes. Após cada etapa, os extratos aquosos foram centrifugados a 7.700 x g por 20 minutos e concentrados em evaporador rotatório sob pressão reduzida. Aos sobrenadantes adicionou-se etanol (3:1 v/v) para precipitação dos polissacarídeos. Os precipitados foram separados por centrifugação, reunidos e ressolubilizados em água, dialisados contra água destilada e liofilizados. As frações brutas obtidas foram denominadas Go1 e Go2 (*G. oxysperma*) e Uv1 e Uv2 (*U. lactuca*), correspondendo a primeira e segunda extrações aquosas a 25 °C, respectivamente.

Os resíduos das algas foram seqüencialmente submetidos a extrações aquosas a 80 °C (5% m/v), em banho-maria, sob agitação mecânica, durante 4 horas (4 vezes). Após cada etapa, os extratos aquosos foram centrifugados a 7.700

x g por 20 minutos, submetidos à redução de volume (em evaporador rotatório), precipitados com etanol (3:1 v/v) e centrifugados. Os polissacarídeos precipitados foram ressolubilizados em água, dialisados contra água destilada e liofilizados, originando as frações brutas Go3, Go4, Go5 e Go6 (*G. oxysperma*) e Uv3, Uv4, Uv5 e Uv6 (*U. lactuca*), correspondendo à primeira, segunda, terceira e quarta extrações a 80 °C, respectivamente. Os resíduos das algas foram descartados.

Durante o processo de precipitação dos polissacarídeos por desidratação em etanol, o sobrenadante etanólico das frações Go3, Go4, Uv1, Uv3 e Uv4 apresentaram turbidez persistente após centrifugação. A estes sobrenadantes foi adicionado acetato de potássio (0,5% m/v) para a precipitação do material que se manteve suspenso, sendo os mesmos agrupados as respectivas frações de origem.

A obtenção dos polissacarídeos sintetizados por *U. fasciata* foi realizada pela Mestra Roberta Paulert (Departamento de Biotecnologia da UFSC). Para tanto, 100 g de alga seca e moída foram autoclavados (10% m/v) durante 2 horas a 110 °C (CLUZET *et al.*, 2004). O material foi filtrado, concentrado por evaporação em estufa a 50 °C, precipitado com etanol (3:1 v/v) e centrifugado. O precipitado foi ressolubilizado, dialisado e liofilizado, dando origem a fração polissacarídica denominada Uf (PAULERT, 2005).

3.4 ULTRAFILTRAÇÃO EM MEMBRANA

Para o fracionamento dos polissacarídeos sulfatados presentes nas frações brutas, obtidas como descrito no item 3.3, realizou-se ultrafiltração em membrana de celulose regenerada ou polietersulfona com limite de exclusão de 300 kDa e 500 kDa (Millipore) para Go3 (1,2 g) e Uv2 (2,0 g), respectivamente. As ultrafiltrações foram realizadas por um sistema de filtração modelo 16249, SARTORIUS, acoplado a um cilindro de ar comprimido.

Neste método os polissacarídeos foram solubilizados em água, em uma concentração de 0,1 g%, e submetidos a filtração em cilindro, sob pressão, sendo obtido um material retido na membrana (denominado “r”) e um material eluído (denominado “e”).

3.5 MÉTODOS ANALÍTICOS GERAIS

3.5.1 Carboidratos Totais

As dosagens de carboidratos totais foram realizadas pelo método do fenol-ácido sulfúrico, descrito por Dubois *et al.*, 1956. Foi utilizado como padrão uma solução de ramnose (1 mg/mL), sendo a leitura realizada em 480 nm.

3.5.2 Açúcar Redutor

As dosagens de açúcares redutores foram realizadas pelo método de Park e Johnson (1949), utilizando-se como padrão solução de ramnose na concentração de 1 mg/mL. O limite de quantificação do método é de 1–9 µg de açúcar redutor e a leitura realizada a 690 nm.

3.5.3 Proteínas Totais

As dosagens de proteínas foram realizadas pelo método de Lowry *et al.* (1951), utilizando-se o reativo de Folin-Ciocalteu. O limite de quantificação do método é de 5–100 µg de proteína, sendo utilizado como padrão solução de BSA na concentração de 40 mg% e a leitura feita em 660 nm.

3.5.4 Sulfato

Os teores de grupos sulfato presentes nos polissacarídeos foram determinados pelo método de Dodgson e Price (1962), tendo como reagentes a mistura gelatina-bário. A análise inicia-se com a hidrólise total da molécula (HCl M, 5 h, 105 °C), havendo liberação dos grupamentos sulfato em solução. Em contato com o íon bário, adicionado como BaCl₂, forma-se um composto insolúvel, BaSO₄, que se mantém em suspensão devido a presença da gelatina (Oxoid). O método é turbidimétrico, sendo a leitura realizada em a 360 nm, apresentando limite de quantificação de 20–200 µg de sulfato. O padrão utilizado é uma solução de sulfato de sódio a 1 mg/mL.

3.5.5 Ácidos Urônicos

As dosagens de ácidos urônicos foram realizadas pelo método do *m*-hidroxibifenila (FILISETTI-COZZI e CARPITA, 1991). Este método apresenta limite de quantificação de 1–38 µg, sendo que a coloração é aparente após 5 a 10 minutos da adição dos reagentes e é estável por 1 hora. A leitura é realizada em 525 nm.

3.5.6 Polarimetria

A determinação da rotação óptica específica ($[\alpha]_D^{25^\circ}$) das amostras foi realizada na concentração de 0,2 g% em solução aquosa a temperatura de 25 °C, utilizando cubetas de 10 cm de comprimento em polarímetro RUDOLPH RESEARCH, modelo Autopol III, no comprimento de onda de 589,3 nm.

3.5.7 Determinação da Configuração Enantiomérica da Ramnose

A determinação da configuração enantiomérica da ramnose foi realizada pelo método descrito por Cases, Cerezo e Stortz (1995), utilizando as frações obtidas de *G. oxysperma*. Nesta metodologia os polissacarídeos sofrem uma aminação redutiva (agente redutor cianoborohidreto de sódio), na presença de (S)- α -metilbenzilamina, e acetilação, formando assim seus derivados amino alditóis, os quais são posteriormente analisados por CLG-EM.

3.6 HIDRÓLISE ÁCIDA TOTAL

Para determinação da composição monossacarídica, os polissacarídeos obtidos das três algas em estudo, foram submetidos à hidrólise ácida total (~1 mg) com TFA M por 4 horas a 100 °C. Posteriormente, os monossacarídeos obtidos foram reduzidos com NaBH₄, ou NaBD₄, por 12 horas. Após redução, os mesmos foram acetilados com anidrido acético:piridina (1:1 v/v) por 12 horas a temperatura ambiente e analisados, na forma de acetatos de alditóis, por CLG e CLG-EM.

Os polissacarídeos permetilados foram submetidos à hidrólise ácida com ácido fórmico 45% a 100 °C por 16 horas, sendo os hidrolisados reduzidos com NaBD₄ por 12 horas e acetilados com anidrido acético:piridina (1:1 v/v) por 12 horas a temperatura ambiente. Os acetatos de alditóis parcialmente metilados foram analisados por CLG-EM.

3.7 MODIFICAÇÕES QUÍMICAS DOS POLISSACARÍDEOS

3.7.1 Carboxi-Redução

O processo de carboxi-redução foi realizado com as frações Go1, Go3, Go3r, Go4, Go6 e Uv2r, utilizando os métodos de Taylor e Conrad (1972) e Anderson e Stone (1985). As amostras foram solubilizadas em tampão MES 0,2 M (pH 4,75). Em seguida foi adicionada carbodiimida [1-ciclohexil-3-(2-morfolinoetil) carbodiimida] (CMC) na proporção de 1,0 mM de carbodiimida:50 µEq de carboxila. Após agitação por 1 hora e ajuste do pH para 7,0 pela adição de tampão TRIS 2,0 M, foi adicionado NaBH₄ (frações Go1, Go3, Go4, Go6 e Uv2r) ou NaBD₄ (frações Go3r e Uv2r) até a obtenção de uma solução 2,0 M. Após 12 horas a 30 °C e neutralização com HCl, os polímeros carboxi-reduzidos foram dialisados contra água destilada e liofilizados.

As frações submetidas à carboxi-redução e as massas utilizadas para tal método foram: Go1 = 300 mg; Go3 = 200 mg; Go3r = 530 mg; Go4 = 300 mg; Go6 = 290 mg; Uv2r = 200 mg (na presença de NaBH₄) e 15 mg (na presença de NaBD₄).

As frações obtidas após carboxi-redução foram identificadas pela adição da letra "R" (carboxi-reduzido) aos nomes originais das mesmas.

3.7.2 Dessulfatação por Tratamento Solvolítico

3.7.2.1 Preparo do sal de piridínio

O processo de solvólise foi conduzido com os polissacarídeos na forma de sal de piridínio. Para formação deste sal, as frações foram solubilizadas em água e então se adicionou resina catiônica DOWEX 50x8 na forma H⁺, sob agitação magnética à temperatura ambiente por 30 minutos. O pH dos sobrenadantes ficou entre 1–2. Os filtrados (obtidos por filtração à pressão reduzida) foram neutralizados (em capela) com piridina, até pH 7,0 e liofilizados (NAGASAWA, INOUE e TOKUYASU, 1979).

As massas utilizadas para a realização do processo solvolítico foram de: Go1-R, Go3-R, Go4-R e Go6-R = 100 mg cada; Go3r-R = 150 mg; Go3r-S = 50 mg; Go3r-RS = 40 mg; Uv2r-R = 100 mg; Uf = 60 mg.

3.7.2.2 Solvólise

As frações, na forma de sal de piridínio, foram solubilizadas em uma mistura de dimetilsulfóxido, metanol e piridina, cuja proporção foi de 89:10:1 (v/v), respectivamente, respeitando-se a relação de 10 mg de polissacarídeo para 3 mL da mistura (NAGASAWA, INOUE e TOKUYASU, 1979).

As soluções resultantes foram mantidas a 100 °C durante 4 horas. Após o resfriamento, as frações solvolisadas foram dialisadas contra água destilada e liofilizadas. Os polissacarídeos dessulfatados foram identificados pela adição da letra “D” (dessulfatado) ao nome da fração original, sendo os mesmos analisados quanto a sua composição monossacarídica (3.6) e teor de sulfato (3.5.4).

3.7.3 Degradação Controlada de Smith

Para a realização da degradação controlada de Smith, as frações polissacarídicas Go3r e Go3r-R (130 g cada) foram solubilizadas em água destilada,

adicionando-se posteriormente uma solução de *m*-NaIO₄ 0,1 M, obtendo-se uma solução final de 20 mL com concentração de 0,05 M, a qual foi mantida em ambiente escuro a temperatura ambiente durante 72 horas. Após este período a solução foi tratada com etilenoglicol visando consumir o excesso de *m*-NaIO₄, reduzida com NaBH₄ durante 20 horas, neutralizada com ácido acético, dialisada e liofilizada (GOLDSTEIN *et al.*, 1965). Os polissacarídeos obtidos foram submetidos à hidrólise branda com TFA M durante 20 horas a temperatura ambiente (FURNEAUX e STEVENSON, 1990). As frações quimicamente modificadas foram identificadas como Go3r-S e Go3r-RS, respectivamente.

3.7.4 Auto-Hidrólise – Obtenção de Oligossacarídeos

Para a produção de oligossacarídeos a fração Go4 foi submetida ao processo de auto-hidrólise.

Os polissacarídeos em solução (1 g%) foram tratados com resina catiônica fortemente ácida (Dowex 50x8, H⁺), obtendo-se o polissacarídeo na sua forma ácida. Para se avaliar as condições do processo de auto-hidrólise que proporcionaria maior rendimento em oligossacarídeos foram realizadas hidrólise em diferentes tempos (5–75 horas), com temperatura constante de 80 °C e pH de 1,9. Após tal processo o material hidrolisado foi neutralizado e liofilizado. A avaliação da formação de oligossacarídeos foi realizada dosando-se açúcares redutores e por análises de RMN de ¹³C.

Após ser selecionado o melhor tempo de auto-hidrólise foi realizado o processo preparativo, utilizando-se para tal 5 g da fração Go4 e temperatura de hidrólise de 80 °C por 25 horas, seguindo a metodologia descrita acima.

A amostra hidrolisada foi neutralizada e centrifugada (7700 x g por 15 min), para separação de material insolúvel presente após auto-hidrólise, obtendo-se a fração precipitada Go4i. O material solúvel após centrifugação foi tratado com etanol (3:1 v/v) e centrifugado (7700 x g por 15 min), originando as frações Go4s e Go4p, sobrenadante e precipitado etanólicos, respectivamente. A fração Go4s foi purificada por cromatografia de exclusão, como descrito no item 3.9.2.2.

3.8 ANÁLISE DE METILAÇÃO

3.8.1 Preparo do Sal de Trietilamônio

As frações brutas carboxi-reduzidas (Go1-R, Go3-R, Go4-R e Go6R) e os produtos quimicamente modificados da fração Go3r (Go3r-R, Go3r-RD, Go3r-RS e Go3r-RSD), foram inicialmente reduzidas com NaBH_4 e dialisadas contra solução de trietilamina 5%, visando obter polissacarídeos solúveis no solvente aprótico dimetil sulfóxido (DMSO), o qual é utilizado durante o processo de metilação. Os polissacarídeos foram recuperados na forma de sal de trietilamônio e liofilizados (STEVENSON e FURNEAUX, 1991).

3.8.2 Metilação e Derivatização

O processo de metilação dos polissacarídeos, na forma de sal de trietilamônio, foi conduzido de acordo com o método de CIUCANU e KEREK, 1984. Após solubilização dos polissacarídeos em DMSO (1 mL para cada 15 mg de polissacarídeo), adicionou-se hidróxido de sódio (NaOH) pulverizado (30 mg) e a mistura permaneceu sob agitação mecânica vigorosa por 30 minutos. Após esse tempo, adicionou-se ao meio iodometano (ICH_3) (0,1 mL para cada 15 mg de polissacarídeo) sob agitação mecânica vigorosa por mais 30 minutos. Este processo (adição de NaOH e iodometano) foi repetido por mais duas vezes, completando-se assim a primeira etapa de metilação. As frações sofreram 2 ou 3 etapas de metilação, sendo que após cada etapa as frações foram dialisadas contra água destilada, liofilizadas, hidrolisadas com ácido fórmico 45%, a 100 °C por 16 horas, sendo os hidrolisados reduzidos com borodeutério de sódio (NaBD_4) por 12 horas e acetilados com anidrido acético:piridina (1:1 v/v) por 12 horas a temperatura ambiente (item 3.6). Os acetatos de alditóis parcialmente metilados foram analisados por CLG-EM.

3.8.3 Trideuteriometilação

A fração Go3r-R, previamente permetilada (item 3.8), foi submetida sequencialmente ao processo de dessulfatação solvolítica e remetilada utilizando iodometano trideuterado (ICD_3).

3.9 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

3.9.1 Cromatografia de Troca Iônica (DEAE-Sephacel)

A fração bruta Go3 (2,9 g) e a fração oligossacarídica Go4A (0,9 g) foram submetidas a fracionamento por cromatografia de troca aniônica em coluna contendo DEAE-Sephacel, utilizando-se concentrações crescentes de NaCl (0–2 M) e $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ (0–0,5 M), respectivamente. As sub-frações obtidas a partir de Go4A foram concentradas, ressolubilizadas em água destilada e novamente concentradas, para a retirada do $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ presente nas mesmas. Este procedimento foi repetido por três vezes.

As eluições foram monitoradas pelo teste colorimétrico do fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS *et al.*, 1956).

3.9.2 Cromatografia de Exclusão

As cromatografias de exclusão foram utilizadas para purificação e dessalificação das amostras (polissacarídeos e oligossacarídeos), sendo realizadas em colunas de vidro, utilizando diferentes tipos de géis como fase estacionária.

3.9.2.1 Especificações das colunas utilizadas para purificação dos polissacarídeos

- * Sepharose CL 6B (limite de exclusão: 1×10^4 – 1×10^6): coluna de 16 cm x 0,9 cm d.i.; volume morto (V_o) de 9 mL, volume total (V_t) igual a 30 mL e fluxo de 0,8 mL/min. Utilizada para purificação da fração Go3e (2 mg) em grau analítico. Fase móvel: água destilada;
- * Sepharose CL 4B (limite de exclusão: 3×10^4 – 5×10^6):
 - coluna de 110 cm x 3 cm d.i.; volume morto de 160 mL, volume total igual a 530 mL e fluxo de 0,6 mL/min. Utilizada para o fracionamento de Go3e (250 mg) em grau preparativo. Fase móvel: água destilada;
 - coluna de 16 cm x 0,9 cm d.i.; volume morto (V_o) de 9 mL, volume total (V_t) igual a 30 mL e fluxo de 0,8 mL/min. Utilizada para avaliação do perfil cromatográfico da fração Go3e2 (2 mg). Fase móvel: água destilada.

3.9.2.2 Especificações das colunas utilizadas para purificação e dessalificação dos oligossacarídeos

- * Bio-Gel P-2 (limite de exclusão: 100–1800):
 - Coluna 1 - 180 cm x 5 cm d.i.; volume morto de 250 mL, volume total de 800 mL e fluxo de 1,4 mL/min (utilizando bomba peristáltica). Utilizada para dessalificação e pré-purificação dos hidrolisados Go4s (3,8 g). Fase móvel: água destilada;
 - Coluna 2 - 68 cm x 1,5 cm d.i.; volume morto de 45 mL, volume total de 150 mL e fluxo de 0,5 mL/min. Utilizada para purificação da fração oligo-A2 (50 mg). Fase móvel: água destilada.

As eluições foram monitoradas pelo teste do fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS *et al.*, 1956).

3.9.3 Cromatografia Líquido-Gasosa (CLG)

As análises por cromatografia líquido-gasosa foram realizadas em Cromatógrafo TRACE ULTRA (Thermo), com detector de ionização de chama (FID) (300 °C) e injetor (250 °C), utilizando hélio como gás de arraste e nitrogênio como gás de *make up*, em coluna capilar de sílica fundida (30 m X 0,25 mm d.i., 0,25 mm) DB-225, marca J.W. As análises cromatográficas para acetatos de alditóis foram realizadas a 220 °C.

3.9.4 Cromatografia Líquido-Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massa (CLG-EM)

As análises cromatográficas em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas foram realizadas em um cromatógrafo da marca VARIAN 3800, equipado com coluna capilar de sílica fundida (30 m x 0,25 mm d.i., 0,25 µm) DB-225MS (Durabond), e um espectrômetro de massa do tipo *Ion Trap*, marca Varian Saturn 2000R. A temperatura do injetor foi de 250 °C e a temperatura inicial do forno foi de 50°C, seguido de aumento gradual de 40 °C por minuto, até 220 °C para alditol acetato e 210 °C para alditol acetato parcialmente metilado, mantendo-se constante a partir de 25 e 30 minutos, respectivamente. Utilizou-se como gás de arraste o gás hélio com fluxo de 1,0 mL/min. Os espectros de massas foram obtidos por impacto de elétrons de 70 eV, com *m/z* (relação massa/carga) de 80 a 220 e 50 a 350 (para as frações carboxi-reduzidas com NaBD₄). Os cromatogramas foram analisados e integrados em software Saturn Workstation 5.1. Esse método foi utilizado para quantificação relativa de acetatos de alditóis e acetatos de alditóis permetilados, sendo identificados por meio de seus tempos de retenção e perfis característicos de fragmentação por impacto de elétrons (JANSSON *et al.*, 1976) e comparados com padrões produzidos por SASSAKI *et al.* (2005).

3.9.5 Cromatografia de Exclusão Estérica de Alta Pressão (HPSEC) Acoplada a Detector de Índice de Refração (IR) Diferencial e Espalhamento de Luz em Multiângulos (MALLS)

Para análise de homogeneidade e de determinação da massa molecular ponderal média (M_w), as amostras foram solubilizadas em nitrato de sódio (NaNO_3 0,1M) contendo azida de sódio (200 ppm) dissolvidas em água milliq, para se obter uma solução polissacarídica com concentração final de 1 mg/mL. As amostras foram filtradas em membranas MILLIPORE (acetato de celulose) de 0,22 μm .

Os ensaios de homogeneidade e determinação da massa molecular foram realizados em cromatógrafo de exclusão estérica de alta pressão (HPSEC) WATERS, equipado com um detector de índice de refração (IR) diferencial WATERS modelo 2410 e com detector de espalhamento de luz em multiângulos (MALLS) WAYTT TECHNOLOGY, modelo DAWN DSP, com 18 detectores dispostos ao redor da fotocélula em diferentes ângulos. Utilizaram-se 4 colunas de gel permeação WATERS, com limites de exclusão de 7×10^6 , 4×10^5 , 8×10^4 e 5×10^3 (Colunas Ultrahydrogeltm 2000, 500, 250 e 120, respectivamente) em série. O eluente utilizado foi uma solução de nitrato de sódio (NaNO_3 0,1M) contendo azida de sódio (200 ppm), pressão de 920 psi a 20°C.

A taxa de variação do índice de refração com relação à concentração (dn/dc) foi determinada para amostras homogêneas, utilizando soluções de 0,2; 0,4; 0,6 e 0,8 mg das amostras em 1 mL de nitrato de sódio (NaNO_3 0,1M) e azida de sódio (200 ppm). As massas molares foram determinadas a partir do perfil de eluição e valores de dn/dc . Os cálculos foram efetuados pelo software ASTRA.

3.9.6 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

As análises por cromatografia em camada delgada (CCD) foram utilizadas para acompanhamento dos processos de purificação das frações oligossacarídicas, sendo realizadas em Sílica Gel em folhas de alumínio 60 F254 utilizando como fase

móvel uma mistura de acetato de etila:metanol:água (4:2:1 v/v). Após cromatografia, os açúcares foram visualizados através de borrifamento com solução de orcinol 0,5% em etanol/H₂SO₄ concentrado (20/1) e aquecimento (120 °C) até o aparecimento de coloração.

3.10 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)

As análises de ressonância magnética nuclear mono e bidimensionais foram realizadas em espectrômetro da marca BRUKER, modelo DRX 400, série Avance, em tubos de 5 mm de diâmetro, sendo as amostras dissolvidas em água deuterada 99% (D₂O). Os deslocamentos químicos, expressos em δ (ppm), foram determinados utilizando acetona como padrão interno, tanto para as análises de ¹³C (δ 31,45) como para ¹H (δ 2,225).

3.10.1 Técnicas de RMN Monodimensionais

3.10.1.1 Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13 (RMN de ¹³C)

Os espectros de RMN de ¹³C foram obtidos na frequência base de 100,16 MHz, com intervalo de aquisição de sinal de 0,6 segundos, fazendo-se, em média, 60.000 aquisições, utilizando-se um intervalo de 0,1 segundo entre os pulsos. As amostras foram dissolvidas em D₂O, em uma concentração de ~60 mg/mL.

3.10.1.2 Ressonância Magnética Nuclear de Próton (RMN – ¹H)

Os espectros de RMN – ¹H foram obtidos na frequência base de 400,13 MHz, sendo necessário promover a troca dos hidrogênios das hidroxilas por deutério e a remoção das moléculas de água presentes, através da dissolução das frações em D₂O, congelamento e liofilização (este processo foi repetido por, no mínimo, 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. As amostras foram dissolvidas em D₂O, em uma concentração de ~20 mg/mL.

3.10.2 Técnicas de RMN Bidimensionais

3.10.2.1 COSY (*Correlation Spectroscopy*)

Esta é uma técnica homonuclear utilizada para correlacionar os deslocamentos químicos dos núcleos de ¹H que estão acoplados um com o outro. Assim, nos carboidratos o H-1 de um monossacarídeo apresenta acoplamento com o H-2 da mesma unidade, sendo possível observar esta interação na forma de um pico cruzado (*cross peak*) entre os mesmos sinais, quantificar esta interação através da determinação da constante de acoplamento (J) e ainda determinar o deslocamento químico do H-2 a partir do H-1. Desta forma a partir do sinal de H-2 pode ser determinado o H-3 e assim sucessivamente ao longo do anel. Como cada unidade monossacarídica apresenta um padrão de constantes de acoplamento característico, com estes resultados é possível determinar o tipo de açúcar presente na estrutura.

3.10.2.2 TOCSY (*Total Correlation Spectroscopy*)

Nesta técnica, também homonuclear, os picos cruzados (*cross peaks*) são gerados não só pelos prótons vicinais e sim por todos os núcleos do sistema de spin acoplado, desta forma têm-se os picos cruzados correspondentes a interação do H-1 com H-2, H-1/H-3 e assim sucessivamente, conforme seja possível visualizar essa interação.

3.10.2.3 HMQC (*Heteronuclear Multiple Quantum Correlation Spectroscopy*)

Esta técnica heteronuclear, permite determinar quais átomos de hidrogênio (¹H) estão ligados aos respectivos átomos de carbono (¹³C) a partir de sinais de ¹³C conhecidos ou de ¹H já determinados por COSY e TOCSY.

3.11 ELECTROSPRAY-IONIZATION MASS SPECTROMETRY (ESI-MS)

O equipamento usado para as análises de ESI-MS foi um Micromass Quattro LC-MS/MS com triplo quadrupolo. As aquisições e o processamento dos espectros foram feitos utilizando o software Maslynx 3.5. Os espectros de massa foram adquiridos no modo negativo. As amostras foram previamente solubilizadas (0,1 mg/mL) em uma mistura de acetonitrila:água (70:30 v/v), ultrafiltradas em membrana com porosidade de 0,22 µm e injetadas por uma bomba (KD Scientific Inc.) a um fluxo de 60 µL/min. As condições de ESI foram: gás nitrogênio foi usado como nebulizador (87 L/h) e gás de dessolvatação (429 L/h). A fonte foi operada a 80 °C com temperatura de dessolvatação de 130 °C.

3.12 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIHERPÉTICA DAS HETERORAMNANAS OBTIDAS DE *G. oxysperma*

A avaliação da atividade antiherpética das heteroramnanas de *G. oxysperma* foi realizada no laboratório de Virologia do Departamento de Química Biológica da Universidade de Buenos Aires (Argentina), pelo grupo da Dra. Elsa B. Damonte. O grupo de Química de Carboidratos de Algas Marinhas da UFPR (Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular) mantém colaboração científica com o grupo argentino, onde polissacarídeos sulfatados cujas estruturas químicas estão caracterizadas são avaliados quanto a atividade antiviral.

Para os ensaios antivirais foram utilizadas células Vero (linha de células de rim de macaco verde africano *Cercopithecus aethiops*), crescidas em meio essencial mínimo de Eagle (MEM) suplementado com 5% de soro fetal bovino. Para o meio de manutenção (MM) a concentração foi reduzida para 1,5%.

Atividade antiherpética dos polissacarídeos sulfatados obtidos de *G. oxysperma* foi avaliada frente ao vírus herpes simplex tipo 1 (HSV-1) cepa F e HSV-2 cepa MS. Os estoques virais foram propagados e titulados pela formação de placas virais em células Vero.

As frações polissacarídicas submetidas às análises antivirais foram: Go3, Go4 (frações brutas obtidas por extração aquosa a 80 °C) e Go3r (obtida após purificação de Go3 por ultrafiltração em membrana).

3.12.1 Ensaio de Citotoxicidade

A viabilidade das células Vero frente as heteroramnanas de *G. oxysperma* foi medida pelo método do MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio]. As culturas, em placas de 96 poços, foram expostas a diferentes concentrações dos polissacarídeos (em triplicata para cada concentração) e incubadas a 37 °C por 1 hora. Após este período 10 µL de MM contendo MTT (concentração final 0,5 mg/mL) foi adicionado em cada poço. Após 2 horas de incubação a 37 °C, o sobrenadante foi removido e 200 µL de etanol foi adicionado a cada poço para solubilizar os cristais de formazan. Após agitação vigorosa, a absorbância foi medida em leitor de microplacas a 595 nm. A concentração citotóxica 50% (CC₅₀) foi calculada como a concentração do polissacarídeo necessária para reduzir a viabilidade celular em 50% quando comparada ao controle.

3.12.2 Determinação da Atividade Antiviral *in vitro*

A atividade antiviral das frações polissacarídicas foi avaliada *in vitro* pelo método de redução do número de placas virais. Monocamadas confluentes de células Vero crescidas sobre multiplacas de 24 poços, foram infectadas com aproximadamente 50 PFU (unidades formadoras de placas) de vírus por poço, na ausência ou presença de diferentes concentrações das frações polissacarídicas. Após 1 hora de incubação (37 °C), os inóculos residuais foram removidos e adicionou-se o MM contendo 0,7% de metilcelulose e a correspondente dose de cada polissacarídeo. As placas foram incubadas a 37 °C por 48 horas em estufa com ambiente de CO₂. Após este período o meio foi removido e o número de placas

virais formadas foi contado como descrito abaixo. A concentração inibitória 50% (IC₅₀) foi calculada como a concentração do polissacarídeo necessária para reduzir 50% da citopatogenicidade viral quando comparada ao controle. Cada determinação foi executada duas vezes em duplicada.

Contagem do número de placas virais:

$$\text{Título (PFU/mL)} = n / v \cdot d$$

PFU: unidades formadoras de placas

n: número médio de placas

v: volume do inóculo

d: diluição na qual é possível contar corretamente as placas

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 OBTENÇÃO E ANÁLISES DAS FRAÇÕES BRUTAS DE *G. oxysperma*

4.1.1 Extração e Obtenção dos Polissacarídeos

Os espécimes da alga verde *G. oxysperma*, pertencente à ordem Ulvales, foram cultivados na baía de Paranaguá, Paranaguá-PR e coletados em Junho de 2004. As algas secas e moídas foram submetidas a extrações aquosas seqüências (5 g%), sendo duas realizadas a 25 °C e quatro a 80 °C. Após cada etapa de extração os sobrenadantes aquosos foram tratados com etanol (3:1 v/v), centrifugados, ressolubilizados, dialisados e liofilizados, obtendo-se assim os polissacarídeos solúveis em meio aquoso. As frações obtidas de *G. oxysperma* apresentaram materiais insolúveis em suspensão, os quais foram removidos das mesmas através de centrifugação (7.700 x g por 15 minutos), obtendo-se materiais solúveis e precipitados, sendo estes últimos descartados. As duas frações brutas obtidas a partir das extrações a 25 °C foram denominadas Go1 e Go2, sendo as quatro obtidas a quente denominadas de Go3–Go6 (FIGURA 3). Os nomes das frações fazem referência à espécie da alga a partir da qual foram obtidas (Go = *G. oxysperma*) e ao número de extrações aos quais os resíduos foram submetidos. Foram realizadas diferentes etapas de extração com *G. oxysperma* com o objetivo de conhecer o perfil polissacarídico da alga em estudo, desde que foi a primeira vez que a mesma foi estudada quanto a sua composição polissacarídica.

Devido à turbidez do sobrenadante etanólico das frações Go3 e Go4, aos mesmos adicionou-se acetato de potássio para a precipitação do material que se manteve suspenso, e o material precipitado obtido foi agrupado com a fração bruta correspondente.

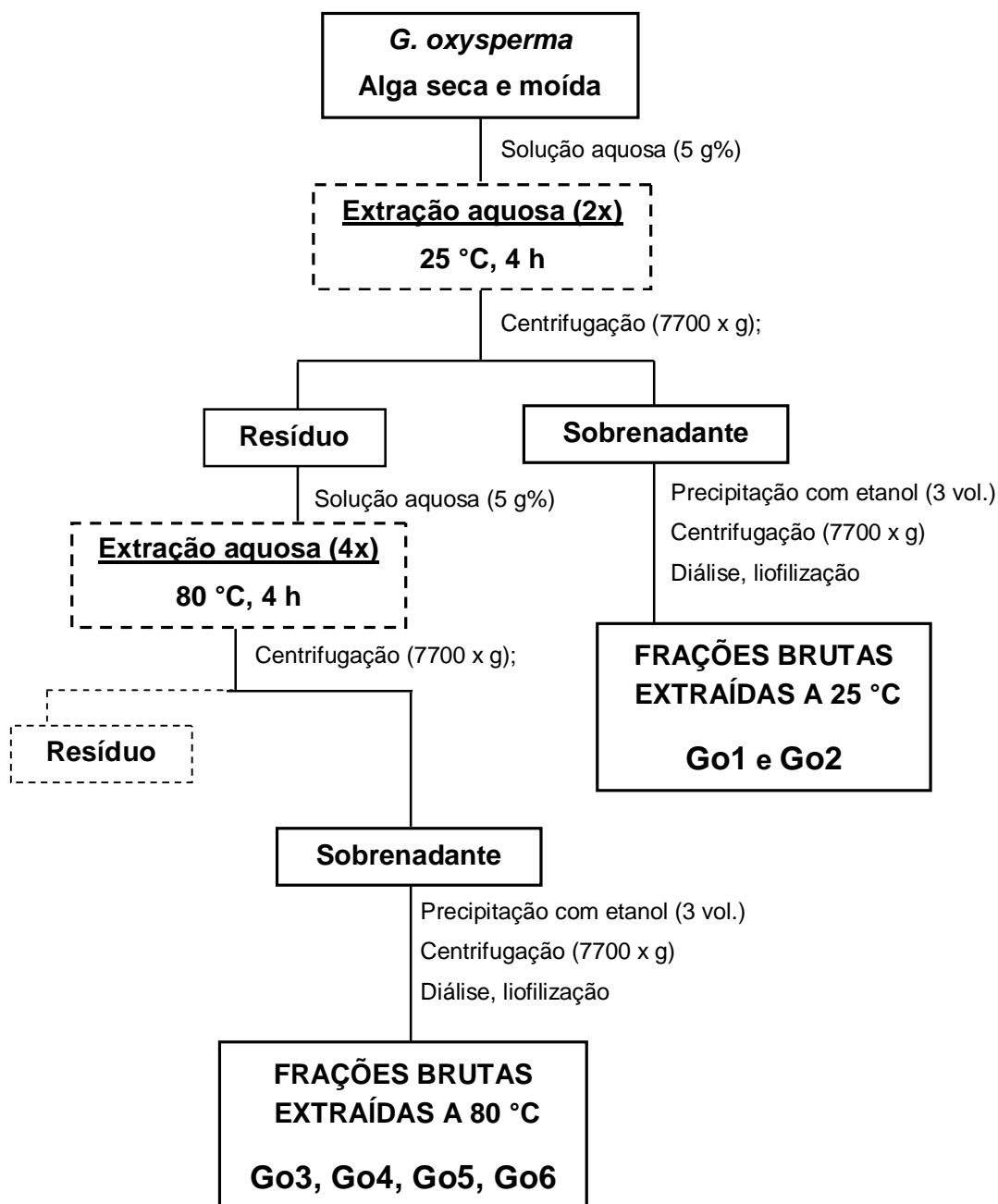


FIGURA 3 – ESQUEMA DE EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS SINTETIZADOS PELA ALGA VERDE *G. oxysperma*

4.1.2 Análises Químicas das Frações Brutas

Os rendimentos totais em porcentagem de massa obtida com relação à massa da alga submetida a extração foi de ~38% para *G. oxysperma*, valor esse que está acima dos relatados para algas verdes da ordem Ulvales, os quais variam de 3,5% a 29,0% (MEDCALF *et al.*, 1975; MAEDA *et al.*, 1991; LAHAYE e ROBIC, 2007) (TABELA 1, p. 33). Essa diferença nos rendimentos pode ser explicada pelos diferentes métodos e tempos de extração utilizados, desde que normalmente são realizadas apenas uma extração a frio e uma a quente para obtenção dos polissacarídeos de algas da ordem Ulvales.

Como pode ser observado na Tabela 4, houve um pequeno aumento nas porcentagens de carboidratos totais e grupos sulfato quando comparadas as extrações a frio e a quente. Os teores de grupos sulfato (21,2–30,9%) observados nos extratos brutos obtidos de *G. oxysperma* foram semelhantes aos obtidos para outras algas da ordem Ulvales (TABELA 1 e 4).

Teores de sulfato mais elevados estão relacionados à ambientes com grande variação de umidade e salobros (como a região entre marés), sendo as atividades biológicas e propriedades físico-químicas dos polissacarídeos obtidos de algas marinhas dependentes desses grupamentos. Como exemplo, a análise da atividade anticoagulante de polissacarídeos obtidos de várias espécies de algas verdes demonstrou que aqueles que continham maior teor de sulfato apresentavam uma maior atividade anticoagulante, sendo que uma ramnana sulfatada obtida de *Monostroma nitidum* (25% de sulfato) apresentou atividade anticoagulante cerca de seis vezes maior que a da heparina (MAEDA *et al.*, 1991), sendo que a dessulfatação de tal polímero levou a redução de sua atividade anticoagulante (HARADA e MAEDA, 1998).

TABELA 4 – RENDIMENTOS E ANÁLISES QUÍMICAS DAS FRAÇÕES BRUTAS OBTIDAS DE *G. oxysperma*

Frações ^a	Rendimento ^b (%)	Açúcar Total ^c (%)	Sulfato ^d (%)	Ácido Urônico ^e (%)	Proteína ^f (%)	$[\alpha]_D^{25^\circ}$
Go1	1,4	38,4	21,2	12,2	7,3	-43,0
Go2	0,6	44,0	22,2	12,9	8,8	-24,5
Go3	13,8	49,6	26,1	17,0	3,9	-38,0
Go4	12,7	46,7	30,9	16,2	2,0	-37,5
Go5	4,5	45,1	23,5	13,7	6,0	-29,0
Go6	5,8	51,7	30,9	13,8	4,6	-33,0

^a frações obtidas por extrações aquosas: a 25 °C (Go1, Go2); a 80 °C (Go3–Go6); ^b em relação à massa de alga seca e moída submetida a extração aquosa (107,3 g); ^c segundo DUBOIS *et al.* (1956); ^d segundo DODGSON e PRICE (1962); ^e segundo FILISETTI-COZZI e CARPITA (1991); ^f segundo LOWRY *et al.* (1951).

Na Tabela 4 observa-se ainda a presença de ácidos urônicos em todas as frações brutas em análise, sendo que os maiores teores desse monossacarídeo ácido foram observados nas frações Go3 (17,0%). A presença de ácidos urônicos é relatada nos polímeros sintetizados por algumas espécies de algas verdes da ordem Ulvales. As ulvanas, polissacarídeos biossintetizados por algas do gênero *Ulva*, são formadas por uma cadeia principal de ramnose, xilose e ácido glucurônico, sendo descrito ainda, a presença de ácido idurônico nesses polímeros (RAY e LAHAYE, 1995ab; QUEMENER, LAHAYE e BOBIN-DUBIGEON, 1997; LAHAYE, 1998). De modo diferente *Monostroma nitidum* sintetiza ramnanas sulfatadas, com baixa quantidade de ácido glucurônico (5,4%), sendo que, após análise da estrutura química do polímero, tal monossacarídeo não foi considerado como constituinte do mesmo (MAEDA *et al.*, 1991; LEE *et al.*, 1998). Analisando-se as Tabelas 1 (p. 33) e 4, é possível verificar que todas as frações obtidas de *G. oxysperma* apresentam maiores teores de ácidos urônicos que os verificados em ramnanas sulfatadas obtidas de *Monostroma* spp., indicando que as mesmas biossintetizam polissacarídeos com diferentes estruturas. Ao contrário do que ocorre em algas da ordem Ulvales, polissacarídeos obtidos de espécies pertencentes a outras ordens de

algas verdes, tais como Bryopsidales e Cladophorales, não apresentam ácidos urônicos (RAO e RAO, 1986; RAO e RAMANA, 1991; RAMANA e RAO, 1991; MATSUBARA *et al.*, 2001) ou os mesmos ocorrem em baixos teores, como é o caso dos polímeros obtidos de *Codium dwarkense* (1,79–3,23%) (SIDDHANTA *et al.*, 1999).

A identificação do tipo de ácidos urônicos presentes nos polissacarídeos em estudo foi realizada após o processo de carboxi-redução das frações polissacarídicas, hidrólise total e análise dos acetatos de alditol por CLG e CLG-EM.

4.1.3 Composição Monossacarídica das Frações Brutas

As análises de composição em termos de monossacarídeos neutros das frações brutas foram realizadas pelo processo de hidrólise total e são apresentados na Tabela 5. As frações apresentaram variação na constituição monossacarídica, porém em todas o principal monossacarídeo foi a ramnose (56,0–88,6 mol%), sendo também observado, em diferentes proporções, xilose (3,9–10,4 mol%), glucose (2,8–21,0 mol%), galactose (2,1–6,2 mol%), arabinose (3,0–10,1 mol%) e manose (1,2–2,5 mol%). A composição monossacarídica dos extratos brutos obtidos de diferentes espécies de algas verdes da ordem Ulvales é principalmente formada por ramnose, glucose e xilose (MAEDA *et al.*, 1991; LAHAYE e AXELOS, 1993; RAY e LAHAYE, 1995ab; LEE *et al.*, 1998; CHEN e CHEN, 2001; TABELA 1, p. 33). Os resultados de composição monossacarídica, aliados a detecção de ácidos urônicos e grupos sulfato, indicam que os extratos brutos obtidos de *G. oxysperma* são constituídos por polissacarídeos ácidos.

TABELA 5 – MONOSSACARÍDEOS NEUTROS PRESENTES NAS FRAÇÕES BRUTAS OBTIDAS DE *G. oxysperma*

Frações	Monossacarídeos (mol%) ^a					
	Ram ^b	Xil	Glc	Gal	Ara	Man
Go1	63,6	10,4	16,9	2,1	4,5	2,5
Go2	56,0	8,6	21,0	3,1	10,1	1,2
Go3	65,9	10,2	10,5	6,2	5,4	1,8
Go4	74,8	9,1	10,6	5,5	—	—
Go5	88,6	3,9	2,8	—	3,0	1,7
Go6	70,4	9,4	11,7	3,1	3,4	2,1

— = não detectado; ^a monossacarídeos quantificados na forma de acetatos de alditóis; ^b abreviatura dos monossacarídeos: Ram= ramnose; Xil= xilose; Glc= glucose; Gal= galactose; Ara=arabinose; Man= manose.

4.1.3.1 Composição monossacarídica das frações brutas carboxi-reduzidas e carboxi-reduzidas/dessulfatadas

Com o objetivo de quantificar conjuntamente os ácidos urônicos e os monossacarídeos neutros presentes nos extratos brutos Go1, Go3, Go4 e Go6 (frações de maior rendimento), estes foram submetidos ao processo de carboxi-redução.

A determinação da composição monossacarídica de polissacarídeos que contêm ácidos urônicos é afetada pela estabilidade da ligação entre estes monossacarídeos ácidos e os monossacarídeos neutros aos quais eles estão ligados. É conhecido que tal ligação glicosídica é estável a hidrólise ácida devido ao efeito indutivo exercido pela carboxila nas ligações glicosídicas próximas a ela. Nesse modelo, a carboxila promove um deslocamento eletrônico favorecendo assim a protonação da ligação glicosídica anterior e dificultando a protonação da ligação glicosídica posterior a ela e originando dissacarídeos denominados ácidos aldobiurônicos, os quais apresentam os ácidos urônicos ligação através de seus C-1 a açúcares redutores neutros (BeMILLER, 1967). Desta forma, o processo de

carboxi-redução dos ácidos urônicos, convertendo-os em seus respectivos açúcares neutros, proporciona uma hidrólise completa da cadeia polissacarídica e a quantificação correta de seus monossacarídeos constituintes (item 3.7.1).

As frações brutas Go1, Go3, Go4 e Go6 foram carboxi-reduzidas e ao nome dos produtos obtidos adicionou-se a letra "R". As frações apresentaram redução nos teores de ácidos urônicos, os quais foram de 80%, 100%, 80% e 83%, respectivamente (TABELA 6). Em todas as frações carboxi-reduzidas houve aumento de glucose de 5,9–10,9 mol% e de galactose de 2,8–7,2 mol%, quando comparadas às frações brutas nativas, demonstrando assim a presença de ácidos glucurônico e galacturônico, respectivamente (TABELA 6). Os ácidos glucurônico e galacturônico correspondem, em média, a 73% e 27%, respectivamente, dos ácidos urônicos presentes nas frações carboxi-reduzidas, Go1-R, Go3-R e Go4-R. Em contrapartida, a fração Go6-R contém ~50% de cada um dos ácidos urônicos acima mencionados.

A presença de ácido glucurônico é observada em polissacarídeos obtidos de diferentes algas verdes (PAINTER, 1983; KLOAREG e QUATRANO, 1988; LAHAYE, BRUNEL e BONNIN, 1997; HAYAKAWA *et al.*, 2000), sendo que nas ulvanas essas unidades monossacarídicas estão presentes na cadeia principal do polímero de duas maneiras: 4-ligadas e como terminais não redutores (TABELA 2, p. 36). Adicionalmente é encontrado ácido idurônico como constituinte das ulvanas.

O ácido idurônico, quando submetido ao processo de carboxi-redução, é convertido no monossacarídeo neutro idose e, no processo de hidrólise ácida, a idose livre entra em equilíbrio com a forma 1,6-anidro-idose, sendo que 86% das unidades monossacarídicas encontram-se ciclizadas. Após redução e acetilação dos monossacarídeos, a 1,6-anidro-idose é quantificada na forma de 2,3,4-tri-O-acetil-1,6-anidro-hexose por CLG-EM (COLLINS e FERRIER, 1995). A ausência do derivado 2,3,4-tri-O-acetil-1,6-anidro-hexose entre os produtos de hidrólise dos polímeros carboxi-reduzidos, descartou a presença de unidades de idose nesse polímeros e, conseqüentemente, a presença de ácido idurônico nos extratos brutos.

TABELA 6 – RENDIMENTOS, ANÁLISES QUÍMICAS E MONOSSACARÍDEOS NEUTROS DAS FRAÇÕES BRUTAS CARBOXI-REDUZIDAS E CARBOXI-REDUZIDAS/DESSULFATADAS

Frações	Rendimento (%)	Ácido Urônico ^b (%)	Sulfato (%) ^c	Monossacarídeos (mol%) ^a					
				Ram ^d	Xil	Glc	Gal	Ara	Man
Go1 ^e	1,4	12,2	21,2	63,6	10,4	16,9	2,1	4,5	2,5
Go1-R	84,0 ^f	2,5	n.d.	59,0	9,6	22,8	6,2	1,0	1,4
Go1-RD	53,5 ^g	n.d.	17,1	64,6	6,7	21,0	4,4	1,8	1,5
Go3 ^e	13,8	17,0	26,1	65,9	10,2	10,5	6,2	5,4	1,8
Go3-R	68,3 ^f	—	25,3	57,6	9,5	20,8	9,2	1,4	1,5
Go3-RD	71,5 ^g	n.d.	4,2	65,8	7,2	21,1	5,9	—	—
Go4 ^e	12,7	16,2	30,9	74,8	9,1	10,6	5,5	—	—
Go4-R	69,0 ^f	3,3	n.d.	59,4	9,8	21,5	8,3	—	1,0
Go4-RD	55,8 ^g	n.d.	6,0	64,4	7,9	20,8	6,9	—	—
Go6 ^e	5,8	13,8	30,9	70,4	9,4	11,7	3,1	3,4	2,1
Go6-R	80,4 ^f	2,4	n.d.	58,5	9,6	18,1	10,3	1,0	2,5
Go6-RD	57,3 ^g	n.d.	5,0	60,3	7,3	20,3	9,1	1,1	1,9

— = não detectado; n.d. = não determinado; ^a monossacarídeos quantificados na forma de acetatos de alditóis; ^b segundo FILISETTI-COZZI e CARPITA (1991); ^c segundo DODGSON e PRICE (1962); ^d abreviatura dos monossacarídeos: Ram= ramnose; Xil= xilose; Glc= glucose; Gal= galactose; Ara=arabinose; Man= manose; ^e fração incluída com fins comparativos; ^f em relação ao material submetido a carboxi-redução (Go1= 300 mg; Go3= 200 mg; Go4= 300 mg; Go6= 290 mg); ^g em relação ao material submetido a dessulfatação (Go1-R, Go3-R, Go4-R e Go6-R= 100 mg).

Com o objetivo de se obter frações polissacarídicas mais simplificadas, os polímeros carboxi-reduzidos foram submetidos ao processo de dessulfatação solvolítica, o qual remove os grupos sulfato do polímero, sem promover degradação do mesmo (item 3.7.2). A composição monossacarídica dos produtos dessulfatados foi semelhante a dos polímeros carboxi-reduzidos que lhes deram origem, indicando

assim que não houve degradação dos mesmos durante o processo solvolítico (TABELA 6). Após dessulfatação houve redução de 20%, 84%, 81% e 84% nos teores de sulfato para as frações Go1, Go3, Go4 e Go6, respectivamente.

4.1.4 Análise de Metilação das Frações Brutas Carboxi-Reduzidas

Dando seqüência ao estudo de caracterização dos polissacarídeos presentes nas frações brutas obtidas de *G. oxysperma*, Go1-R, Go3-R, Go4-R e Go6-R foram submetidas a três etapas de metilação e os resultados são apresentados na Tabela 7.

Observa-se nas frações carboxi-reduzidas a presença de derivados metilados semelhantes, o que demonstra grande similaridade estrutural entre os polímeros obtidos por diferentes etapas de extração. Os derivados 4-Me-Ram (12,3–17,3 mol%) e Ram (13,1–18,5 mol%) foram os principais produtos da metilação de todas as frações carboxi-reduzidas, demonstrando que as mesmas são majoritariamente compostas por unidades de ramnose 2,3- e 2,3,4-substituídas. A alta porcentagem de ramnose não metilada foi persistente mesmo após as três etapas de metilação, demonstrando que tal derivado não é conseqüência de submetilação da amostra. Adicionalmente, Go1-R, Go3-R, Go4-R e Go6-R contêm altos teores de 2-Me-Ram (8,3–10,6 mol%) e 3-Me-Ram (8,5–10,5 mol%), e em menores porcentagens os derivados dimetilados (2,4-Me₂-Ram e 3,4-Me₂-Ram) (TABELA 7).

Nos polissacarídeos carboxi-reduzidos as unidades de xilose encontram-se principalmente 4-ligadas (3,7–4,8 mol%). Em contrapartida, foram encontrados vários derivados parcialmente metilados para as unidades de glucose, sendo os principais 3,4,6-Me₃-Glc (3,2–4,1 mol%), 2,3,6-Me₃-Glc (3,9–5,5 mol%) e 3,6-Me₂-Glc (2,4–9,6 mol%). O principal derivado metilado obtido para as unidades de galactose foi o 3,4,6-Me₃-Gal (4,3–5,8 mol%), sendo ainda verificado a presença de baixos teores de 3-Me-Man (1,7–2,5 mol%).

TABELA 7 – ANÁLISE DE METILAÇÃO DAS FRAÇÕES BRUTAS CARBOXI-REDUZIDAS

Derivado ^a	Ligação	Tr ^b	Frações			
			Go1-R	Go3-R	Go4-R	Go6-R
2,3,4-Me ₃ -Ram ^c	Ramp-(1→	7:37	tr.	—	tr.	1,1
3,4-Me ₂ -Ram	→2)-Ramp-(1→	9:02	2,9	2,9	5,8	3,7
2,4-Me ₂ -Ram	→3)-Ramp-(1→	9:30	5,1	10,1	4,0	2,9
2-Me-Ram	→3,4)-Ramp-(1→	10:90	8,8	10,2	8,3	10,6
4-Me-Ram	→2,3)-Ramp-(1→	11:32	12,5	17,3	12,3	13,6
3-Me-Ram	→2,4)-Ramp-(1→	11:79	9,3	9,1	8,5	10,5
Ram	→2,3,4)-Ramp-(1→	12:47	15,4	13,1	18,5	16,3
2,3,4-Me ₃ -Xil	Xilp-(1→	7:97	2,1	2,8	2,1	1,8
2,4-Me ₂ -Xil	→3)-Xilp-(1→	9:83	2,3	—	3,0	—
2,3-Me ₂ -Xil	→4)-Xilp-(1→	10:30	4,7	3,8	3,7	4,8
2/3-Me-Xil	→3,4/2,4)-Xilp-(1→	13:38	2,1	1,5	1,7	1,9
Xil	→2,3,4)-Xilp-(1→	15:19	1,8	—	2,2	1,6
2,3,4,6-Me ₄ -Glc	Glc p-(1→	9:45	3,6	1,5	3,3	2,2
3,4,6-Me ₃ -Glc	→2)-Glc p-(1→	12:23	4,1	3,3	3,2	3,5
2,3,6-Me ₃ -Glc	→4)-Glc p-(1→	13:49	5,5	5,5	4,7	3,9
2,6-Me ₂ -Glc	→3,4)-Glc p-(1→	15:99	2,8	—	1,9	3,0
3,6-Me ₂ -Glc	→2,4)-Glc p-(1→	17:43	2,9	9,6	4,7	2,4
2,3-Me ₂ -Glc	→4,6)-Glc p-(1→	18:90	3,0	1,2	3,7	3,3
Glc	→2,3,4,6)-Glc p-(1→	31:35	1,5	—	—	—
2,3,4,6-Me ₄ -Gal	Gal p-(1→	10:01	1,9	2,3	—	3,3
3,4,6-Me ₃ -Gal	→2)-Gal p-(1→	13:21	4,3	5,8	4,9	4,7
2,3,4-Me ₃ -Gal	→6)-Gal p-(1→	14:84	1,7	—	2,5	2,3
Gal	→2,3,4,6)-Gal p-(1→	29:24	—	—	1,0	tr.
3-Me-Man	→2,4,6)-Man p-(1→	25:33	1,7	tr.	—	2,5

— = não detectado; / = e/ou; tr. = traço; ^a mol% dos monossacarídeos quantificados na forma de alditóis acetato parcialmente metilados; ^b tempo de retenção (em min) dos derivados analisados em coluna DB-225; ^c 2,3,4-Ram analisada como 1,5-di-O-acetil-2,3,4-O-metilramnitol, etc.

Os dados de metilação demonstraram que as frações brutas Go1, Go3, Go4 e Go6 apresentam semelhanças qualitativas e quantitativas em termos de derivados obtidos após metilação. Aliando a estas análises os resultados de RMN de ^{13}C (item 4.1.5), demonstrou-se a complexidade estrutural dos polímeros presentes nas frações brutas de *G. oxysperma*.

4.1.5 RMN de ^{13}C das Frações Brutas Nativas, Carboxi-Reduzidas e Carboxi-Reduzidas/Dessulfatadas

Os espectros de RMN de ^{13}C das frações brutas Go1–Go6 estão apresentados na Figura 4. Estes espectros são similares, apresentando complexa região anomérica (δ 98,0–105,0), com sinais alargados, indicando a sobreposição dos mesmos. A presença de sinais de alta intensidade em δ 17,9–18,2, correspondentes aos CH_3 das unidades de ramnose, confirma os dados obtidos nas análises de composição monossacarídica (TABELA 5, p. 72), onde a ramnose representa o principal monossacarídeo neutro das frações Go1–Go6. Sinais em δ ~176,0 (grupos COOH) confirmam a presença de ácidos urônicos nas frações brutas. Ainda, é possível observar sinais de baixa intensidade correspondentes ao C-6 de hexoses, quando estes carbonos estão livres (δ 62,4) e sinais em δ 64,2 e 66,5, referentes ao C-5 de unidades de xilose 4-ligadas ou como terminais não redutores, respectivamente.

Os deslocamentos químicos observados nestes espectros diferem daqueles obtidos para espécies do gênero *Ulva* (TABELA 26, p. 157) (LAHAYE *et al.*, 1999), indicando assim uma diferença estrutural entre tais polímeros, embora os mesmos apresentem composição química e monossacarídica semelhantes (TABELAS 1, 4 e 5, p. 33, 70 e 72).

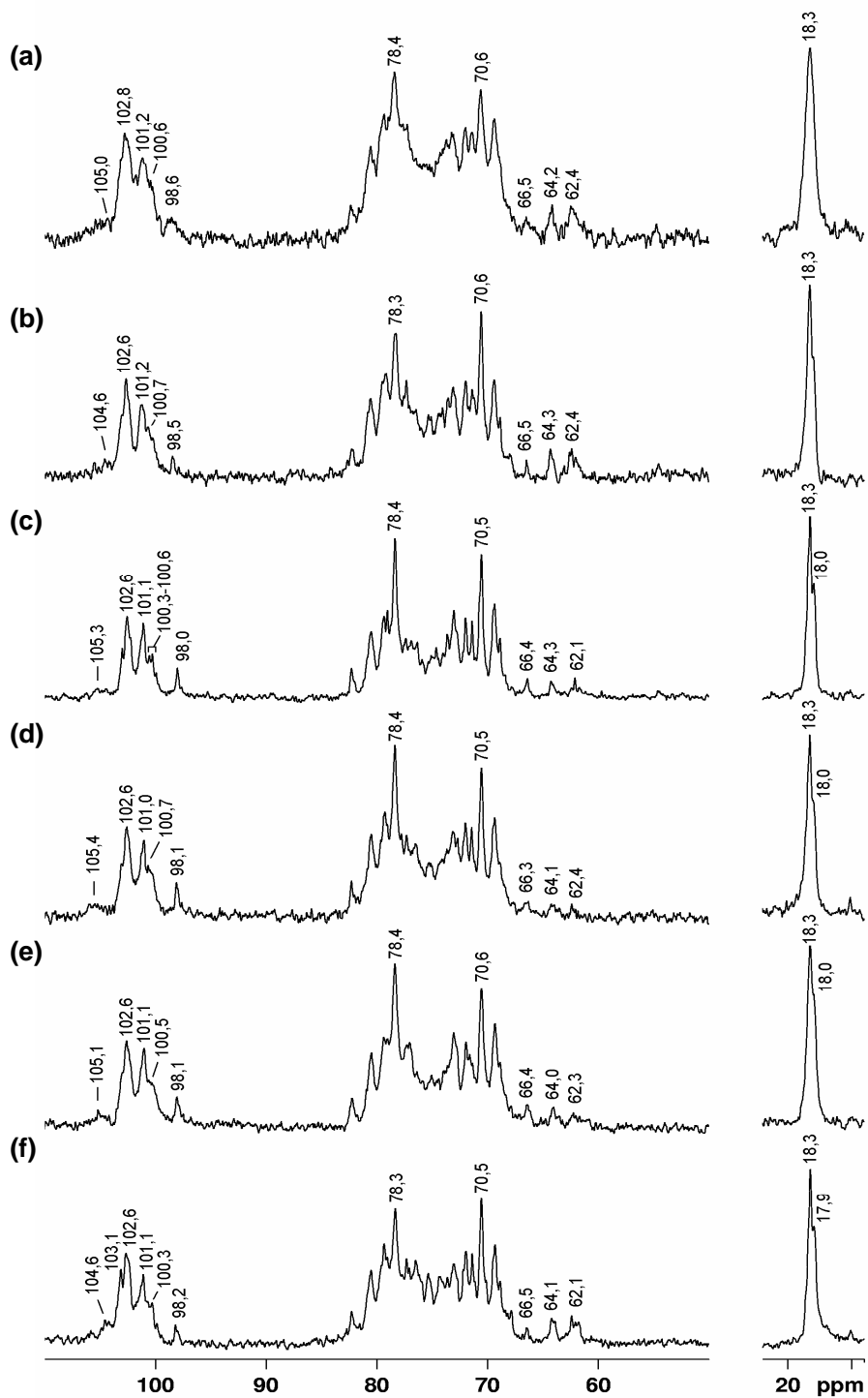


FIGURA 4 – ESPECTROS DE RMN DE ^{13}C DAS FRAÇÕES BRUTAS Go1 (a), Go2 (b), Go3 (c), Go4 (d), Go5 (e), Go6 (f)
 Solvente: D_2O (70 °C); acetona como padrão interno (δ 31,45).

As frações carboxi-reduzidas também foram analisadas por RMN de ^{13}C , sendo obtidos espectros semelhantes aos dos extratos brutos, diferindo destes últimos pelo aumento da intensidade dos sinais na região de δ 60,0–62,5 (espectros não apresentados). Tais assinalamentos poderiam corresponder ao C-6 livre de unidades de hexoses já presentes no polímero nativo, bem como originadas após carboxi-redução dos ácidos urônicos. Ressalta-se, no entanto, que a alta intensidade destes sinais não era condizente com a porcentagem de hexoses presente na composição monossacarídica das frações carboxi-reduzidas (TABELA 6, p. 74).

Supondo que a CMC utilizada no processo de carboxi-redução poderia interferir neste resultado, foi obtido o espectro de RMN de ^{13}C deste composto. Como observado, a CMC apresenta sinais em δ 61,5–61,6 (FIGURA 5), os quais estão sobrepostos aos correspondentes C-6 livres das hexoses.

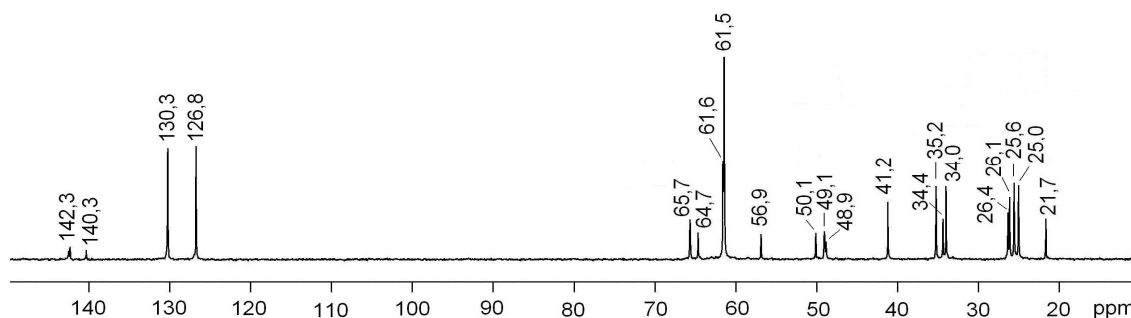


FIGURA 5 – ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DA CARBODIIMIDA (CMC)

Solvente: D_2O (70 °C); acetona como padrão interno (δ 31,45).

Após dessulfatação solvolítica das frações brutas carboxi-reduzidas houve considerável simplificação dos espectros de RMN de ^{13}C (FIGURA 6), onde há um menor número de sinais, sendo os mesmos mais definidos quando comparados aos espectros das respectivas frações sulfatadas. Estes resultados estão de acordo com os obtidos pela análise de metilação onde há indicação de uma grande heterogeneidade em termos de posicionamento de grupos sulfato. Ainda, pôde ser observado uma diminuição dos sinais em δ ~61,5, indicando que, durante o processo de solvólise, houve eliminação de carbodiimida contaminante.

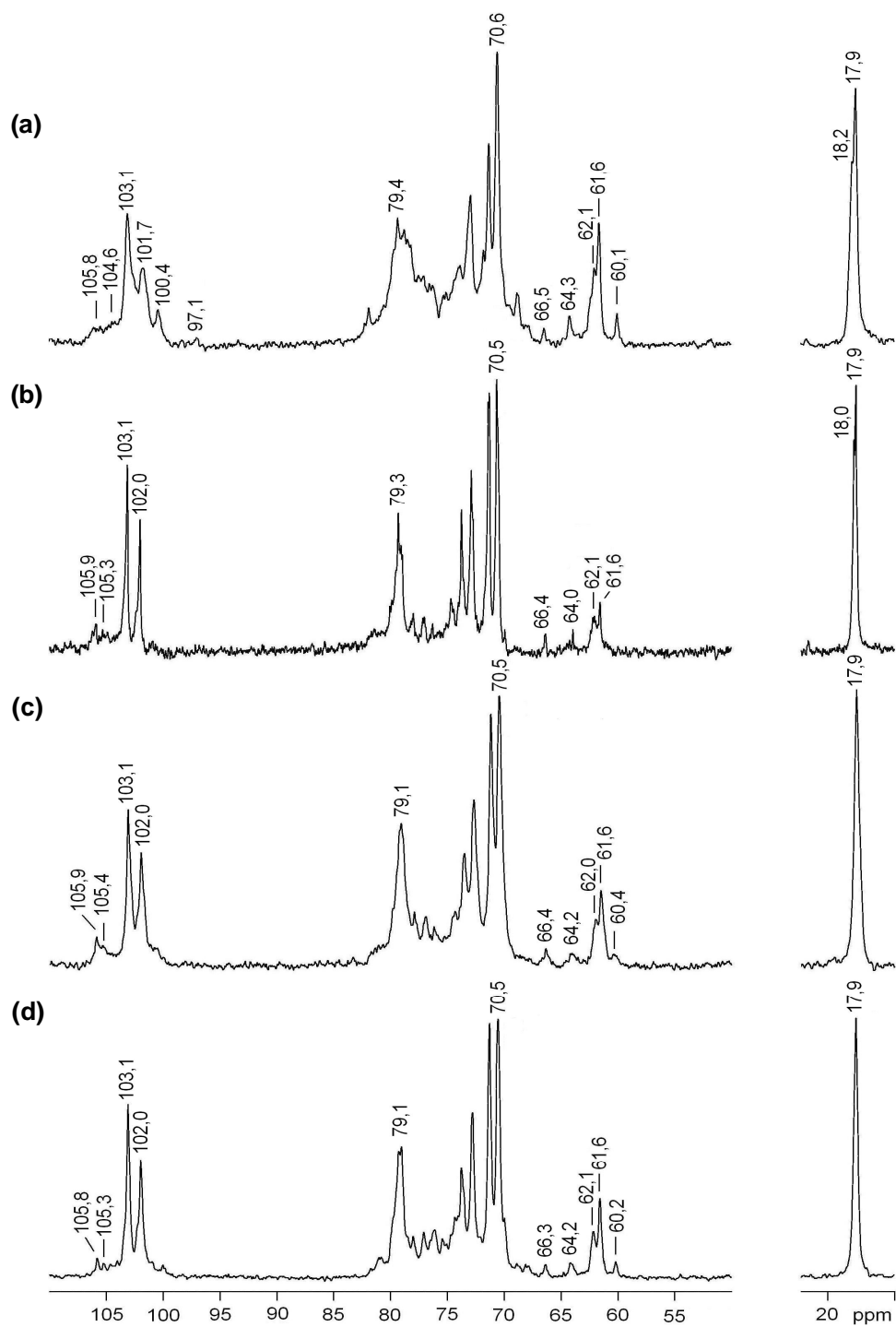


FIGURA 6 – ESPECTROS DE RMN DE ^{13}C DAS FRAÇÕES BRUTAS CARBOXI-REDUZIDAS/DESSULFATADAS Go1-RD (a), Go3-RD (b), Go4-RD (c) e Go6-RD (d)

Solvente: D_2O (70 °C); acetona como padrão interno (δ 31,45).

4.1.6 Homogeneidade das Frações Brutas Obtidas de *G. oxysperma*

As frações brutas obtidas por extrações aquosas a 80 °C a partir da alga verde *G. oxysperma* foram analisadas por HPSEC-MALLS-IR para avaliação de seus perfis cromatográficos, sendo os resultados obtidos a partir do detector de índice de refração apresentados na FIGURA 7. O perfil não unimodal das diferentes frações analisadas demonstraram a presença de polímeros com diferentes massas moleculares.

YAMAMOTO (1980) analisou extratos obtidos a 80–90 °C a partir de diferentes algas da ordem Ulvales e, assim como observado para as frações obtidas a quente de *G. oxysperma*, obteve perfis heterogêneos quando tais materiais foram analisados por cromatografia de gel permeação. Em contrapartida, através de extração aquosa a 100 °C (contendo oxalato de amônio - quelante de cátions divalentes) foi obtido de *U. rigida* uma fração contendo principalmente um pico simétrico e homogêneo após análise por cromatografia de troca iônica (RAY e LAHAYE, 1995a).

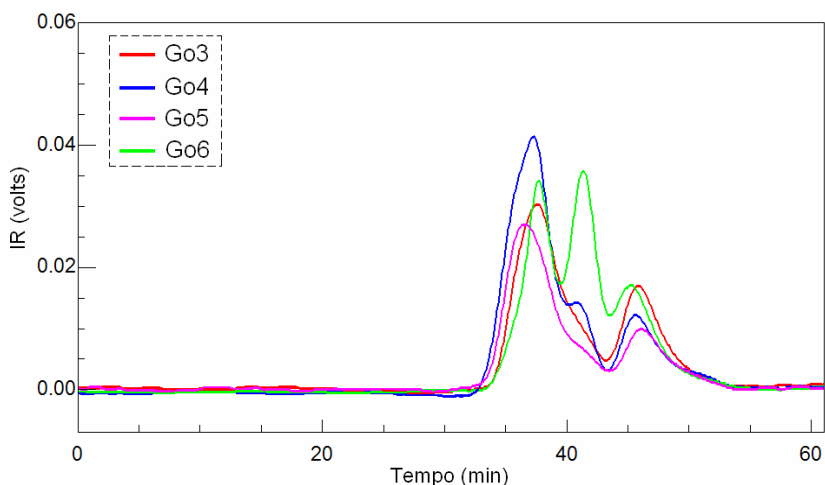


FIGURA 7 – PERFIL DE ELUIÇÃO EM HPSEC COM DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO DAS FRAÇÕES BRUTAS Go3–Go6 OBTIDAS DE *G. oxysperma*

4.2 PURIFICAÇÃO DA FRAÇÃO BRUTA Go3

Após avaliação do perfil cromatográfico por HPSEC-MALLS-IR das frações de maior rendimento, obtidas por extração aquosa a 80 °C de *G. oxysperma*, foi observado que a fração Go3 apresentava-se com o perfil menos heterogêneo quando comparada as frações Go4–Go6. Por este motivo, e por ser a fração de maior rendimento (TABELA 4, p. 70), Go3 foi selecionada para a obtenção de uma fração polissacarídica homogênea e posterior análise da sua estrutura química fina.

4.2.1 Cromatografias de Troca Iônica e Exclusão da Fração Bruta Go3

Com o objetivo de se obter uma fração polissacarídica homogênea, a fração bruta Go3 foi submetida à cromatografia de troca aniônica contendo DEAE-Sephacel (item 3.9.1), utilizando-se como eluentes água (Go3w) e concentrações crescentes de NaCl (Go3a–Go3g) (FIGURA 8). O rendimento e composição química das sub-frações obtidas são apresentados na Tabela 8.

O rendimento total obtido para a fração cromatografada foi de 93,0% relativo à massa polissacarídica inicial aplicada na coluna. A fração de maior rendimento, representando 53,1% de todo material recuperado, foi a eluída com 1,5 M de NaCl (Go3e). Analisando a Tabela 8 nota-se, nas sub-frações obtidas, elevados teores de grupos sulfato (15,5–32,2%), sendo todas constituídas por ácidos urônicos em diferentes porcentagens (4,2–21,3%).

As frações eluídas com concentrações crescentes de NaCl apresentaram um gradativo aumento no teor de grupos sulfato, sendo que os teores de ácidos urônicos variaram bastante durante as etapas de eluição. Em termos de proteína, a fração eluída com água Go3w foi a que apresentou maiores teores desse polímero (20,1% de proteína) e a fração de maior rendimento (Go3e) apresentou as menores porcentagens do mesmo (0,8%).

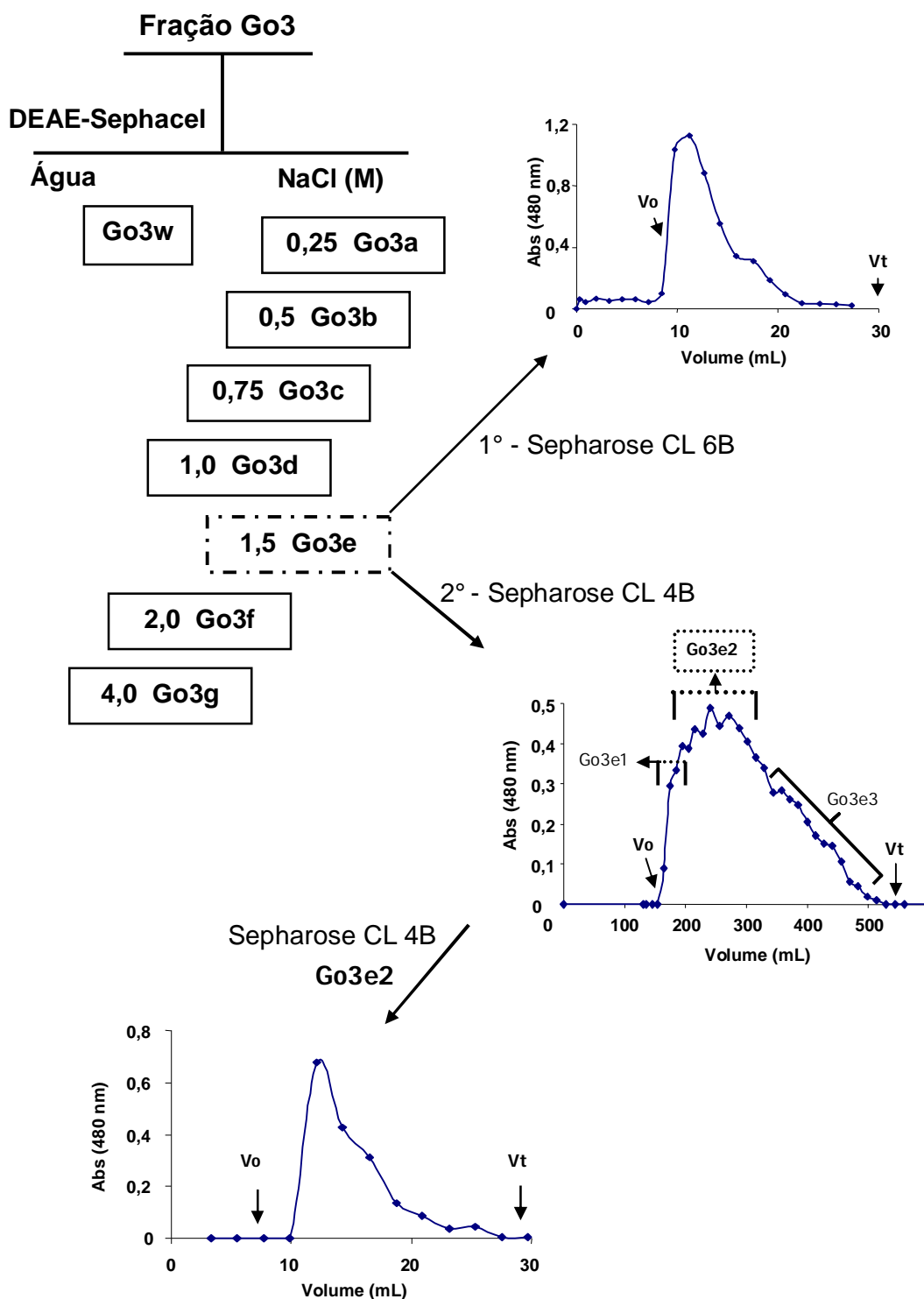


FIGURA 8 – ESQUEMA DOS FRACIONAMENTOS CROMATOGRÁFICOS DA FRAÇÃO BRUTA Go3 OBTIDA DE *G. oxysperma*

A fração de maior rendimento Go3e (53,1%) foi submetida a cromatografia analítica de exclusão em Sepharose CL 6B (limite de exclusão: 1×10^4 – 1×10^6 ; item 3.9.2.1). Como observado na Figura 8, tal fração encontrava-se heterogênea e com início de eluição no volume morto do gel. Sendo assim, a mesma foi submetida a uma nova cromatografia de exclusão, agora em coluna contendo Sepharose CL 4B (limite de exclusão: 3×10^4 – 5×10^6), utilizando-se grau preparativo, com o objetivo de se obter frações polissacarídicas em quantidades suficientes para análises posteriores (item 3.9.2.1).

A Figura 8 apresenta o perfil cromatográfico obtido após fracionamento de Go3e em Sepharose CL 4B, o qual tem início de eluição próximo ao V_0 da fase estacionária e contém, assim como obtido no teste de purificação em Sepharose CL 6B, um pico alargado e heterogêneo, o que novamente indica a presença de polímeros com elevadas massas moleculares, além da presença de agregados polissacarídicos. As frações obtidas foram separadas como indicado na Figura 8 (Go3e1: 6,2%; Go3e2: 40,4%; Go3e3: 19,2%), e a fração de maior rendimento (Go3e2) apresentou perfil heterogêneo quando cromatografada analiticamente na fase estacionária acima citada.

As purificações por cromatografias de troca aniônica e exclusão não foram eficientes para obtenção de uma fração homogênea quanto a massa molecular. Com o objetivo de se obter uma fração com tal característica, a amostra Go3 foi submetida a ultrafiltração em membrana.

TABELA 8 – RENDIMENTOS E ANÁLISES QUÍMICAS DAS SUB-FRAÇÕES OBTIDAS APÓS CROMATOGRAFIA DE TROCA ANIÔNICA DA FRAÇÃO BRUTA Go3

Frações ^a	Rendimento ^b (%)	Açúcar Total ^c (%)	Sulfato ^d (%)	Ácido Urônico ^e (%)	Proteína ^f (%)
Go3 ^g	13,8	49,6	26,1	17,0	3,9
Go3w	12,8	52,9	27,6	19,5	2,9
Go3a	1,7	39,2	15,5	4,2	20,1
Go3b	6,2	47,9	16,4	20,3	4,3
Go3c	2,4	48,2	28,6	21,3	4,7
Go3d	10,0	48,7	32,2	17,4	2,0
Go3e	53,1	57,3	32,1	11,4	0,8
Go3f	4,5	41,4	26,9	13,6	3,3
Go3g	1,4	13,9	21,5	4,0	8,9

^a frações obtidas após cromatografia de troca aniônica da fração Go3 (FIGURA 8); ^b em relação ao material aplicado na coluna (Go3= 2,9 g); ^c segundo DUBOIS *et al.* (1956); ^d segundo DODGSON e PRICE (1962); ^e segundo FILISETTI-COZZI e CARPITA (1991); ^f segundo LOWRY *et al.* (1951); fração incluída com fins comparativos.

4.2.2 Ultrafiltração em Membrana da Fração Bruta Go3

Após a verificação de que os testes cromatográficos para purificação dos polissacarídeos de *G. oxysperma* eram de baixa eficiência, testou-se a metodologia de ultrafiltração (item 3.4). Dessa forma, a fração Go3 foi solubilizada e submetida a ultrafiltração em membrana com limite de exclusão de 300 kDa, obtendo-se uma fração de retida (70% de rendimento) e uma fração eluída (30% de rendimento), as quais foram denominadas Go3r e Go3e, respectivamente. Essas frações foram analisadas por HPSEC-MALLS-IR e os respectivos cromatogramas são apresentados nas Figuras 9 e 10.

Analisando a Figura 9 verifica-se que a fração Go3r foi eluída com um pico simétrico, indicando assim que a mesma encontra-se homogênea quanto a sua

massa. O valor de dn/dc calculado em 0,118 (item 3.9.5) foi utilizado para a determinação da massa molecular ponderal média da fração Go3r, que foi de 1.519 kDa.

A observação de que a massa molecular ponderal média da fração Go3r é menor que o limite de exclusão dos géis utilizados anteriormente para purificação de Go3 (item 4.2.1) indica que durante os processos cromatográficos os polissacarídeos contidos em tal fração encontravam-se agregados, aumentando assim suas massas. Ao que tudo indica, tais agregados foram desfeitos durante a ultrafiltração, provavelmente pela presença de pressão sobre as cadeias polissacarídicas. A formação de tais agregados foi estudada por Freitas (2003), que verificou uma redução de 41% na massa molecular de amostras de galactoxiloglucanas aquecidas a 85 °C e então resfriadas a temperatura ambiente. Semelhantemente, Wang *et al.* (2001) aqueceu e submeteu a pressão frações polissacarídicas, verificando redução de suas massas moleculares.

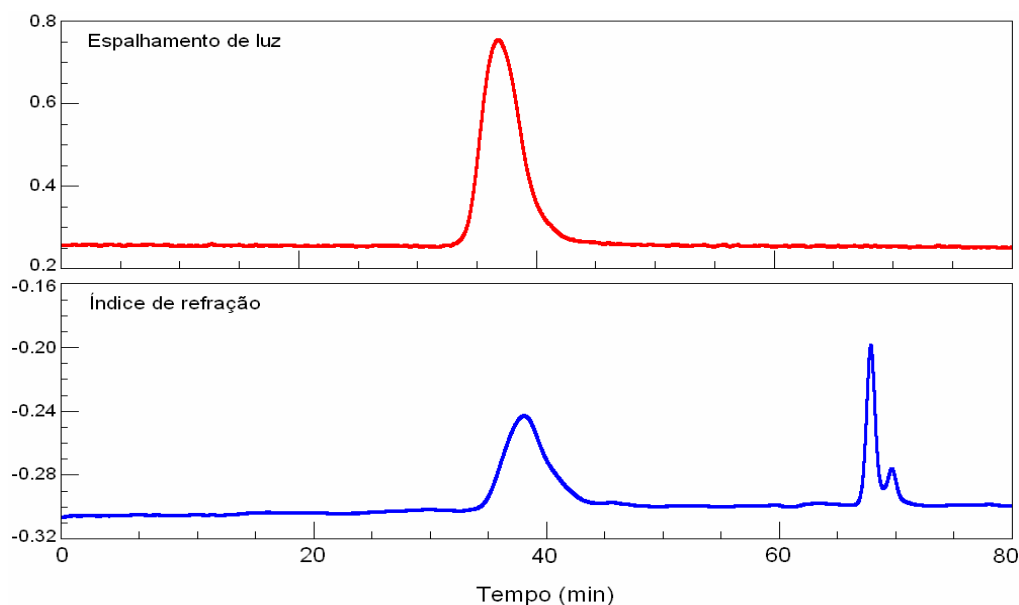


FIGURA 9 – CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO ESTÉRICA (HPSEC-MALLS-IR) DA FRAÇÃO RETIDA EM MEMBRANA DE 300 kDa Go3r

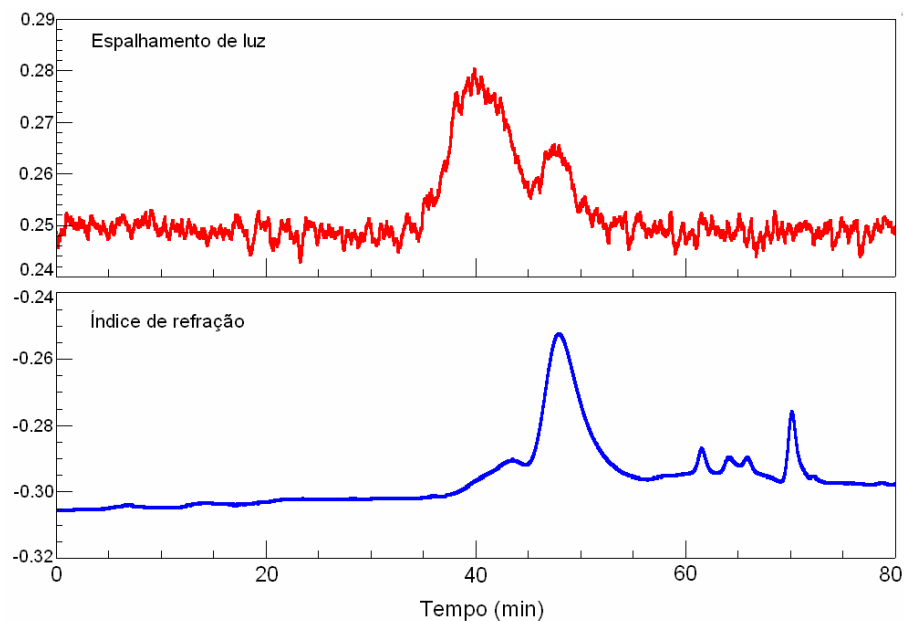


FIGURA 10 – CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO ESTÉRICA (HPSEC-MALLS-IR) DA FRAÇÃO ELUÍDA EM MEMBRANA DE 300 kDa Go3e

As massas moleculares encontradas para ulvanas variam de 91–820 kDa (YAMAMOTO, 1980; YAMAMOTO *et al.*, 1980; PARADOSSI *et al.*, 1999) e para ramnanas sulfatadas de 140–725 kDa (MAEDA *et al.*, 1991; LEE *et al.*, 1998; HARADA e MAEDA, 1998; ZHANG *et al.*, 2008), sendo elas menores às observadas para a fração em estudo.

A fração Go3e apresentou perfil heterogêneo (FIGURA 10) sendo submetida a outras metodologias de purificação (ultrafiltração em membrana de 100, 30 e 10 kDa), porém todas falharam para obtenção de uma fração homogênea.

A sobreposição dos cromatogramas obtidos por análise de HPSEC a partir do detector IR das frações Go3, Go3r e Go3e é apresentada na Figura 11, para comparação do processo de purificação.

Deste modo, os estudos da estrutura química fina dos polissacarídeos sintetizados por *G. oxysperma* tiveram andamento com a fração homogênea Go3r.

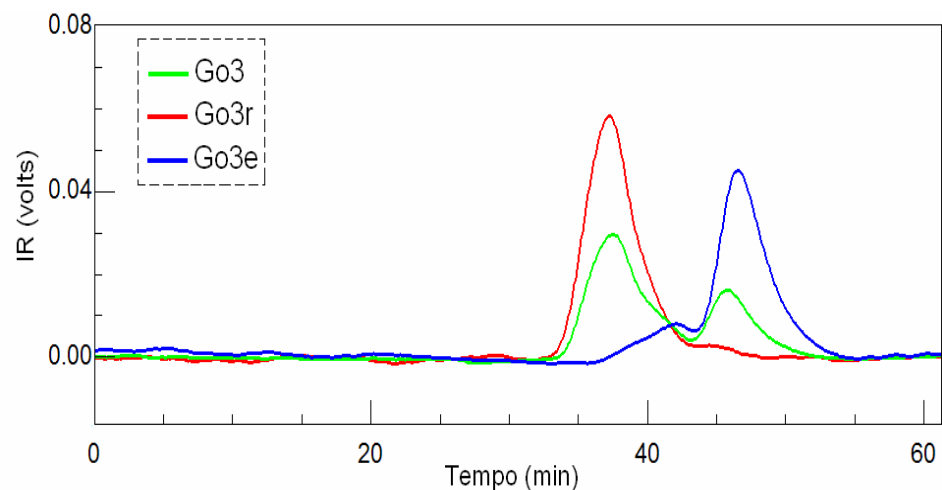


FIGURA 11 – PERFIL DE ELUIÇÃO EM HPSEC COM DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO DAS FRAÇÕES Go3, Go3r E Go3e

4.3 ANÁLISE ESTRUTURAL DA FRAÇÃO HOMOGÊNEA Go3r

4.3.1 Análises Químicas

As frações Go3r e Go3e foram submetidas a análises químicas e os resultados são apresentados na Tabela 9. É possível observar que ambas as frações apresentaram teores semelhantes de grupos sulfato (25,8% e 29,5%, respectivamente), porém, a fração homogênea (Go3r) apresentou maiores teores de ácidos urônicos que a fração eluída, os quais são semelhantes aos presentes na fração bruta Go3.

O teor de sulfato presente na fração Go3r foi semelhante ao obtido para algas da ordem Ulvales (RAY e LAHAYE, 1995ab), assim como para algas da família Monostromataceae (MAEDA *et al.*, 1991; LEE *et al.*, 1998; TABELA 1, p. 33). A presença de grupos sulfato influencia propriedades biológicas e físico-químicas de polissacarídeos.

TABELA 9 – RENDIMENTOS E ANÁLISES QUÍMICAS DAS FRAÇÕES Go3r E Go3e

Frações	Rendimento (%)	Açúcar Total ^a (%)	Sulfato ^b (%)	Ácido Urônico ^c (%)	Proteína ^d (%)	$[\alpha]_D^{25^\circ}$
Go3 ^e	13,8	49,6	26,1	17,0	3,9	-38
Go3r	70,0 ^f	49,8	25,8	19,0	—	-45
Go3e	30,0 ^f	39,0	29,5	9,7	3,7	-20

— = não detectado; ^a segundo DUBOIS *et al.* (1956); ^b segundo DODGSON E PRICE (1962); ^c segundo FILISETTI-COZZI e CARPITA (1991); ^d segundo LOWRY *et al.* (1951); ^e fração incluída com fins comparativos; ^f em relação ao material recuperado após ultrafiltração. Rendimento da ultrafiltração foi de 90%.

Assim como os outros substituintes, a presença de ácidos urônicos é comum nos polímeros de algas verdes da ordem Ulvales. As ulvanas contêm em sua cadeia principal unidades de $[\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-D-GlcpA-(1}\rightarrow]$ e $[\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-L-IdopA-(1}\rightarrow]$, além de ramnose e xilose (RAY e LAHAYE, 1995ab; LAHAYE e RAY, 1996; LAHAYE, BRUNEL e BONNIN, 1997; LAHAYE, 1998) (TABELAS 2 e 3, p. 36 e 40).

Ao contrário do que ocorre em algas da ordem Ulvales, polissacarídeos solúveis em meio aquoso obtidos de espécies pertencentes a outras ordens de algas verdes não apresentam ácido urônico (RAO e RAO, 1986; RAO e RAMANA, 1991; RAO, RAO e RAMANA, 1991; RAMANA e RAO, 1991; MATSUBARA *et al.*, 2001), ou os mesmos ocorrem em baixos teores (SIDDHANTA *et al.*, 1999).

4.3.2 Composição Monossacarídica

As frações Go3r e Go3e foram submetidas ao processo de hidrólise total (item 3.6) para análise de suas composições monossacarídicas, cujos resultados são apresentados na Tabela 10. A composição monossacarídica de Go3r e Go3e foi semelhante a da fração bruta Go3, sendo que houve concentração de arabinose, manose e glucose na fração eluída (Go3e).

A partir da composição monossacarídica da fração Go3r, a qual difere das ulvanas e ramnanas sulfatadas sintetizadas por algas do gênero *Ulva* e *Monostroma*, respectivamente, os polissacarídeos sulfatados biossintetizados por *G. oxysperma* foram denominados **heteroramnanas**.

TABELA 10 – MONOSSACARÍDEOS NEUTROS PRESENTES NAS FRAÇÕES Go3r E Go3e

Frações	Monossacarídeos (mol%) ^a					
	Ram ^b	Xil	Glc	Gal	Ara	Man
Go3 ^c	65,9	10,2	10,5	6,2	5,4	1,8
Go3r	77,0	17,1	4,9	1,0	—	—
Go3e	52,9	15,5	20,4	4,4	3,4	3,4

— = não detectado; ^a monossacarídeos quantificados na forma de acetatos de alditóis; ^b abreviatura dos monossacarídeo: Ram= ramnose; Xil= xilose; Glc= glucose; Gal= galactose; Ara=arabinose; Man= manose; ^c fração incluída com fins comparativos.

Para o estudo da estrutura química fina da heteroramnana Go3r foram realizadas diferentes modificações químicas nesta fração, sendo que tais metodologias são descritas abaixo e resumidas na FIGURA 12.

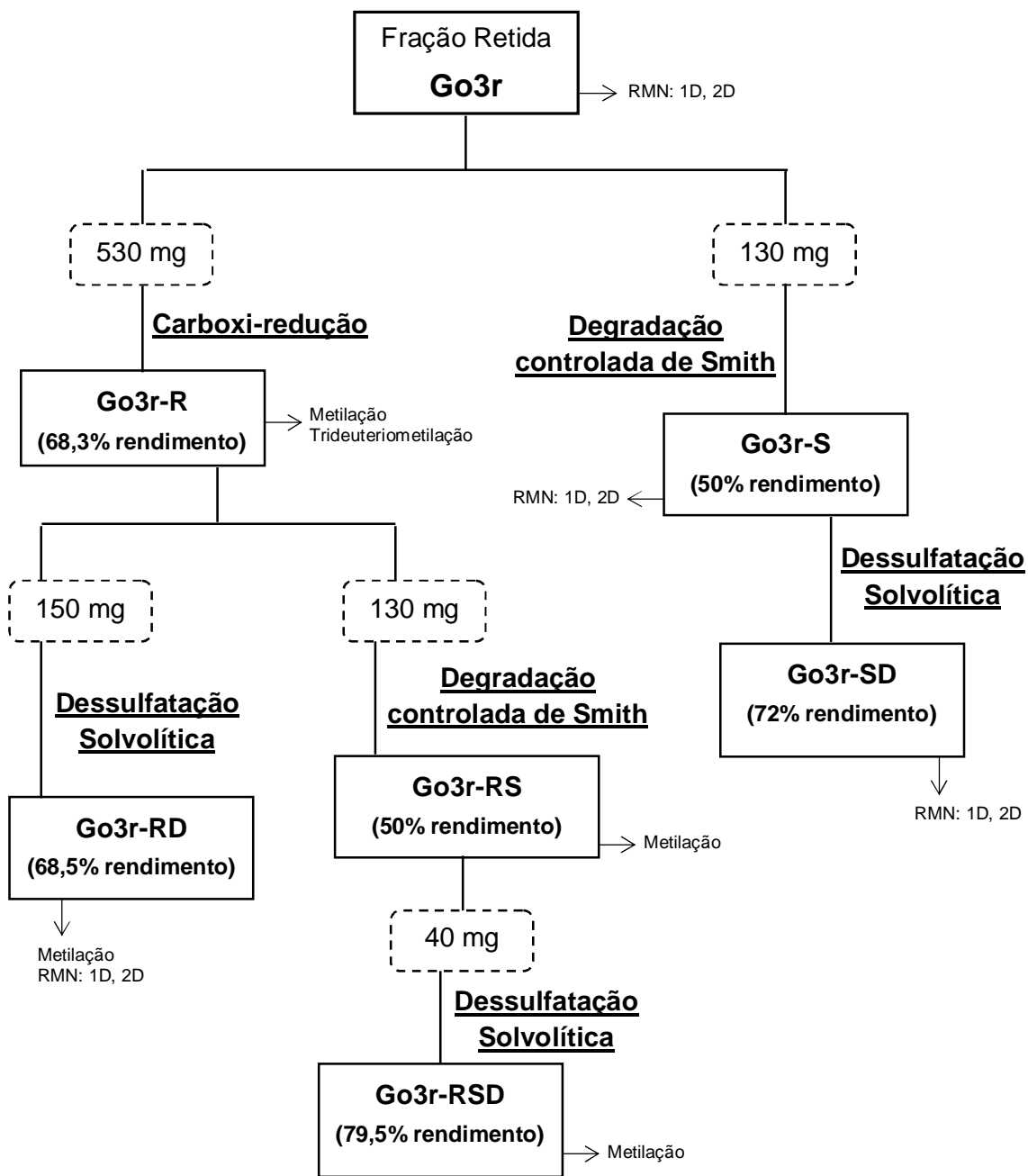


FIGURA 12 – SEQÜÊNCIAS METODOLÓGICAS UTILIZADAS PARA CARACTERIZAÇÃO DA ESTRUTURA QUÍMICA FINA DA HETERORAMNANA Go3r

4.3.3 Carboxi-Redução da Fração Go3r

A fração homogênea Go3r foi submetida ao processo de carboxi-redução na presença de NaBD₄ para identificação dos ácidos urônicos presentes na mesma. Neste processo, o ácido urônico presente no polissacarídeo nativo é convertido em seu respectivo açúcar neutro. Com o uso do NaBD₄ os monossacarídeos neutros originados a partir dos ácidos urônicos se apresentam com 2 unidades de massa a mais em C-6 quando comparados aos monossacarídeos neutros pré-existentes no polímero. Isto pode ser observado pelos perfis de fragmentação dos monossacarídeos nas análises de CLG-EM, onde são avaliadas as presenças dos íons 217 (referente a hexoses) e 219 (referente a hexoses provenientes de ácidos urônicos) (FIGURA 13).

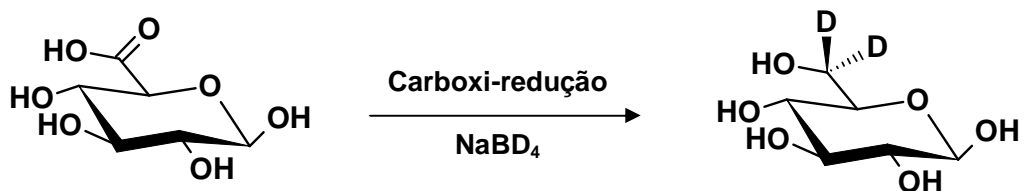
Além de promover a identificação dos ácidos urônicos presentes no polímero, a metodologia de carboxi-redução permite uma melhor análise da estrutura do polímero uma vez que esses monossacarídeos ácidos não permitem uma adequada derivatização e hidrólise do polissacarídeo que os contêm (BeMILLER, 1967).

Após uma etapa de carboxi-redução foi realizada dosagem colorimétrica dos ácidos urônicos pelo método de Filisetti-Cozzi e Carpita (1991), na qual foi possível observar uma redução de 100% no teor dessas unidades monossacarídicas, sendo recuperado 68,3% do material em relação a massa inicial de Go3r (TABELA 11).

Análise comparativa da composição monossacarídica das frações Go3r e Go3r-R (TABELA 12) demonstrou um aumento no conteúdo de galactose (1,0→3,6 mol%) e glucose (4,9→18,8 mol%). Estes resultados demonstram a presença de ácido galacturônico e ácido glucurônico, respectivamente, no polímero nativo. Análises por CLG-EM de Go3r-R demonstraram que os derivados glucitol e galactitol hexaacetato apresentaram íons com *m/z* 217 e 219. Estes fragmentos são característicos da presença de hexoses neutras e de hexoses provenientes de ácidos urônicos, respectivamente. De acordo com a porcentagem relativa destes íons, foi possível determinar que 65% e 73% do glucitol e galactitol hexaacetato foram originados a partir da carboxi-redução dos ácidos glucurônico e galacturônico, respectivamente. Deste modo a fração Go3r contém 12,2 e 2,6 mol% de ácidos

glucurônico e galacturônico, respectivamente. Ressalta-se ainda que as porcentagens de glucose e galactose (6,6 e 1,0 mol%, respectivamente) foram similares às obtidas para o polímero original (TABELA 12).

(a)



(b)

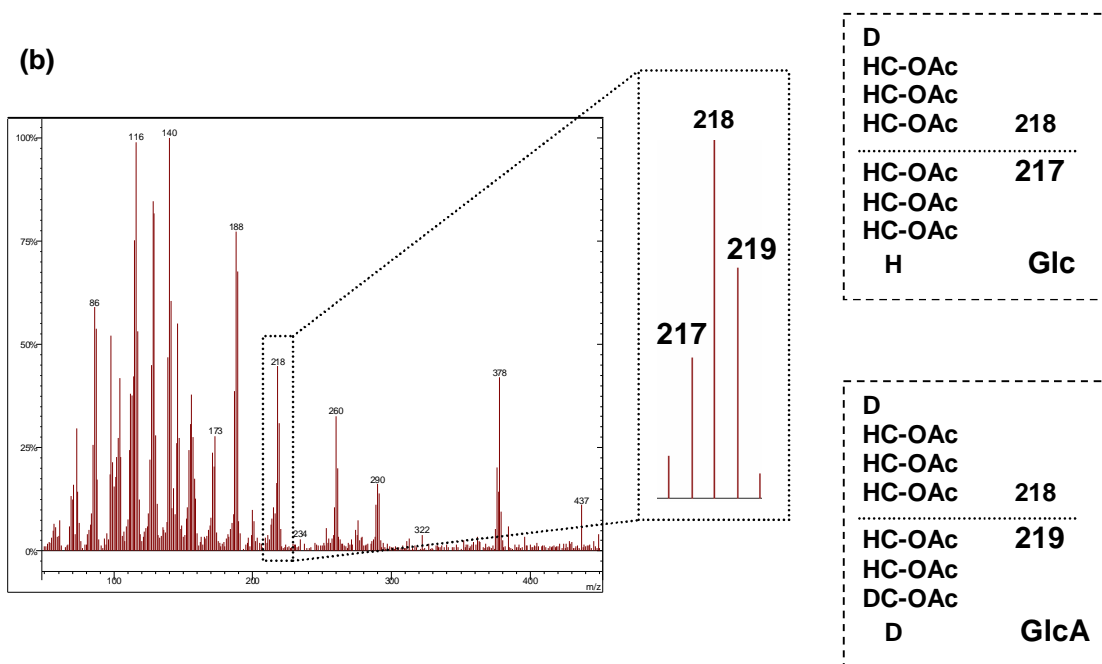


FIGURA 13 – EXEMPLO DA CARBOXI-REDUÇÃO DA AMOSTRA Go3r NA PRESENÇA DE NaBD₄: (a) FORMAÇÃO DA HEXOSE DEUTERADA; (b) FRAGMENTOS DE MASSA (CLG-EM)

TABELA 11 – RENDIMENTOS E ANÁLISES QUÍMICAS DAS FRAÇÕES Go3r-R E Go3r-RD

Frações	Rendimento (%)	Açúcar Total ^a (%)	Sulfato ^b (%)	Ácido urônico ^c (%)
Go3r ^d	70,0	49,8	25,8	19,0
Go3r-R	68,3 ^e	51,7	25,0	—
Go3r-RD	68,5 ^f	78,4	2,0	—

— = não detectado; ^a segundo DUBOIS *et al.* (1956); ^b segundo DODGSON E PRICE (1962); ^c segundo FILISETTI-COZZI e CARPITA (1991); ^d fração incluída com fins comparativos; ^e em relação ao material submetido a carboxi-redução (Go3r= 530 mg); ^f em relação ao material submetido a dessulfatação (Go3r-R= 150 mg).

TABELA 12 – MONOSSACARÍDEOS NEUTROS PRESENTES NAS FRAÇÕES Go3r-R E Go3r-RD

Frações	Monossacarídeos (mol%) ^a					
	Ram ^b	Xil	Glc	GlcA ^c	Gal	GalA ^d
Go3r ^e	77,0	17,1	4,9	n.d.	1,0	n.d.
Go3r-R	64,1	13,5	6,6	12,2	1,0	2,6
Go3r-RD	64,5	12,7	5,6	12,5	1,1	3,6

n.d. = não determinado; ^a monossacarídeos quantificados na forma de acetatos de alditóis; ^b abreviatura dos monossacarídeo: Ram= ramnose; Xil= xilose; GlcA= ácido glucurônico; Glc= glucose; GalA= ácido galacturônico; Gal= galactose; ^c quantificado como 1,6,6-trideutério glucitol hexaacetato; ^d quantificado como 1,6,6-trideutério galactitol hexaacetato; ^e fração incluída com fins comparativos;

Embora a presença de ácido glucurônico seja observada em polissacarídeos obtidos de diferentes espécies de algas verdes dos gêneros *Ulva* e *Enteromorpha* (PAINTER, 1983; LAHAYE, BRUNEL e BONNIN, 1997), não é relatada a presença de ácido galacturônico nos polissacarídeos biossintetizados por algas desses gêneros.

Com o objetivo de avaliar os tipos de ligações glicosídicas, bem como o posicionamento dos grupos sulfato, Go3r-R foi dessulfatada, originando a fração Go3r-RD, sendo que ambas foram submetidas ao processo de metilação.

4.3.4 Dessulfatação Solvolítica (Solvólise) da Fração Go3r-R

A dessulfatação solvolítica de polissacarídeos sulfatados é necessária para a determinação da posição dos grupos sulfato. As análises de metilação e de RMN do polímero carboxi-reduzido e carboxi-reduzido/dessulfatado permitem identificar a localização dos grupos sulfato no polímero original, assim como das ligações glicosídicas.

Desta forma, Go3r-R foi submetida a dessulfatação solvolítica, na forma de sal de piridínio, sendo tratada como descrito em materiais e métodos (item 3.7.2), originando a fração Go3r-RD (carboxi-reduzida/dessulfatada). Após esse processo Go3r-RD apresentou 2,0% de grupos sulfato, o que correspondeu a 92,0% de dessulfatação (TABELA 11).

A composição monossacarídica de Go3r-RD foi semelhante à de Go3r-R (TABELA 12), indicando que a dessulfatação não ocasionou degradação desta fração. Assim, o polissacarídeo parcialmente dessulfatado foi utilizado para análises de metilação e de RMN.

4.3.5 Análise de Metilação das Frações Go3r-R e Go3r-RD

As análises de metilação das frações Go3r-R e Go3r-RD foram conduzidas utilizando-se o método de Ciucanu e Kerek (1984) (item 3.8.2). Com a finalidade de se obter os polissacarídeos na forma de sal de trietilamônio, os quais são solúveis em DMSO (solvente da metilação), as referidas frações foram previamente tratadas com trietilamina 5% (item 3.8.1). Os polissacarídeos permetilados foram hidrolisados e analisados por CLG-EM.

Como pode ser observado na Tabela 13, há uma grande variedade de derivados metilados entre os produtos de hidrólise, demonstrando uma grande complexidade do polímero nativo. Embora a fração Go3r-R tenha sido submetida a três etapas seqüenciais de metilação, a proporção de ramnose não metilada (Ram) permaneceu inalterada ao longo do processo, indicando a presença de unidades 2,3,4-trissubstituídas (17,1 mol%). Além desse derivado, foram identificadas unidades de ramnose monometiladas (4-Me-Ram, 3-Me-Ram e 2-Me-Ram) e dimetiladas (2,4-Me₂-Ram e 3,4-Me₂-Ram), correspondendo a 39,5 mol% de unidades de ramnose dissubstituídas, 5,9 mol% de 3-ligadas e 4,0 mol% de unidades 2-ligadas. Xilose foi detectada principalmente como terminais não redutores (2,3,4-Me₃-Xil, 5,0 mol%) e em menores proporções como unidades 3- e 4-ligadas e 2,4- e/ou 2,3-ligadas. Adicionalmente, unidades de ácido glucurônico, reduzidos a glucose, foram identificadas como 3,4,6-Me₃-Glc, 2,3,6-Me₃-Glc e 3,6-Me₂-Glc e as unidades de ácido galacturônico, reduzidos a galactose, 3,4,6-Me₃-Gal (TABELA 13).

A fração Go3r-R (25% de sulfato) foi submetida a dessulfatação solvolítica e o correspondente polímero dessulfatado Go3r-RD (2,0% de sulfato) foi metilado. A análise comparativa dos tipos e porcentagens dos derivados metilados obtidos a partir da fração original e da dessulfatada permitiu localizar parcialmente o posicionamento de grupos sulfato na molécula original, como discutido a seguir.

Em relação às unidades de ácidos urônicos, observa-se o desaparecimento dos derivados 3,4,6-Me₃-Glc, 3,6-Me₂-Glc e um decréscimo de 3,4,6-Me₂-Gal, com concomitante aparecimento dos derivados 2,3,4,6-Me₄-Glc (5,0 mol%), 2,3,4,6-Me₄-Gal (3,8 mol%) e um aumento do derivado 2,3,6-Me₃-Glc (de 3,0 mol% para 6,8 mol%). Tais resultados demonstraram que ~80% dos ácidos urônicos presentes na fração Go3r são sulfatados em C-2, sejam eles terminais não redutores ou 4-ligados, e que ~20% desses açúcares ácidos são 4-ligados não sulfatados (TABELA 13). Além disso, ~80% do ácido galacturônico também é sulfatado em C-2. Ácidos urônicos sulfatados em C-2 não haviam sido relatados em polissacarídeos de algas verdes.

TABELA 13 – ANÁLISE DE METILAÇÃO DAS FRAÇÕES Go3r-R E Go3r-RD

Derivado ^a	Ligação	Tr ^b	Frações	
			Go3r-R	Go3r-RD
2,3,4-Me ₃ -Ram ^c	Ramp-(1→	7:37	—	—
3,4-Me ₂ -Ram	→2)-Ramp-(1→	9:02	4,0	15,0
2,4-Me ₂ -Ram	→3)-Ramp-(1→	9:30	5,9	35,0
2-Me-Ram	→3,4)-Ramp-(1→	10:90	11,3	1,0
4-Me-Ram	→2,3)-Ramp-(1→	11:32	19,1	13,5
3-Me-Ram	→2,4)-Ramp-(1→	11:79	9,1	1,0
Ram	→2,3,4)-Ramp-(1→	12:47	17,1	1,0
2,3,4-Me ₃ -Xil	Xilp-(1→	7:97	5,0	5,0
2,4-Me ₂ -Xil	→3)-Xilp-(1→	9:83	2,0	2,0
2,3-Me ₂ -Xil	→4)-Xilp-(1→	10:30	3,5	3,9
2/3-Me-Xil	→3,4/2,4)-Xilp-(1→	13:38	1,1	1,0
2,3,4,6-Glc ^d	Glc pA-(1→	9:45	—	5,0
3,4,6-Me ₃ -Glc	→2)-Glc pA-(1→	12:23	5,0	—
2,3,6-Me ₃ -Glc	→4)-Glc pA-(1→	13:49	3,0	6,8
3,6-Me ₂ -Glc	→2,4)-Glc pA-(1→	17:43	4,5	—
2,3,6-Me ₃ -Glc	→4)-Glc p-(1→	13:49	4,0	4,0
2,3,4,6-Me ₄ -Gal ^d	Gal pA-(1→	10:01	—	3,8
3,4,6-Me ₃ -Gal	→2)-Gal pA-(1→	13:21	4,4	1,0
2,3,4,6-Me ₄ -Gal	Gal p-(1→	10:01	1,0	1,0

— = não detectado; / = e/ou; ^a mol% dos monossacarídeos quantificados na forma de alditóis acetato parcialmente metilados; ^b tempo de retenção (em min) dos derivados analisados em coluna DB-225; ^c 2,3,4-Ram analisada como: 1,5-di-O-acetil-2,3,4-O-metilramnitol, etc.; ^d derivados carboxi-reduzidos analisados como os exemplos: 2,3,4,6-GlcA = 1,5-di-O-acetil-(1,6,6-trideutério)-2,3,4,6-O-metil glucitol; 2,3,4,6-GalA = 1,5-di-O-acetil-(1,6,6-trideutério)-2,3,4,6-O-metil galactitol, etc.

Os derivados metilados obtidos a partir da xilose não sofreram alteração após o processo de dessulfatação da fração Go3r-R, demonstrando assim que tais unidades não são substituídas por grupamentos sulfato. De modo diferente, nas ulvanas unidades de xilose 4-ligadas podem estar sulfatadas em C-2 (LAHAYE, 1998).

Após dessulfatação, os principais derivados metilados foram 2,4-Me₂-Ram (35,0 mol%), 3,4-Me₂-Ram (15,0 mol%) e 4-Me-Ram (13,5 mol%), os quais correspondem a unidades de ramnose 3-ligada, 2-ligada e 2,3-dissubstituída, respectivamente. A presença de 13,5 mol% de unidades dissubstituídas (4-Me-Ram) está de acordo com a porcentagem de terminais não redutores (14,8 mol%) e indicam que a heteroramnana Go3r apresenta ~20% de pontos de ramificação em sua estrutura (TABELA 13).

Após dessulfatação, o aumento dos derivados 2,4-Me₂-Ram e 3,4-Me₂-Ram, juntamente com o decréscimo dos derivados 2-Me-Ram e 3-Me-Ram, demonstraram que o polissacarídeo original (Go3r) contém unidades de ramnose 3- e 2-ligadas, ambas sulfatadas em C-4 (10,3 e 8,1 mol%, respectivamente). O aumento de tais derivados metilados (2,4-Me₂-Ram e 3,4-Me₂-Ram) indica ainda que a heteroramnana poderia ser formada por unidades 3-ligadas sulfatadas em C-2 e/ou C-2,C-4 (18,8 mol%), além de unidades 2-ligadas sulfatadas em C-3 e/ou C-3,C-4 (2,9 mol%). Desta forma, para complementar os resultados obtidos até o momento, a fração Go3r-R foi sequencialmente metilada, dessulfatada e trideuteriometilada, como descrito a seguir.

4.3.5.1 Trideuteriometilação da fração Go3r-R

Considerando o exposto no item anterior (4.3.5), a fração Go3r-R foi submetida sequencialmente a estratégia descrita abaixo e representada na Figura 14:

- 1 metilação com ICH_3 – às hidroxilas livres são ligados grupos CH_3 (Me)
- 2 dessulfatação solvolítica – remoção dos grupos sulfato
- 3 metilação com ICD_3 – às hidroxilas livres, formadas após dessulfatação, são ligados grupos CD_3

Através da análise de CLG-EM da fração submetida a trideuteriometilação verificou-se que o derivado 4-Ram apresentava fragmentos de massa que indicaram a presença de CH_3 (m/z 131) e CD_3 (m/z 134) em C-4, nas proporções de 0,88:1,00, respectivamente. Desta maneira, a partir da porcentagem do derivado 4-Ram presente na fração Go3r-RD (13,5 mol%, TABELA 13, p. 97), foi possível determinar que 6,3 mol% das unidades 2,3-dissubstituídas não contêm grupos sulfato, enquanto que 7,2 mol% das mesmas apresentam-se C-4 sulfatadas (TABELA 14).

O derivado 2,4-Ram continha fragmentos de massa que caracterizaram a presença de grupos CH_3 (m/z 234) e CD_3 (m/z 240) nos carbonos C-2 e C-4 (2,4-Me e 2,4- CD_3 -Ram, respectivamente). Adicionalmente, o fragmento de m/z 237, correspondente a presença de CD_3 em C-2 (CH_3 em C-4) e/ou CD_3 em C-4 (CH_3 em C-2), foi observado. A razão entre tais íons foi calculada, obtendo-se os valores de 0,26:0,21:1,00, respectivamente. A partir desses dados foi possível concluir que, dos 35,0 mol% de 2,4- Me_2 -Ram (ramnose 3-ligada) presentes entre os produtos de metilação de Go3r-RD (TABELA 13, p. 97), 6,2 mol% correspondem a ramnose 3-ligada não sulfatada, 5,0 mol% sulfatada em C-2 e C-4, 13,5 mol% sulfatada em C-2 e 10,3 mol% sulfatada em C-4 (TABELA 14).

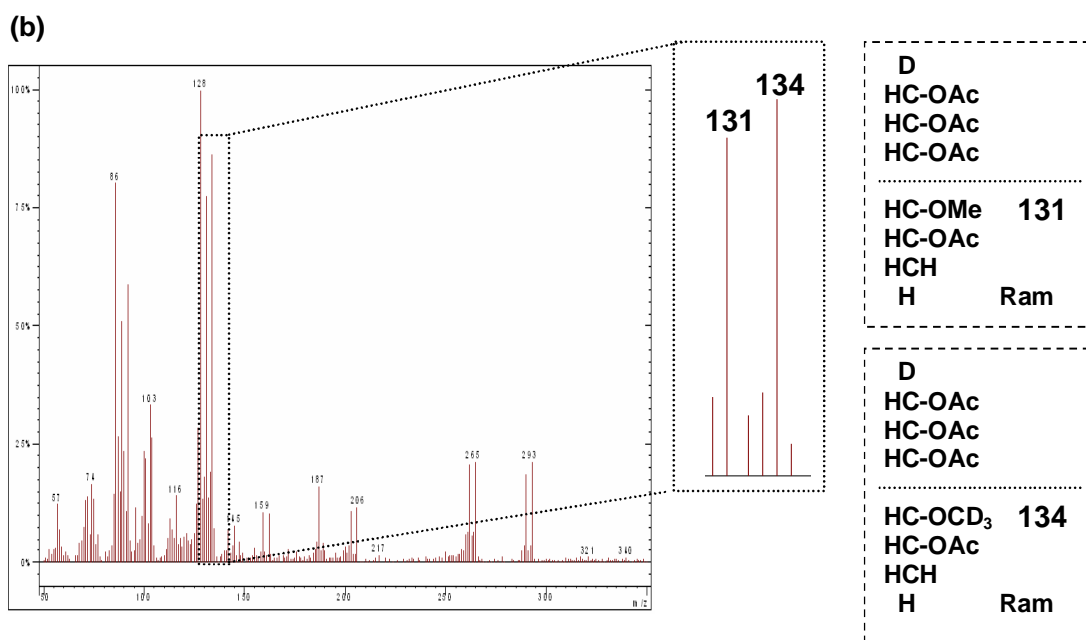
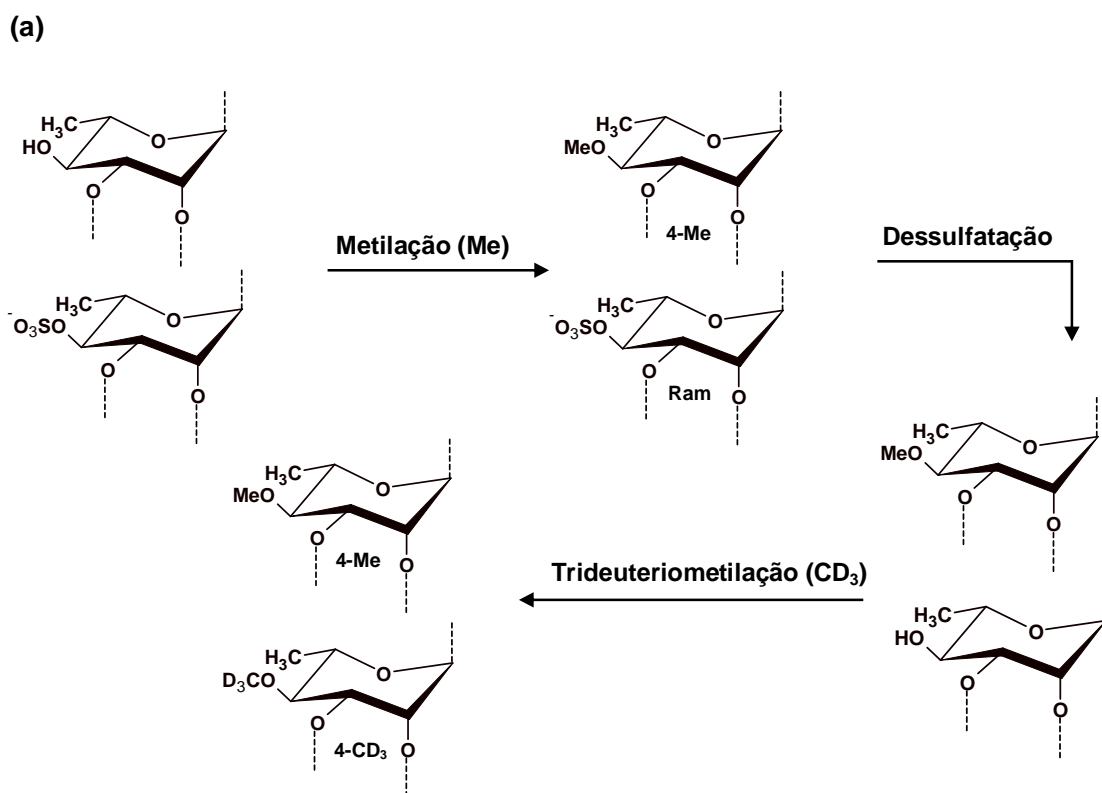


FIGURA 14 – EXEMPLO DO PROCESSO DE TRIDEUTERIOMETILAÇÃO DE Go3r-R: (a) SEQÜÊNCIA METODOLÓGICA; (b) FRAGMENTO DE MASSA (CLG-EM) – UTILIZANDO COMO EXEMPLO 4-RAM (4-Me E 4-CD₃)

TABELA 14 – ANÁLISES DOS DERIVADOS DE RAMNOSE OBTIDOS APÓS TRIDEUTERIOMETILAÇÃO DA FRAÇÃO Go3r-R

Derivado ^a	Composto por ^b	Unidades correspondentes ^c	Mol%	Fragmentos de massa (<i>m/z</i>) ^d
4-Ram	4-Me-Ram	2L3R / 3L2R	6,4	131, 203, 262, 290
	4-CD ₃ -Ram	2L3R4S / 3L2R4S	7,1	134, 206, 265, 293
2,4-Ram	2,4-Me-Ram	3L	6,2	118, 131, 187, 234, 262
	2,4-CD ₃ -Ram	3L2,4S	5,0	121, 134, 193, 240, 268
	2-CD ₃ 4-Me-Ram	3L2S	13,4	121, 134, 190, 237, 265
	2-Me 4-CD ₃ -Ram	3L4S	10,3	118, 131, 190, 237, 265
3,4-Ram	3,4-Me-Ram	2L	3,6	115, 130, 131, 190, 262
	3,4-CD ₃ -Ram	2L3,4S	3,3	121, 133, 134, 193, 268
	3-Me 4-CD ₃ -Ram	2L4S	8,1	118, 130, 134, 190, 265

/ = e/ou; ^a monossacarídeos metilados contendo grupos metil na posição indicada; ^b Me = metil, CD₃ = trideuteriometil; ^c L, R, S correspondem a ligação glicosídica, ramificação e sulfatação na posição indicada, respectivamente; ^d Fragmentos observados nos alditóis acetatos parcialmente trideuteriometilados.

O derivado 3,4-Ram apresentou fragmentos com *m/z* 130 e 133, indicando a presença tanto de grupos CH₃, quanto de grupos CD₃ em C-3, respectivamente. Esse derivado continha ainda fragmentos com *m/z* 131 e 134, os quais são indicativos de grupos CH₃ e CD₃ em C-4, respectivamente. Os fragmentos com *m/z* 131 poderiam corresponder a unidades de ramnose 2-ligadas, bem como a unidades de ramnose 2-ligadas 3-sulfatadas. Por sua vez, o fragmento com *m/z* 134 corresponderia a unidades de ramnose 2-ligada 4-sulfatada e a unidades de ramnose 2-ligada 3,4-sulfatadas (TABELA 14). As porcentagens relativas dos íons com *m/z* de 131 e 134 foram calculadas e obtiveram-se valores de 23,7% e 76,3%, respectivamente. Deste modo, dos 15 mol% do derivado 3,4-Me₂-Ram (presentes entre os produtos de metilação de Go3r-RD; TABELA 13, p. 97), 3,6 mol% foram atribuídos apenas a unidades 2-ligadas, desde que esse valor está de acordo com a porcentagem obtida na metilação da fração Go3r-R (4,0 mol%; TABELA 13, p. 97). Ainda, como previamente determinado, Go3r-R contém 8,1 mol% de ramnose 2-

ligada 4-sulfato e assim, dos 15 mol% de 3,4-Me₂-Ram (TABELA 13, p. 97), 3,3 mol% foram originados a partir de unidades de ramnose 2-ligada 3,4-sulfatadas (TABELA 14).

Considerando que o derivado 4-Me-Ram detectado entre os produtos de metilação de Go3r-R (19,1 mol%; TABELA 13, p. 97) corresponde tanto a unidades de ramnose 2,3-dissubstituídas (6,4 mol%; TABELA 14), quanto a ramnose 3-ligada 2-sulfato (13,4 mol%; TABELA 14), foi possível determinar que unidades de ramnose 2-ligadas 3-sulfatadas não estão presentes na heteroramnana em estudo.

A partir dos dados de metilação e trideuteriometilação foi possível concluir que a fração polissacarídica Go3r, isolada de *G. oxysperma*, é uma heteroramnana ramificada e sulfatada, contendo unidades de ramnose 2,3-dissubstituídas, 3- e 2-ligadas na proporção molar de 0,38:1,00:0,43, respectivamente, apresentando um ponto de ramificação a cada cinco unidades de ramnose. Tanto as unidades 2-ligadas quanto as 3-ligadas encontram-se principalmente sulfatadas em C-4 (37%) e dissulfatadas (17%). Adicionalmente, as unidades 3-ligadas são sulfatadas em C-2 (27%) e cerca de 50% das unidades 2,3-dissubstituídas são sulfatadas em C-4.

O variado padrão de sulfatação da heteroramnana Go3r torna-se mais complexo pela presença de terminais não redutores de ácidos glucurônico e galacturônico sulfatados em C-2, além de ácido glucurônico 4-ligado 2-sulfatado.

A estrutura identificada para a heteroramnana de *G. oxysperma* difere das estruturas reportadas para os polissacarídeos de outras algas verdes. As ulvanas, polissacarídeos isolados de algas do gênero *Ulva*, são constituídas principalmente pelo dissacarídeo denominado ácido ulvanobiurônico 3-sulfato A [\rightarrow 4)- β -D-GlcAp-(1 \rightarrow 4)- α -L-Ramp 3-sulfato-(1 \rightarrow)] (TABELA 2, p. 36). Adicionalmente, há unidades de ácido glucurônico como terminais não redutores, ligados ao C-2 das unidades de ramnose 3-sulfato, além de unidades de xilose 4-ligadas, sulfatadas ou não em C-2. Com estrutura similar, os polissacarídeos obtidos de *Enteromorpha compressa* também contêm em sua estrutura ramnose 3-sulfato, ácido glucurônico e xilose, sendo os mesmos, a exemplo dos polímeros obtidos do gênero *Ulva*, denominados ulvanas (RAY, 2006).

De modo diferente, as ramnanas sulfatadas biossintetizadas por algas do gênero *Monostroma* são pouco investigadas sob o aspecto estrutural, sendo descrito a presença de unidades de ramnose 2- e 3-ligadas, podendo estar sulfatadas em C-3 ou C-4 (*M. latissimum*) e C-2 (*M. nitidum*), respectivamente.

Esses dados demonstram que a heteroramnana sulfatada biossintetizada pela clorófito *G. oxysperma* apresenta padrões de ligação glicosídica e sulfatação diferentes dos obtidos para algas pertencentes aos gêneros *Ulva*, *Enteromorpha* e *Monostroma*.

4.3.6 Degradação Controlada de Smith e Dessulfatação Solvolítica dos Produtos

Com o objetivo de se obter maiores informações sobre a estrutura química da heteroramnana em estudo, as frações Go3r e Go3r-R foram submetidas a degradação controlada de Smith, dando origem aos produtos degradados de Smith, os quais foram denominados com o acréscimo da letra “S” ao nome original da fração (Go3r-S e Go3r-RS, respectivamente). O rendimento após degradação de Smith foi de 50% para ambas as frações (TABELA 15). Tais frações foram posteriormente submetidas a dessulfatação solvolítica, originando as frações Go3r-SD e Go3r-RSD, com rendimentos de 72% e 79,5%, respectivamente (TABELA 15).

Após degradação de Smith a fração Go3r-RS, em relação a fração Go3r-R, apresentou um aumento significativo nos teores de ramnose (64,1→91,4 mol%), diminuição nos teores de xilose (13,5→3,0 mol%), de glucose (18,8→5,6 mol%) e galactose (3,6→0 mol%). Ressalta-se que o processo de degradação controlada de Smith foi conduzido com a heteroramnana previamente carboxi-reduzida (na presença de NaBD₄) e que os teores de glucose e galactose acima referidos correspondem tanto as hexoses neutras como aos ácidos urônicos presentes no polímero nativo. Portanto, o processo de degradação controlada de Smith ocasionou a oxidação parcial das unidades de xilose, glucose e ácido glucurônico e de maneira total removeu unidades de galactose e ácido galacturônico. Após oxidação com periodato de sódio o produto Go3r-RS apresentou-se enriquecido com ramnose,

sendo altamente sulfatado e ainda contendo ácido glucurônico (TABELA 15). Esses dados estão de acordo com os resultados de metilação da fração Go3r-R (TABELA 13, p. 97) onde a maioria das unidades de ramnose, bem como o ácido glucurônico 4-ligado 2-sulfatado e xilose 3-ligada, não seriam susceptíveis a oxidação com periodato. Por outro lado, houve remoção das unidades correspondentes aos terminais não redutores de xilose, galactose, ácido glucurônico 2-sulfato e ácido galacturônico 2-sulfato, assim como das demais unidades susceptíveis a oxidação com periodato (ramnose 2-ligada, xilose 4-ligada, ácido glucurônico e glucose, ambos 4-ligados).

O produto de degradação controlada de Smith (Go3r-S) obtido a partir da heteroramnana nativa (Go3r) apresentou resultados similares aos descritos para a fração Go3r-RS, ou seja, oxidação significativa das unidades de xilose, glucose e ácidos urônicos, oxidação total da galactose e enriquecimentos nos teores de ramnose (77,0→94,0 mol%; TABELA 15).

Quando se comparam as frações degradadas de Smith com as frações nativa (Go3r) e carboxi-reduzida (Go3r-R), nota-se um aumento nos teores de ramnose, com conseqüente redução nas porcentagens dos demais açúcares. Além disso, as frações degradadas são semelhantes em suas composições químicas e monossacarídicas, demonstrando assim que o processo de degradação controlada de Smith foi similar para ambos os polímeros. Ainda, o aumento de glucose na fração Go3r-RS é proporcional aos teores de ácidos urônicos dosados na fração Go3r-S, confirmando a presença de ácido glucurônico nesta última, o que está de acordo com a existência de ácido glucurônico 4-ligado 2-sulfatado no polímero nativo, o qual não é susceptível a degradação controlada de Smith (TABELA 13, p. 97).

Os produtos de degradação de Smith Go3r-S e Go3r-RS foram submetidos a dessulfatação solvolítica, sendo os respectivos produtos dessulfatados denominados Go3r-SD e Go3r-RSD. Essas frações contêm 3,0% de grupos sulfato, o que equivale a ~88% de dessulfatação para ambos (TABELA 15). A composição monossacarídica das frações dessulfatadas apresentaram composição monossacarídica semelhante aquela obtida para os polímeros originais (Go3r-S e Go3r-RS), indicando assim que não houve degradação de tais frações durante a solvólise (TABELA 15).

TABELA 15 – RENDIMENTOS, ANÁLISES QUÍMICAS E MONOSSACARÍDEOS NEUTROS DAS FRAÇÕES Go3r-S, Go3r-SD, Go3r-RS E Go3r-RSD

Frações	Rendimento (%)	Açúcar Total ^b (%)	Sulfato ^c (%)	Ácido urônico ^d (%)	Monossacarídeos (mol%) ^a					
					Ram ^e	Xil	Glc	GlcA ^f	Gal	GalA
Go3r ^g	70,0	49,8	25,8	19,0	77,0	17,1	4,9	n.d.	1,0	n.d.
Go3r-S	50,0 ^h	54,0	26,0	4,0	94,0	3,5	2,5	n.d.	—	n.d.
Go3r-SD	72,0 ⁱ	55,0	3,0	n.d.	95,0	3,0	2,0	n.d.	—	n.d.
Go3r-R ^g	68,3	51,7	25,0	—	64,1	13,5	6,6	12,2	1,0	2,6
Go3r-RS	50,0 ^h	52,7	26,1	—	91,4	3,0	1,8	3,8	—	—
Go3r-RSD	79,5 ⁱ	79,9	3,0	—	91,7	2,9	2,0	3,4	—	—

— = não detectado; n.d. = não determinado; ^a monossacarídeos quantificados na forma de acetatos de alditóis, ^b segundo DUBOIS *et al.* (1956); ^c segundo DODGSON E PRICE (1962); ^d segundo FILISETTI-COZZI e CARPITA (1991); ^e abreviatura dos monossacarídeo: Ram= ramnose; Xil= xilose; Glc= glucose; Gal= galactose; ^f quantificado como 1,6,6-trideutério glucitol hexaacetato; ^g frações incluídas com fins comparativos; ^h em relação ao material submetido a degradação controlada de Smith (Go3r e Go3r-R= 130 mg); ⁱ em relação ao material submetido a dessulfatação (Go3r-S= 50 mg; Go3r-RS= 40 mg).

4.3.7 Análise de Homogeneidade do Produto de Degradação Controlada de Smith Go3r-S

A fração Go3r-S foi submetida a análise por HPSEC-MALLS-IR, originando um cromatograma homogêneo em relação a massa molecular, sendo o resultado obtido a partir do detector RI comparado com o cromatograma da fração Go3r e apresentado na FIGURA 15. Assim, esta amostra teve sua massa molecular ponderal média analisada, a qual foi de 109 kDA (dn/dc 0,251). O decréscimo de ~14 vezes na massa molecular de Go3r após degradação controlada de Smith sugere que a heteroramnana contém cadeias susceptíveis a oxidação com periodato, como verificado durante análises químicas e de composição monossacarídica de Go3r-S (TABELA 15, p. 105), e que essas estruturas estão distribuídas regularmente ao longo da cadeia polissacarídica.

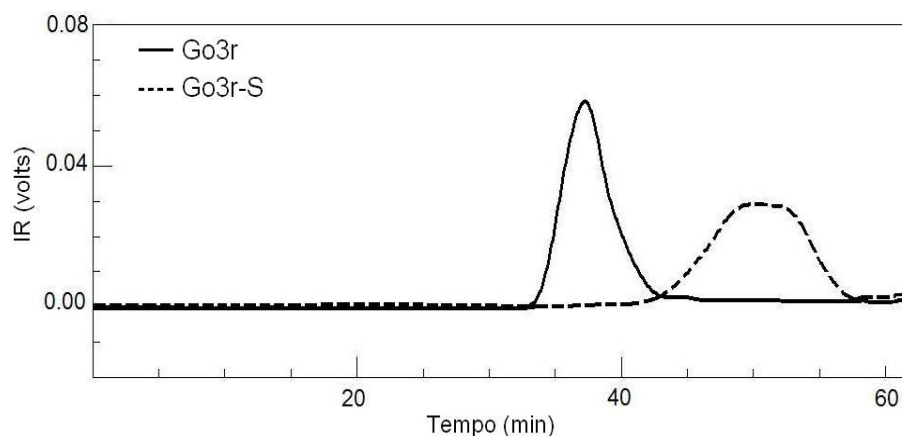


FIGURA 15 – PERFIL DE ELUIÇÃO EM HPSEC COM DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO DAS FRAÇÕES Go3r E Go3r-S

4.3.8 Análise de Metilação das Frações Go3r-RS e Go3r-RSD

As frações Go3r-RS (carboxi-reduzida submetida a degradação controlada de Smith) e Go3r-RSD (carboxi-reduzida/degradada de Smith e dessulfatada) foram submetidas ao processo de metilação e os resultados são apresentados na TABELA 16.

Os dados de metilação da fração Go3r-RS mostram que houve remoção dos terminais não redutores (xilose, ácidos urônicos e galactose) presentes no polímero nativo, assim como de outras unidades susceptíveis a oxidação com periodato: ramnose 2-ligada, xilose, glucose e ácido glucurônico todos 4-ligados (TABELA 13, p. 97). A permanência do derivado 3,6-Me₂-Glc (proveniente do ácido glucurônico carboxi-reduzido) no polímero Go3r-RS sugere que a heteroramnana possui, em sua cadeia principal, unidades de ácido glucurônico 4-ligado 2-sulfato (TABELA 16).

A presença de 5,0 mol% do derivado 4-Me-Ram entre os produtos de metilação de Go3r-RSD demonstra que o polímero degradado ainda permaneceu ramificado. Teores semelhantes de terminais não redutores de ramnose (3,1 e 2,9 mol%, Go3r-RS e Go3r-RSD, respectivamente) foram observados, o que está de acordo com a presença de pontos de ramificação nos produtos de degradação controlada de Smith. Deste modo, considerando a porcentagem de unidades de ramnose 2,3-dissubstituídas presentes na fração Go3r-RSD (5,0 mol%), o produto de degradação controlada de Smith apresenta um ponto de ramificação a cada dezenove unidades de ramnose (19:1). Esta relação é diferente da calculada para o polímero carboxi-reduzido Go3r-R, que foi de 5:1 (item 4.3.5), o que novamente indica perda de pontos de ramificação no processo de degradação controlada de Smith. Ressalta-se que, embora as características estruturais das ramificações presentes na heteroramnana em estudo tenham sido parcialmente esclarecidas, a presença de terminais não redutores de ramnose no polímero degradado de Smith demonstra que, adicionalmente, tais ramificações contêm unidades de ramnose.

TABELA 16 – ANÁLISE DE METILAÇÃO DAS FRAÇÕES Go3r-RS E Go3r-RSD

Derivado ^a	Ligação	Tr ^b	Frações	
			Go3r-RS	Go3r-RSD
2,3,4-Me ₃ -Ram ^c	Ramp-(1→	7:37	3,1	2,9
2,4-Me ₂ -Ram	→3)-Ramp-(1→	9:02	15,2	50,0
3,4-Me ₂ -Ram	→2)-Ramp-(1→	9:30	1,1	33,1
2-Me-Ram	→3,4)-Ramp-(1→	10:90	17,3	1,0
3-Me-Ram	→2,4)-Ramp-(1→	11:32	15,6	2,0
4-Me-Ram	→2,3)-Ramp-(1→	11:79	19,7	5,0
Ram	→2,3,4)-Ramp-(1→	12:47	20,4	—
2,3,4-Me ₃ -Xil	Xilp-(1→	7:97	—	—
2,4-Me ₂ -Xil	→3)-Xilp-(1→	9:83	3,2	2,0
2,3-Me ₂ -Xil	→4)-Xilp-(1→	10:30	—	—
2/3-Me-Xil	→3,4/2,4)-Xilp-(1→	13:38	—	—
2,3,4,6-Me ₄ -Glc ^d	Glc pA-(1→	9:45	—	—
3,4,6-Me ₃ -Glc	→2)-Glc pA-(1→	12:23	—	—
2,3,6-Me ₃ -Glc	→4)-Glc pA-(1→	13:49	—	4,0
3,6-Me ₂ -Glc	→2,4)-Glc pA-(1→	17:43	4,0	—
2,3,6-Me ₃ -Glc	→4)-Glc p-(1→	13:49	—	—
2,3,4,6-Me ₄ -Gal ^d	Gal pA-(1→	10:01	—	—
3,4,6-Me ₃ -Gal	→2)-Gal pA-(1→	13:21	—	—
2,3,4,6-Me ₄ -Gal	Gal p-(1→	10:01	—	—

— = não detectado; / = e/ou; ^a mol% dos monossacarídeos quantificados na forma de alditóis acetato parcialmente metilados; ^b tempo de retenção (em min) dos derivados analisados em coluna DB-225; ^c 2,3,4-Ram analisada como 1,5-di-O-acetil-2,3,4-O-metilramnitol, etc.; ^d derivados carboxi-reduzidos analisados como os exemplos: 2,3,4,6-GlcA = 1,5-di-O-acetil-(1,6,6-trideutério)-2,3,4,6-O-metil glucitol; 2,3,4,6-GalA = 1,5-di-O-acetil-(1,6,6-trideutério)-2,3,4,6-O-metil galactitol, etc.

A análise de metilação de Go3r-RSD mostrou que as unidades de ramnose 2,3-substituídas:3-ligadas:2-ligadas apresentavam uma relação de 0,10:1,00:0,66, respectivamente. Quando se compara esses resultados com os obtidos pela análise de metilação do polímero carboxi-reduzido/dessulfatado (Go3r-RD = 0,38:1,00:0,43, respectivamente) (item 4.3.5.1; TABELA 13, p. 97), nota-se que, no polímero Go3r-RSD, houve um aumento das unidades de ramnose 2-ligadas (de 0,43 para 0,66) com concomitante redução das unidades 2,3-dissubstituídas (de 0,38 para 0,10). Desta forma, esses resultados indicaram que, pelo menos parte, os pontos de ramificação presentes na heteroramnana de *G. oxysperma* poderiam estar localizados no C-3 das unidades de ramnose 2-ligadas.

4.3.9 Análises de RMN das Frações Go3r, Go3r-RD, Go3r-S Go3r-SD

As análises de RMN mono e bidimensionais foram conduzidas com as frações Go3r e Go3r-RD, e com os produtos da degradação de Smith Go3r-S e Go3r-SD. Nessas frações os espectros de ^1H e ^{13}C foram parcialmente assinalados utilizando os experimentos de COSY, TOCSY e HMQC. As referências utilizadas para comparação com os assinalamentos realizados foram de ramnanas não sulfatadas (BOCK, PEDERSEN e PEDERSEN, 1990; KNIREL *et al.*, 1998a,b; SENCHENKOVA *et al.*, 1999; OVOD *et al.*, 2004), os quais foram complementados com os deslocamentos químicos considerando os efeitos α e β da sulfatação (LAHAYE e RAY, 1996; LAHAYE, BRUNEL e BONNIN, 1997; LAHAYE, INIZAN e VIGOUROUX, 1998).

Assim como observado nas frações brutas, a fração Go3r apresentou um espectro de RMN de ^{13}C complexo, com sinais alargados, o que está de acordo com o padrão heterogêneo de glicosilação e sulfatação das unidades de ramnose, além da presença de outras unidades monossacarídicas, tais como xilose e ácidos urônicos (TABELA 13, p. 97). Adicionalmente, a presença de pontos de ramificação sulfatados e não sulfatados no polissacarídeo pode resultar em um espectro com elevado grau de sobreposições. De acordo com a complexa estrutura da heteroramnana em estudo, os espectros de RMN de ^{13}C das frações Go3r e Go3r

(FIGURA 16a,b) continham vários sinais na região anomérica, sendo que os sinais em $\delta \sim 105,0$ foram atribuídos a unidades monossacarídicas na configuração beta e aqueles entre $\delta 98-103$, foram principalmente assinalados como pertencentes as unidades de α -ramnose.

Na Figura 16 observa-se que todos os espectros apresentam sinais de alta intensidade na região de $\delta 17,9$, $\delta 18,0$ e $\delta 18,2$, correspondentes ao C-6 das unidades de ramnose, de acordo com a elevada porcentagem de 6-deoxiaçúcar nessas frações (TABELA 12, p. 94). Após carboxi-redução houve o desaparecimento do sinal em $\delta 175,5$, correspondente aos grupos carboxílicos dos ácidos urônicos, seguido do aumento dos sinais referentes ao C-6 livre de hexoses ($\delta 61,7$), o que está de acordo com a conversão dos ácidos urônicos aos seus respectivos açúcares neutros.

A configuração α -anomérica das unidades de ramnose foram determinadas a partir dos deslocamentos químicos correspondentes ao H-5 em $\delta 3,76-3,88$ e ao C-5 em $\delta 70,6$ (FIGURAS 16 e 17), sendo que nas unidades de ramnose β -anoméricas os deslocamentos de tais átomos encontram-se em $\delta 3,39$ e $\delta 72,3-73,4$, respectivamente (BACKINOWSKY *et al.*, 1980; LIPKIND *et al.*, 1988; JANSSON, KENNE e WIDMALM, 1989).

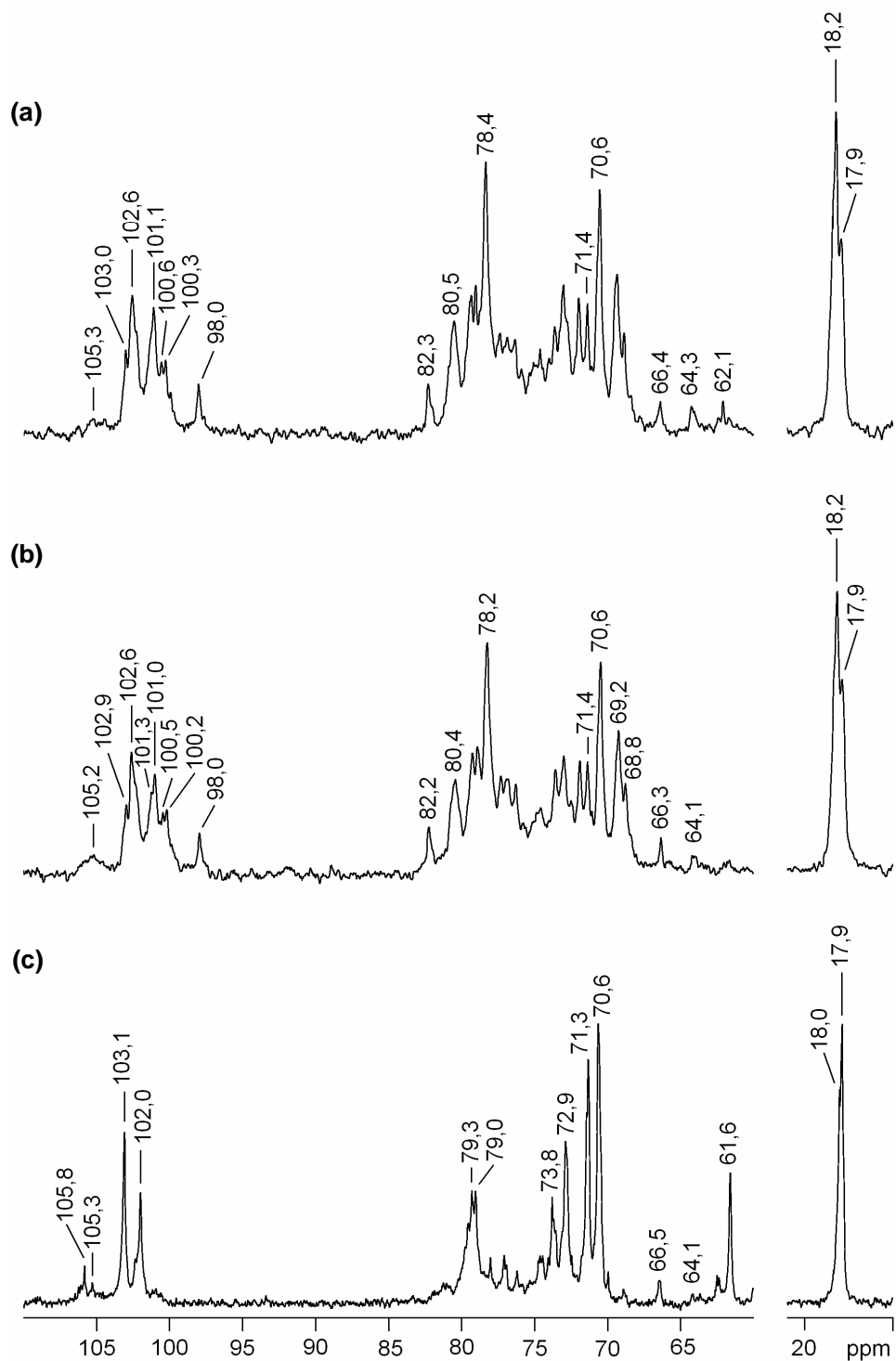


FIGURA 16 – ESPECTROS DE RMN DE ^{13}C DAS FRAÇÕES Go3 (a), Go3r (b) E Go3r-RD (c)

Solvente: D_2O (70 °C); acetona como padrão interno (δ 31,45).

Os assinalamentos correspondentes ao ácido glucurônico e a xilose foram de difícil identificação, devido a baixa quantidade desses monossacarídeos em relação a ramnose (TABELA 13, p. 97), a heterogeneidade do padrão de substituição e a sobreposição de sinais existente nos espectros de RMN (FIGURA 16). Entretanto, o sinal de baixa intensidade em $\delta \sim 105,2$ presente no ^{13}C de Go3r (FIGURA 16b) foi assinalado como C-1 de unidades beta, e poderia corresponder a terminais não redutores de β -D-xilose, baseado na ressonância dos correspondentes metil glicosídeos, que apresentam deslocamento do C-1 em $\delta 105,1$ (GORIN e MAZUREK, 1975). Além disso, tal deslocamento poderia se referir às unidades de β -D-xilose 4-ligada e β -D-ácido glucurônico, os quais têm deslocamento na região de $\delta 104,4\text{--}104,8$ nos espectros de ulvanas (LAHAYE, BRUNEL e BONNIN, 1997). Adicionalmente, através da análise de HMQC de Go3r verificou-se que o sinal em $\delta 102,6$ apresentava correlação com seu próton geminal em $\delta 4,79$, os quais poderiam corresponder a unidades de β -D-ácido glucurônico 2-sulfato. Esses deslocamentos químicos são similares aos deslocamentos descritos para unidades de ácido glucurônico 4-ligado 2-ramificado (C1/H1 = $\delta 102,9/4,66$; ROGER *et al.*, 2004) e ácido glucurônico 4-ligado 2-sulfatado ($\delta 102,8/4,74$; CASU *et al.*, 1994). A ausência de tal acoplamento no espectro de HMQC da fração Go3r-RD, associado ao aumento dos sinais na região de $\delta 105,3\text{--}105,8$, estão de acordo com o efeito β (+2,7–3,2 ppm) que a sulfatação em C-2 exerce sobre o C-1 das unidades sulfatadas. Deslocamentos semelhantes foram obtidos por outros autores quando compararam os sinais referentes aos acoplamentos entre C1/H1 de unidades de β -D-ácido glucurônico 4-ligado com unidades 4-ligadas 2-sulfatadas (efeito β de +1,2–2,7 ppm) (CASU *et al.*, 1994; KOVENSKI e CIRELLI, 1997).

A fração nativa (Go3r) e seu produto de degradação controlada de Smith (Go3r-S) apresentaram RMN de ^1H qualitativamente similares, com sinais atribuídos às unidades de α -ramnose na região de $\delta 5,03$ a $5,79$ (FIGURA 18a,c, p. 116). Os espectros de RMN de ^{13}C das frações acima citadas continham um grande número de sinais na região anomérica, com deslocamentos químicos na região de $\delta 98,0\text{--}102,9$ (Go3r) e $\delta 98,0\text{--}103,6$ (Go3r-S), os quais foram atribuídos principalmente às unidades de α -L-ramnose (FIGURA 16b e 17a).

A partir do HMQC e do COSY, realizados com a fração Go3r, os sinais anoméricos em δ 100,5/5,33, δ 100,2/5,48 e δ 98,0/5,78 foram atribuídos a ramnose 3-ligada, sulfatada em C-2 e em C-2 e C-4. Para a fração Go3r-S esses valores foram de δ 100,4/5,33, δ 100,1/5,50 e δ 98,0/5,79, respectivamente. A existência dos picos cruzados em 5,48 e 5,50/4,70 e 5,33/4,70 (H-1/H-2), observados nos experimentos de COSY das frações Go3r e Go3r-S, conduziram a identificação do sinal do hidrogênio ligado ao C-2 sulfatado (δ 4,70). O deslocamento do C-2 sulfatado de tais unidades aparece em δ 78,2 (acoplado com δ 4,70 no HMQC) e este deslocamento está de acordo com o efeito α que a sulfatação exerce sobre o carbono sulfatado (+6,8 ppm) (GORIN e MAZUREK, 1975; LAHAYE *et al.*, 1999). A influência da sulfatação nos deslocamentos químicos discutidos acima foi confirmada pela ausência de tais sinais nos espectros de RMN de ^{13}C e ^1H dos respectivos produtos dessulfatados, Go3r-RD e Go3r-SD (FIGURAS 16c, 17b e 18b,d). As ressonâncias atribuídas às unidades de ramnose 3-ligadas 2- e 2,4-sulfatadas foram semelhantes às relatadas para unidades de α -D-manose 3-ligada 2-sulfatada (C-1/H-1 em δ 100,5/5,52, C-2 em δ 77,4; KOLENDER *et al.*, 1997).

No HMQC de Go3r os sinais anoméricos em δ 101,3 e δ 101,0 correlacionaram com os prótons geminais em δ 5,22 e δ 5,27 e foram atribuídos a unidades de ramnose 2-ligadas 3,4- e 4-sulfatadas. No espectro de HMQC de Go3r-S os sinais de C-1/H-1 para estas unidades foram identificados em δ 101,4/5,23 e 101,0/5,28. Em ambos os espectros, o sinal em δ ~82,0 foi atribuído ao C-4 sulfatado (FIGURAS 16b e 17a), cujo C-5 encontra-se em δ ~68,6. Adicionalmente, tais sinais anoméricos também podem corresponder ao C-1 das unidades de ramnose 2,3-dissubstituídas, sulfatadas ou não em C-4 (KNIREL *et al.*, 1998a). A diminuição na intensidade do sinal de H-1 em δ 5,27 após degradação controlada de Smith (aparecendo neste espectro em δ 5,28) indica que os mesmos correspondem, pelo menos em parte, ao H-1 das unidades de ramnose 2,3-dissubstituídas (FIGURA 18b,d, p. 116).

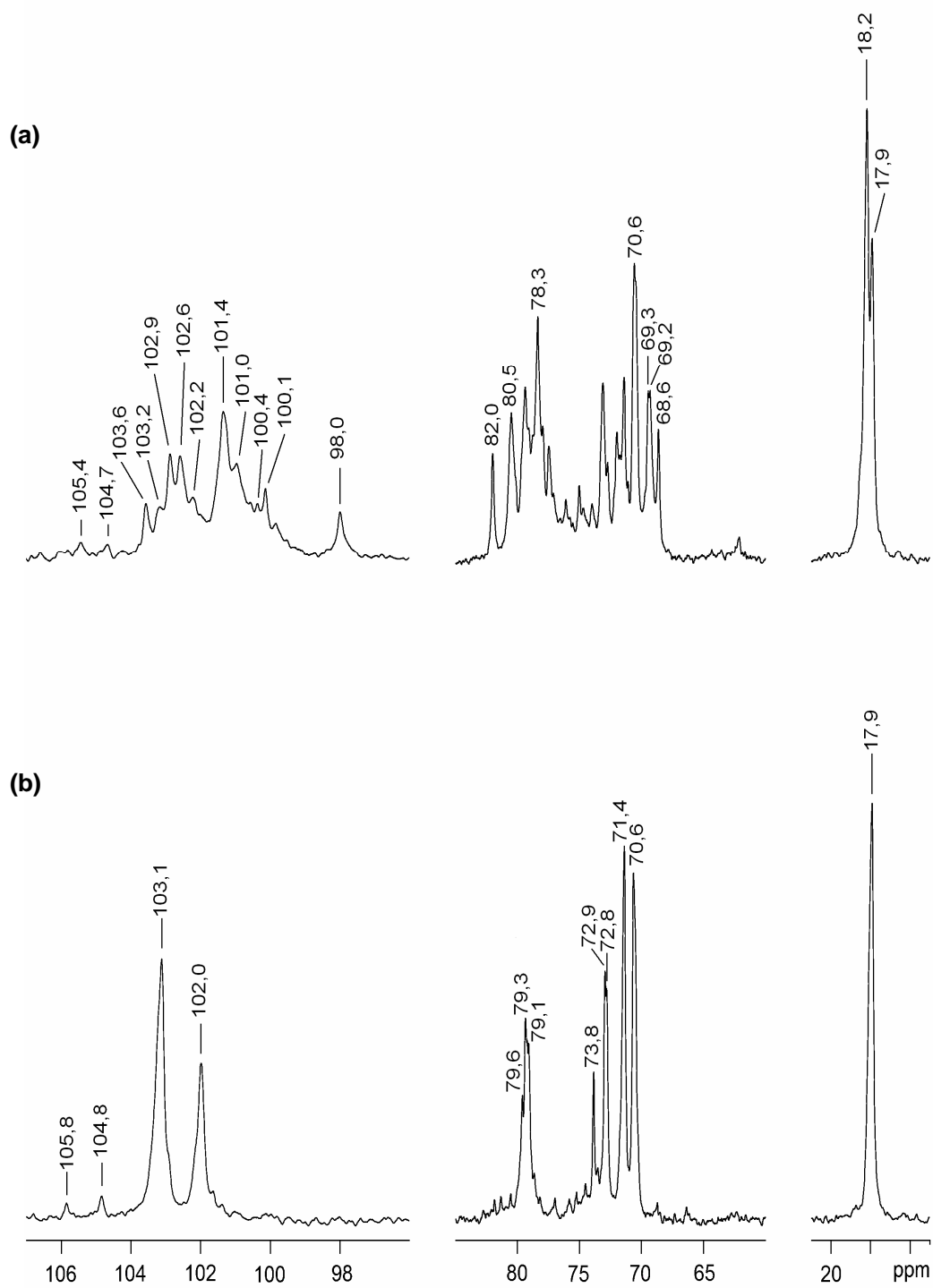


FIGURA 17 – ESPECTROS DE RMN DE ^{13}C DAS FRAÇÕES Go3r-S (a) E Go3r-SD (b)

Solvente: D_2O (70 °C); acetona como padrão interno (δ 31,45).

Os sinais anoméricos em δ 102,6–102,9 e em 102,6–103,6, presentes nos espectros de RMN de ^{13}C de Go3r e Go3r-S, respectivamente, correlacionaram-se com prótons geminais em δ 5,10–5,03 e δ 5,09–5,05, respectivamente. Essas ressonâncias foram atribuídas a unidades de ramnose 3-ligadas e 3-ligadas 4-sulfatadas. A identificação dos sinais de H-2 (δ 4,17) e C-2 (δ 71,4) (HMQC realizado a 30 °C) foi consistente com a presença de C-2 livre e estão de acordo com os deslocamentos relatados na literatura para unidades de ramnose 3-ligadas e 3-ligadas 4-substituídas (C-1/H-1 em δ ~102,6–103,2/4,98–5,04 e C-2/H-2 em δ ~71,0–71,3/4,15–4,19; OVOD *et al.*, 2004; SENCHENKOVA *et al.*, 1999, ZDOROVENKO *et al.*, 1999). No HMQC da fração Go3r-S as unidades de ramnose 3-ligadas 4-sulfatadas apresentaram deslocamentos referentes aos C-4/H-4 e C-5/H-5 em δ 80,5/4,36 e δ 69,2–69,3/3,94, respectivamente. No espectro de Go3r os valores para estes assinalamentos foram de δ 80,4/4,34 e δ 69,2/3,94.

Considerando os dados expostos até agora, as análises de RMN da heteroramnana sulfatada confirmaram a existência de pontos de ramificação e a presença de vários sítios de sulfatação nas unidades de ramnose 3- e 2-ligadas, como havia sido descrito nas análises de metilação (TABELAS 13, 14 e 15, p. 97, 101 e 105).

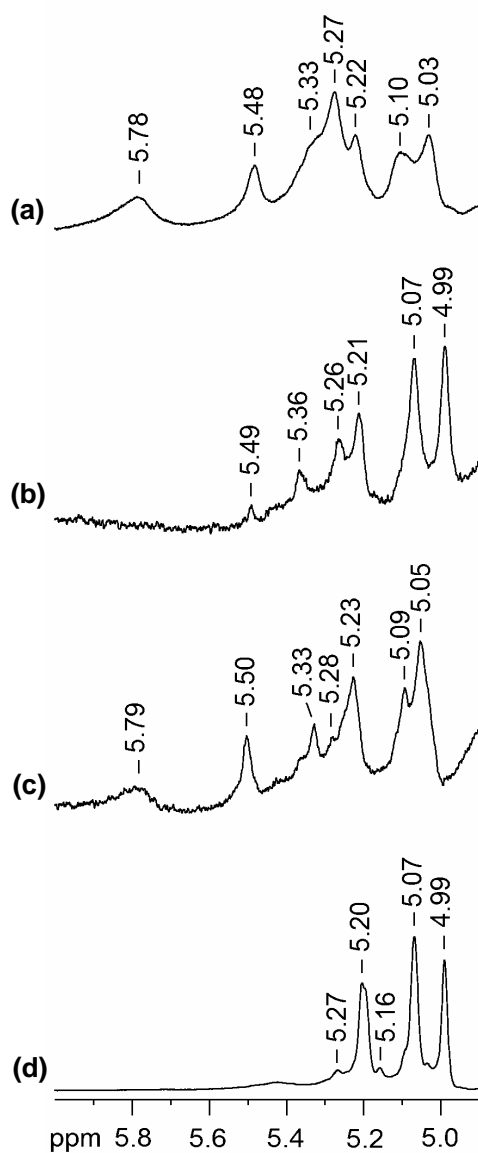


FIGURA 18 – ESPECTROS DE RMN DE ^1H DAS FRAÇÕES Go3r (a), Go3r-RD (b), Go3r-S (c) E Go3r-SD (d)

Solvente: D_2O (70 °C); acetona como padrão interno (δ 31,45).

Dando continuidade aos estudos de RMN, o polissacarídeo carboxi-reduzido/dessulfatado Go3r-RD, assim como o produto de degradação controlada de Smith/dessulfatado Go3r-SD foram analisados por RMN mono e bidimensionais. Os espectros de RMN de ^{13}C de Go3r-RD (FIGURA 16c, p. 111) e Go3r-SD (FIGURA

17b, p. 114) apresentaram dois sinais principais na região anomérica, que foram atribuídos a unidades de ramnose 2,3- e 2-ligadas (δ 102,0) e 3-ligada (δ 103,1). Estes resultados estão de acordo com os obtidos pela análise de metilação desses polímeros (TABELAS 13 e 16, p. 97 e 108).

Os espectros bidimensionais do tipo HMQC de Go3r-RD e Go3r-SD (FIGURA 19) apresentaram acoplamentos bem definidos e, na região anomérica, os sinais em δ 102,0/5,20 foram atribuídos ao C-1/H-1 das unidades de ramnose 2-ligadas (designada como **E** na FIGURA 19) (SENCHENKOVA *et al.*, 1999; OVOD *et al.*, 2004). Ainda na região anomérica, os acoplamentos em δ 103,1/5,07 e δ 103,1/4,99 correspondem a unidades de ramnose 3-ligadas em diferentes ambientes químicos: ligadas ao C-3 e ao C-2, respectivamente, de outras unidades de ramnose, ou seja, [\rightarrow 3)- α -L-Ram-(1 \rightarrow 3)- α -L-Ram] e [\rightarrow 3)- α -L-Ram-(1 \rightarrow 2)- α -L-Ram] (unidades **C** e **D**, respectivamente, na FIGURA 20). Os assinalamentos realizados para as unidades **C** e **D** (TABELA 17, p. 121) estão de acordo com dados de literatura para unidades repetitivas de ramnose presentes na cadeia O-polissacarídica do lipopolissacarídeo isolado de *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* NCPPB 2708 (OVOD *et al.*, 2004).

Adicionalmente, os espectros de ^1H de Go3r-RD e Go3r-SD apresentaram sinais δ 5,26 e δ 5,27, respectivamente, correspondentes ao H-1 de unidades de ramnose 2,3-dissubstituídas (unidade **B**, FIGURA 20a). No espectro de HMQC de Go3r-RD foi possível assinalar o acoplamento entre o H-1 em δ 5,26 e seu correspondente C-1 em δ 102,0 (FIGURA 19a). Tal correlação não foi observada no espectro de HMQC do produto de degradação de Smith dessulfatado, devido ao menor grau de ramificação em relação ao polímero original. Os valores dos deslocamentos químicos verificados para unidades de ramnose 2,3-dissubstituídas em Go3r-RD são semelhantes aos reportados para tais unidades presentes no O-polissacarídeo de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* GSPB 483 (KNIREL *et al.*, 1998a).

Os sinais correspondentes aos prótons α -anoméricos presentes nos espectros de Go3r-RD e Go3r-SD apresentaram integração relativa de 0,6:0,7:1,1:1,0 (5,26, 5,20, 5,07, 4,99) e 0,2:1,4:1,7:1,0 (5,27, 5,20, 5,07, 4,99) respectivamente. A intensidade do sinal de H-1 correspondente as unidades de

ramnose 2,3-dissubstituída (δ 5,27, no espectro de Go3r-SD) decresceu quando comparado ao correspondente sinal (δ 5,26) presente no espectro de Go3r-RD. Estes resultados estão de acordo com os dados obtidos na análise de metilação das frações acima relatadas, os quais demonstraram um decréscimo nos pontos de ramificação após degradação de Smith.

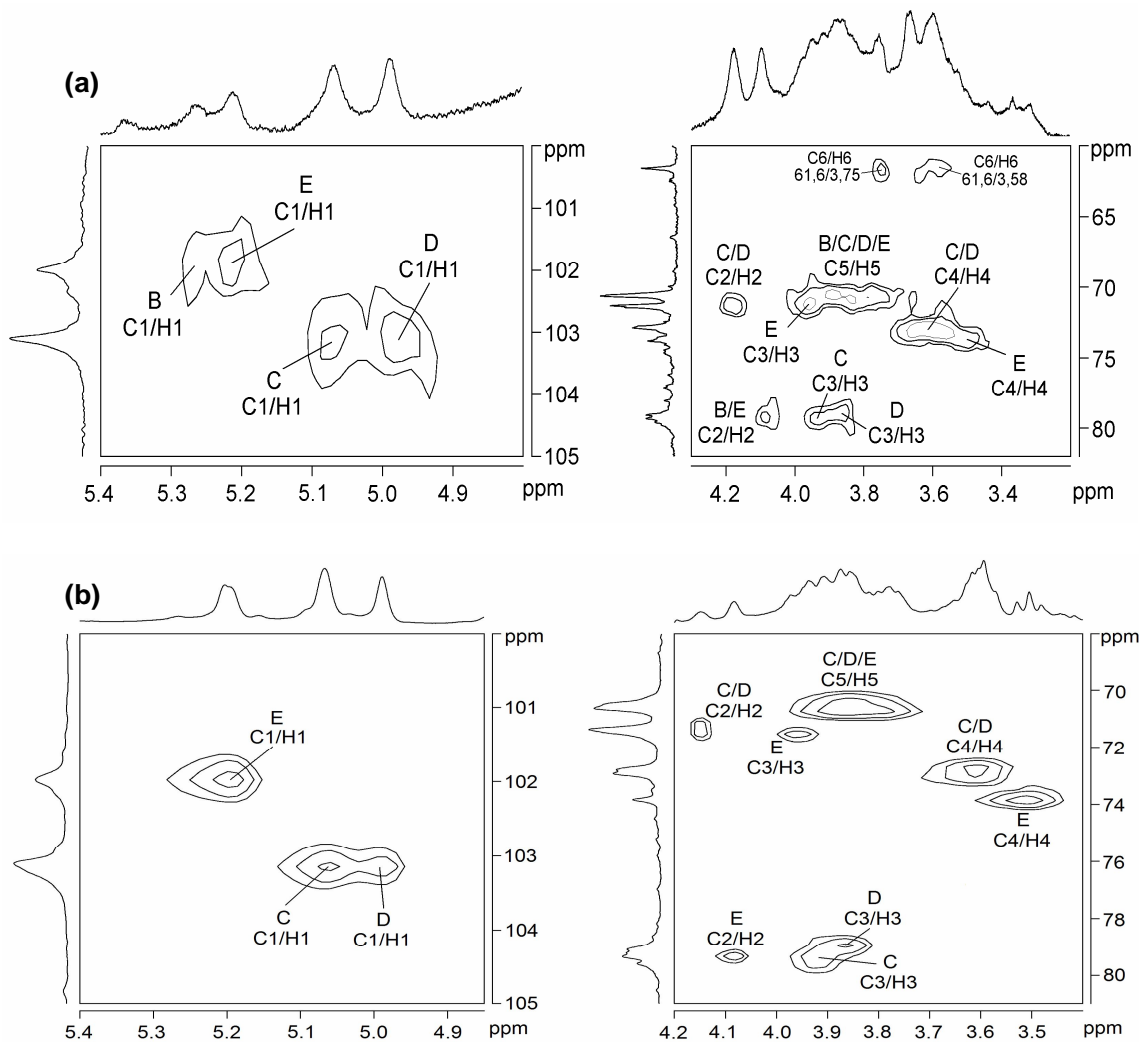
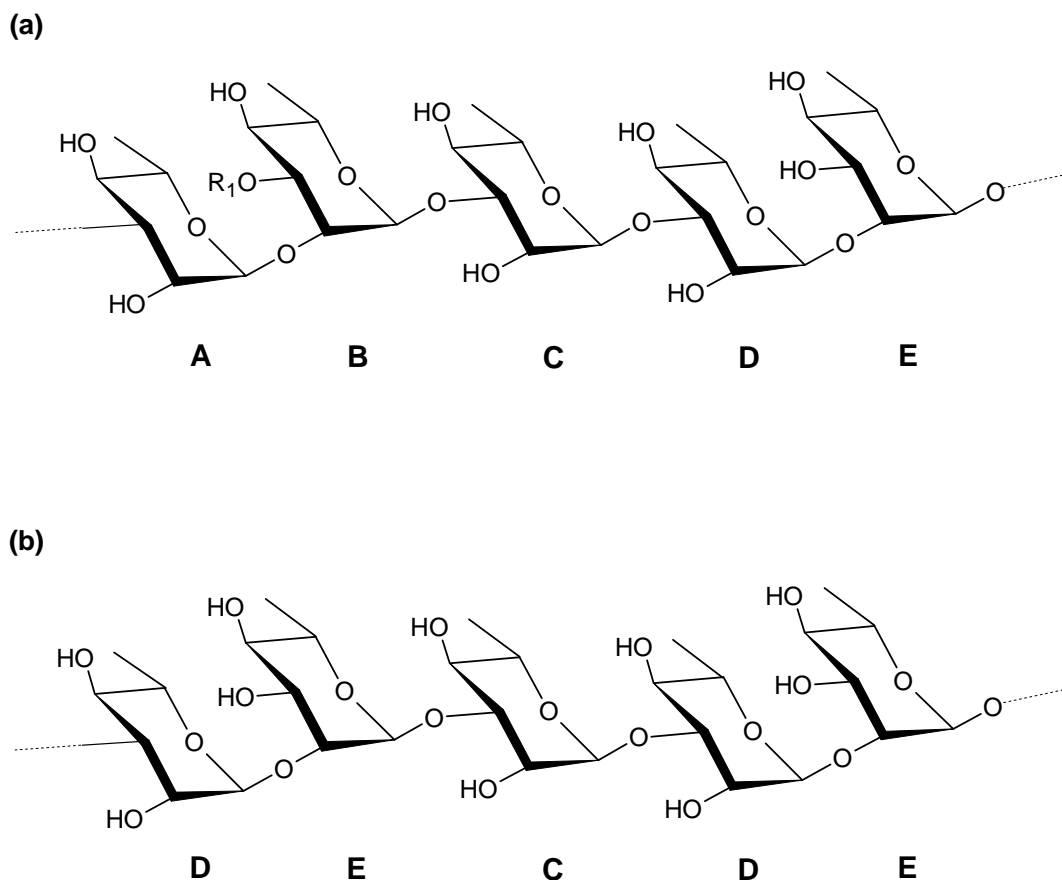


FIGURA 19 – ESPECTROS DE HMQC DAS FRAÇÕES DESSULFATADAS Go3r-RD (a) E Go3r-SD (b)

Solvente: D₂O (70 °C). **B**, **C**, **D** e **E** correspondem às unidades [→2,3)- α -L-Ramp-(1→], [→3)- α -L-Ramp-(1→3)], [→3)- α -L-Ramp-(1→2)] e [→2)- α -L-Ramp-(1→], respectivamente (ver FIGURA 20).



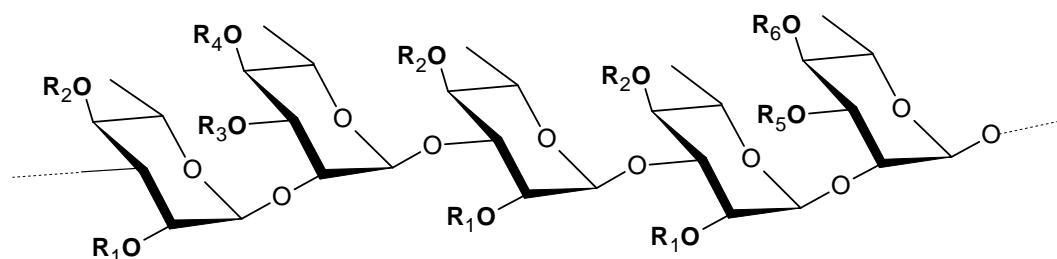
NOTA: R_1 = cadeias laterais contendo como terminais não redutores: Glc, Gal (formados a partir da carboxi-redução dos ácidos urônicos) ou Xil. A unidade **B** não foi representada na parte (b) devido a sua baixa quantidade.

FIGURA 20 – PRINCIPAIS UNIDADES DE RAMNOSE PRESENTES NAS FRAÇÕES Go3r-RD (a) E Go3r-SD (b)

Após as análises de RMN foi possível confirmar os dados previamente obtidos por metilação dos polímeros modificados quimicamente, e a partir desses dados foi proposta uma estrutura com as principais características da heteroramnana Go3r, que é mostrada na Figura 21. Ressalta-se que tanto a Figura 20 quanto a Figura 21 são ilustrativas dos tipos de ligações glicosídicas presentes

na heteroramnana Go3r, não sendo possível afirmar nem descartar a presença do pentassacarídeo representado.

Assim, a heteroramnana Go3r apresenta elevado grau de sulfatação, sendo constituída principalmente por unidades de ramnose 2,3-, 2- e 3-ligadas, na relação de ~1:1:3, as quais se encontram 53%, 54% e 29% sulfatadas em C-4. Embora o principal sítio de sulfatação seja o C-4, grupos sulfato também esterificam os carbonos C-2 (38%), C-2 e C-4 (14%) das unidades de ramnose 3-ligadas e os C-3 e C-4 (22%) das unidades 2-ligadas. Além de grupos sulfato, a heteroramnana Go3r contém outros grupos ácidos, devido a presença de ácidos urônicos (glucurônico e galacturônico), que por sua vez estão majoritariamente (80%) sulfatados em C-2. Por fim, a presença de ramificações (1 cadeia lateral para cada 5 unidades monossacarídicas) é um fator adicional que aumenta a complexidade estrutural desta heteroramnana.



$R_1 = R_2 = H$ (6,2%)	$R_3 =$ Cadeias laterais (13,5%)	$R_5 = R_6 = H$ (3,6%)
$R_1 = R_2 = SO_3^-$ (5,0%)	$R_4 = H$ (6,3%) ou SO_3^- (7,2%)	$R_5 = R_6 = SO_3^-$ (3,3%)
$R_1 = H; R_2 = SO_3^-$ (10,3%)		$R_5 = H; R_6 = SO_3^-$ (8,1%)
$R_1 = SO_3^-; R_2 = H$ (13,5%)		

NOTA: % = mol%. Cadeias laterais contêm como terminais não redutores: GlcpA 2-sulfato (5 mol%) ou GalpA 2-sulfato (~4 mol%) ou Xilp (5 mol%).

FIGURA 21 – PRINCIPAIS UNIDADES DE RAMNOSE PRESENTES NA HETERORAMNANA SULFATADA Go3r

TABELA 17 – DESLOCAMENTOS QUÍMICOS ASSINALADOS A PARTIR DOS ESPECTROS MONO E BIDIMENSIONAIS DAS FRAÇÕES DESSULFATADAS Go3r-RD E Go3r-SD

Unidades de ramnose ^a	Deslocamentos químicos (ppm)						Deslocamentos químicos (ppm)					
	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6
C ^b	103,1 (103,1)	71,3 (71,4)	79,3 (79,3)	72,9 (72,8/72,9)	70,6 (70,6)	17,9/18,0 (17,9)	5,07 (5,07)	4,18 (4,15)	3,92 (3,91)	3,60 (3,60)	3,76–3,88 (3,78–3,88)	1,30–1,33 (1,32)
D ^b	103,1 (103,1)	71,3 (71,4)	79,0 (79,1)	72,9 (72,8/72,9)	70,6 (70,6)	17,9/18,0 (17,9)	4,99 (4,99)	4,18 (4,15)	3,87 (3,86)	3,62 (3,62)	3,76–3,88 (3,78–3,88)	1,30–1,33 (1,29)
E ^b	102,0 (102,0)	79,3 (79,3)	71,3 (71,4)	73,8 (73,8)	70,6 (70,6)	17,9/18,0 (17,9)	5,21 (5,20)	4,09 (4,08)	3,96 (3,95)	3,53 (3,51)	3,76–3,88 (3,78–3,88)	1,30–1,33 (1,32)
B ^c	102,0 (102,0)					17,9/18,0 (17,9)	5,26 (5,27)	4,09				1,30–1,33 (1,29–1,32)

Em parênteses deslocamentos químicos dos espectros de RMN de ¹H e ¹³C da fração Go3-SD; ^a unidades apresentados na FIGURA 20; ^b de acordo com SENCHENKOVA *et al.*, 1999 e OVOD *et al.*, 2004; ^c de acordo com KNIREL *et al.*, 1998a.

4.4 OBTENÇÃO E ANÁLISE DOS OLIGOSSACARÍDEOS

A obtenção de oligossacarídeos é uma ferramenta importante para auxiliar o estudo estrutural de polissacarídeos, tanto para a confirmação da seqüência monossacarídica e configuração enantiomérica dessas unidades, quanto para determinação dos padrões de glicosilação e sulfatação do polissacarídeo original (PAINTER, 1983).

4.4.1 Auto-Hidrólise Analítica

Com o objetivo de se produzir oligossacarídeos utilizou-se o processo de auto-hidrólise. Para tanto, foi selecionada a fração contendo heteroramnanas Go4. Os polissacarídeos, após serem cromatografados em resina catiônica fortemente ácida, encontravam-se na sua forma ácida e assim foram submetidos a uma auto-hidrólise analítica em diferentes tempos (5–75 horas), sendo mantida temperatura constante (80 °C). Esse processo foi acompanhado pela dosagem de açúcares redutores (FIGURA 22) e por RMN de ^{13}C (FIGURA 23).

Observando a Figura 22 é possível notar que a partir do tempo de 5 horas há grande mudança nos espectros de RMN de ^{13}C dos produtos de auto-hidrólise, quando comparados ao espectro da fração bruta Go4 (FIGURA 4, p. 78). Os espectros de tais produtos assemelharam-se aos espectros de RMN de ^{13}C dos polissacarídeos dessulfatados (FIGURA 6, p. 80) pela presença de sinais na região anomérica correspondentes as unidades de ramnose 2-, 3-ligadas e 2,3-dissubstituídas (δ 101,9 e δ 103,1). Além disso, os espectros dos produtos de auto-hidrólise apresentaram vários sinais na região de δ 105,0, que indicam a presença de unidades de ácidos urônicos nessas frações (GORIN e MAZUREK, 1975). A presença de sinais anoméricos em δ 94,6 e δ 95,1 foi atribuída ao C-1 de unidades de ramnose redutora (β e α , respectivamente). A análise de açúcares redutores demonstrou que em 5 horas de auto-hidrólise houve grande aumento no poder

reduzido do material, quando comparado com o polímero nativo (poder redutor = 1%) (FIGURA 22).

No tempo de 25 horas de hidrólise ocorreu um aumento no poder redutor, quando comparada às frações hidrolisadas por menos tempo, sendo esse valor somente 4% menor que o obtido após 75 horas de hidrólise (FIGURA 22). Assim, o tempo de 25 horas foi selecionado para realização do processo de auto-hidrólise preparativa levando-se em consideração o poder redutor e as análises de RMN de ^{13}C , que demonstravam a presença de sinais referentes à ramnose sulfatada (δ ~98,0 e δ 100,5) e dessulfatada (δ 102,0 e δ 103,0). Comparativamente, esse tempo é semelhante ao utilizado por Lahaye, Inizan e Vigouroux (1998) para produção de oligossacarídeos a partir dos polissacarídeos ulvanas, pelo método de auto-hidrólise. Esses autores obtiveram, após purificação do hidrolisado, um dissacarídeo que correspondia ao ácido aldobiurônico [β -D-GlcAp-(1 \rightarrow 4)- α β -L-Ram], além de dois diferentes trissacarídeos, os quais continham duas unidades de ramnose 3-sulfato e uma unidade de ácido glucurônico ou ácido idurônico: [α -L-Ram-(1 \rightarrow 4)- β -D-GlcA-(1 \rightarrow 4)-L-Ram] e [α -L-Ram-(1 \rightarrow 4)- α -L-IdoA-(1 \rightarrow 4)-L-Ram].

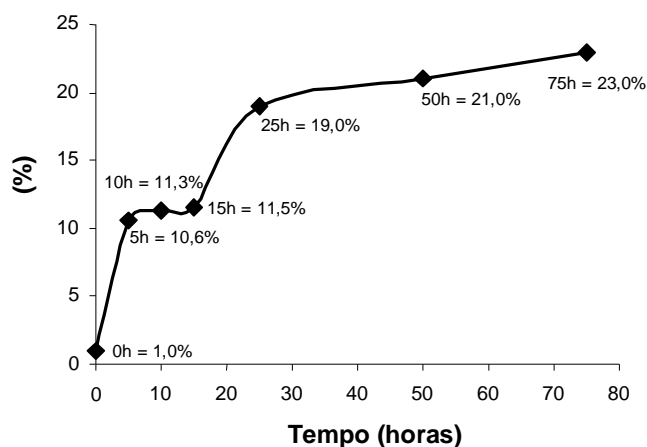


FIGURA 22 – DETERMINAÇÃO DO TEOR DE AÇÚCARES REDUTORES EM FUNÇÃO DO TEMPO DE AUTO-HIDRÓLISE

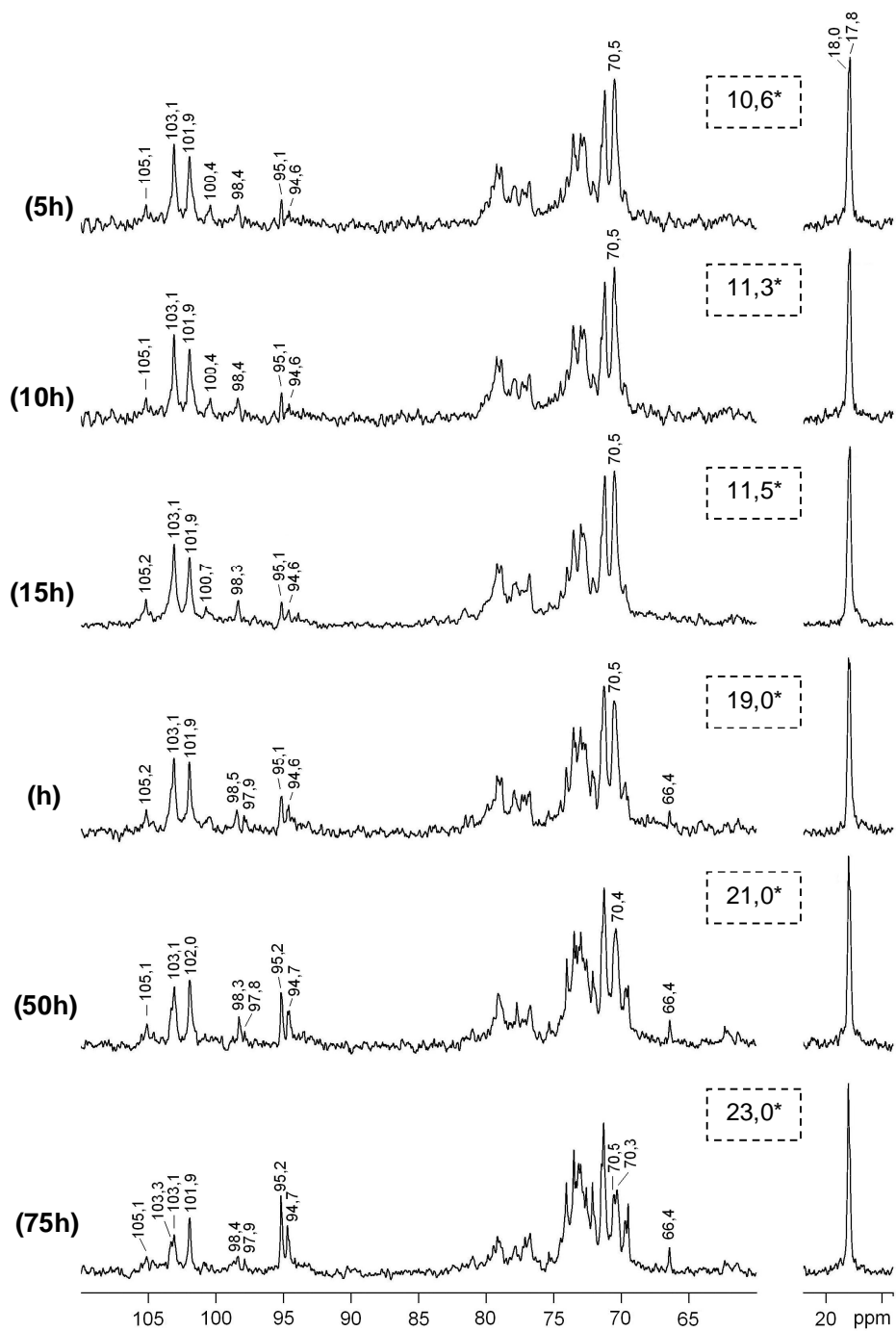


FIGURA 23 – ESPECTROS DE RMN DE ^{13}C DAS FRAÇÕES OBTIDAS APÓS AUTO-HIDRÓLISE DA FRAÇÃO BRUTA Go4

Solvente: D_2O (50 °C); acetona como padrão interno (δ 31,45). *Porcentagem de açúcares redutores (PARK e JOHNSON, 1949).

4.4.2 Auto-Hidrólise Preparativa e Purificação dos Oligossacarídeos

Tendo selecionado o tempo adequado para a auto-hidrólise, a produção preparativa de oligossacarídeos foi realizada utilizando-se a fração bruta Go4, na sua forma ácida, sendo submetida à hidrólise por 25 horas a 80 °C (item 3.7.4).

Após o procedimento de auto-hidrólise, a amostra foi neutralizada, centrifugada e o sobrenadante foi precipitado com etanol, centrifugado, originando as frações Go4s (3,8 g) e Go4p (1,3 g), sobrenadante e precipitado etanólicos, respectivamente.

A fração Go4s foi submetida à cromatografia de exclusão em Bio-Gel P-2, com o objetivo de dessalificar a amostra, desde que o rendimento após auto-hidrólise foi de 103,8% em relação a massa inicial da fração Go4. A Figura 24 apresenta o perfil de eluição desta fração. É possível observar a separação do hidrolisado em quatro sub-frações que foram denominadas de Go4A, Go4B, Go4C e Go4D e apresentaram rendimentos de 24%, 17%, 48% e 0,3%, respectivamente (expressos em termos de material aplicado na coluna).

Análise de RMN de ^{13}C da fração de maior rendimento Go4C (FIGURA 25) demonstrou que a mesma é constituída principalmente por unidades redutoras de ramnose ($\alpha = \delta 94,9$, $\beta = \delta 94,3$) e unidades redutoras de xilose ($\alpha = \delta 97,5$, $\beta = \delta 97,6$), sendo possível realizar os assinalamentos de todos os demais carbonos constituintes dessas unidades (FIGURA 25) (GORIN e MAZUREK, 1975; LAHAYE e RAY, 1996).

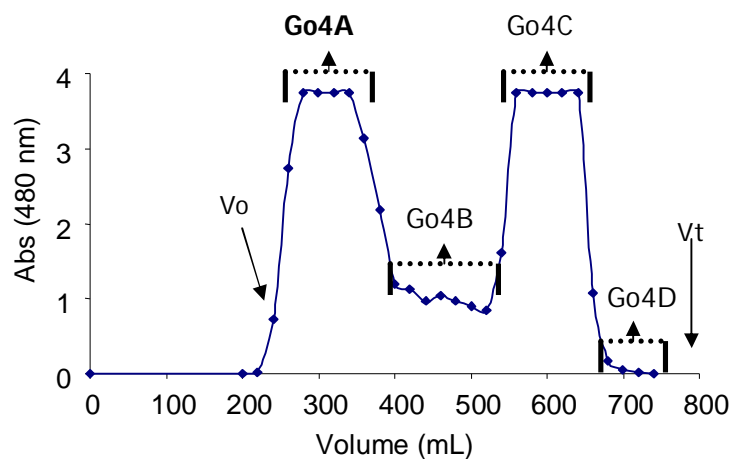


FIGURA 24 – CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO DO HIDROLISADO Go4s EM BIO-GEL P-2

Limite de exclusão: 100–1800 Da; V_o = 250 mL; V_t = 800 mL; fase móvel = água.

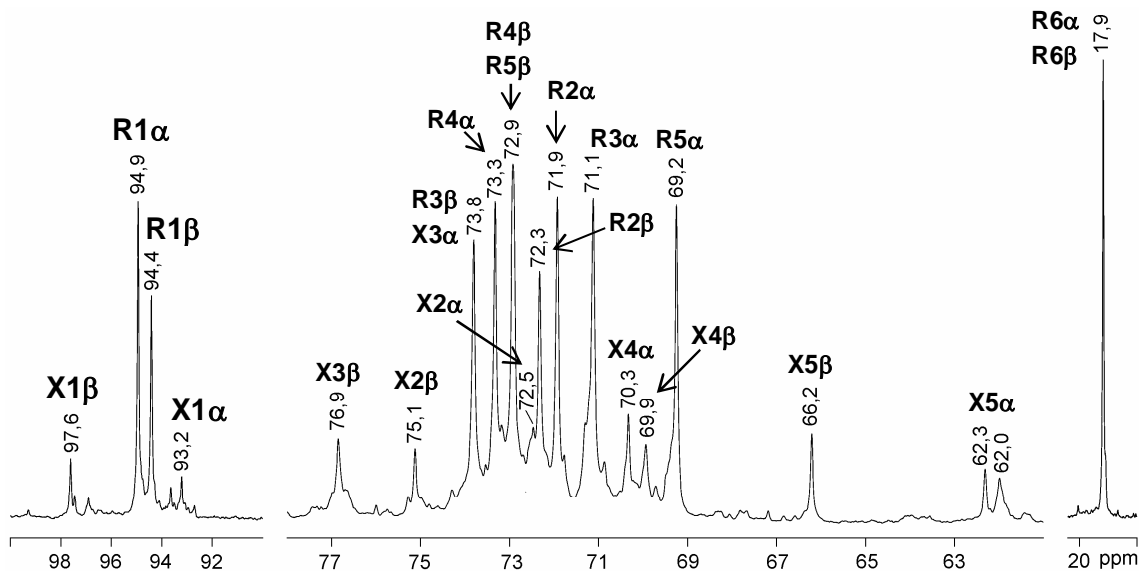


FIGURA 25 – ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DA FRAÇÃO OLIGOSSACARÍDICA Go4C

Solvente: D_2O (25 °C); acetona como padrão interno (δ 31,45). X = xilose; R = ramnose.

A fração Go4A foi selecionada para estudo e, com o objetivo de se obter frações neutras e frações ácidas, foi submetida a cromatografia de troca aniônica em coluna contendo DEAE-Sephacel, sendo esta primeiramente eluída com água, seguida de concentrações crescentes de $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ (0,05–0,5 M). A Figura 26 apresenta o perfil de eluição dessa fração.

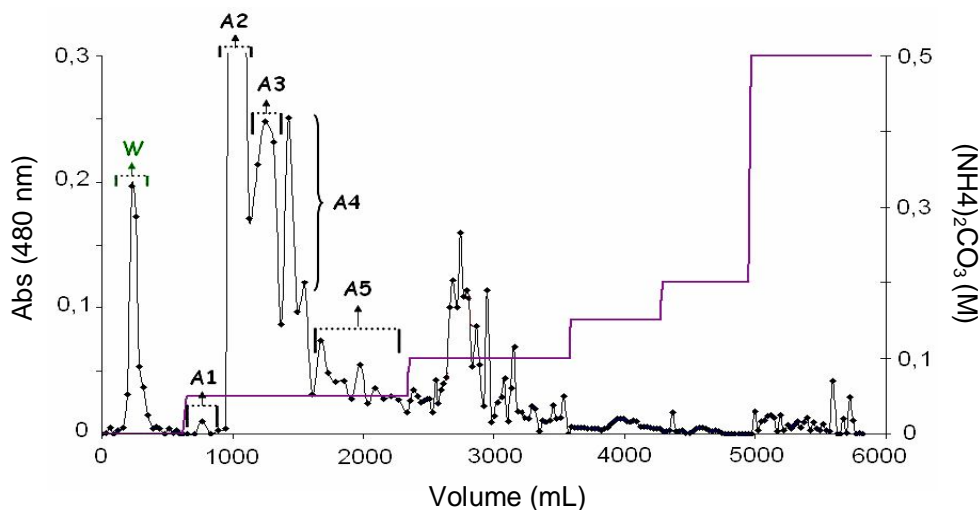


FIGURA 26 – CROMATOGRAFIA DE TROCA ANIÔNICA DA FRAÇÃO OLIGOSSACARÍDICA Go4A EM DEAE-Sephacel

Fase móvel: água e $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ (0,05–0,5 M)

As frações de maior rendimento foram as eluídas com água (oligo-W) e com baixa molaridade de $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ (oligo-A2), o que sugere baixos teores de substituintes com cargas negativas nessa fração. Quando as frações ácidas (oligo-A2 a oligo-A5) foram analisadas por cromatografia de camada delgada (CCD) todas apresentaram várias manchas, demonstrando a sua heterogeneidade (dados não mostrados).

O estudo dos oligossacarídeos foi seguido através da análise da estrutura química dos oligossacarídeos oligo-W e oligo-A2.

4.4.3 Análise Estrutural do Oligossacarídeo Neutro oligo-W

A fração oligossacarídica oligo-W (16% de rendimento) apresentou majoritariamente unidades de ramnose (95,5 mol%) na análise de sua composição monossacarídica. Por ser uma fração eluída com água na cromatografia de troca-iônica, não era esperado a presença de ácidos urônicos ou grupos sulfato na mesma, o que foi confirmado por análises de RMN (mono e bidimensionais) e metilação.

Quando a fração oligossacarídica oligo-W foi submetida a análise de metilação os principais derivados permetilados obtidos foram 3,4-Me₂-Ram (46,0 mol%) e 2,4-Me₂-Ram (42,6 mol%), indicando que o oligo-W é principalmente constituído por unidades de ramnose 2- e 3-ligadas e apresentam relação de 1,08:1,00, respectivamente (TABELA 18). A presença de baixos teores de terminais não redutores de ramnose (6,9 mol%), em quantidades similares as unidades 2,3-dissubstituídas (4-Me-Ram = 4,5 mol%), sugere que os pontos de ramificação são constituídos por terminais de ramnose (TABELA 18).

TABELA 18 – ANÁLISE DE METILAÇÃO DO OLIGOSSACARÍDEO oligo-W

Derivado ^a	Ligação	oligo-W
2,3,4-Me ₃ -Ram ^b	Ramp-(1→	6,9
2,4-Me ₂ -Ram	→3)-Ramp-(1→	42,6
3,4-Me ₂ -Ram	→2)-Ramp-(1→	46,0
2-Me-Ram	→3,4)-Ramp-(1→	—
3-Me-Ram	→2,4)-Ramp-(1→	—
4-Me-Ram	→2,3)-Ramp-(1→	4,5
Ram	→2,3,4)-Ramp-(1→	—

— = não detectado; ^a mol% dos monossacarídeos contendo grupos metil na posição indicada. Valores corrigidos para 100% de ramnose; ^b 2,3,4-Ram analisada como 1,5-di-O-acetil-2,3,4-O-metilramnitol, etc.

O oligo-W foi analisado por RMN mono e bidimensionais. O espectro de RMN de ^{13}C deste oligo apresenta três sinais principais na região anomérica em δ 102,1, δ 103,2 e δ 103,5. Pela análise do espectro de HMQC (FIGURA 27) foi observado que os sinais acima referidos correspondem as unidades de ramnose 2-ligada (δ 5,22), 3-ligada (δ 4,99) e terminal não redutor (δ 4,99), respectivamente (TABELA 19). Os deslocamentos químicos referentes ao C-1/H-1 das unidades 3-ligadas (δ 103,2/4,99), bem como os sinais do C-3/H-3 de tais unidades (δ 78,7/3,86), estão de acordo com dados de literatura que indicam a ligação destas em C-2 de ramnose, ou seja, $[\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-L-Ramp-(1}\rightarrow 2)]$ (OVOD *et al.*, 2004; BEDINI *et al.*, 2006) (TABELA 19). Dados similares foram obtidos por análises de metilação e RMN das frações polissacarídicas Go3r-RD e Go3r-SD (TABELAS 17 e 20, p. 121 e 134). Assim, os dados apresentados sugerem que as heteroramnanas obtidas de *G. oxysperma* contêm blocos formados por: $[\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-L-Ramp-(1}\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-L-Ramp-(1}\rightarrow)]_n$.

A presença de terminais não redutores de ramnose foi confirmada pelo acoplamento entre H-1/H-2 em δ 4,99/4,10 (espectro de COSY), sendo que tais deslocamentos são similares aos obtidos por outros autores para a unidade referida (δ 4,98/4,08, CASTRO *et al.*, 2006; 5,01/4,01, KOCHETKOV *et al.*, 1991) (TABELA 19, p. 131). Adicionalmente, a razão entre os prótons δ 5,22 e δ 4,99 foi de 0,90:1,00, o que difere da razão verificada anteriormente pela análise de metilação (1,08:1,00, ramnose 2- e 3-ligada, respectivamente) (TABELA 18). Assim, quando se calcula essa relação somando os derivados metilados 2,4-Me₂-Ram e 2,3,4-Me₃-Ram, obtém-se uma razão mais próxima a verificada nos prótons (0,93:1,0), o que reafirma que o sinal em δ 4,99 corresponde a ramnose 3-ligada e terminal não redutor de ramnose.

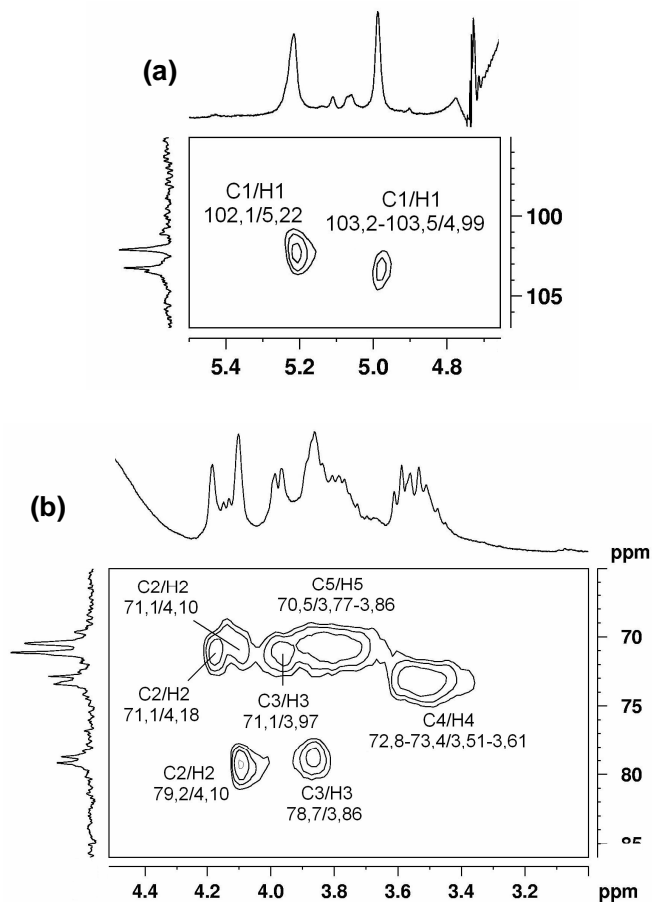


FIGURA 27 – ESPECTRO DE HMQC DO OLIGOSSACARÍDEO oligo-W. REGIÕES: ANOMÉRICA (a) E C-2-C-5/H-2-H5 (b)

Solvente: D₂O (30 °C); deslocamentos químicos expressos em ppm (δ).

Os dados obtidos para o oligo-W demonstraram que o mesmo é principalmente constituído por unidades de ramnose 2- e 3-ligadas alternadas, não contendo unidades de ácidos urônicos em sua estrutura, o que foi confirmado pela ausência dos sinais na região de $\delta \sim 105,0$ (parcialmente atribuídos ao C-1 de ácidos urônicos no polímero nativo).

TABELA 19 – DESLOCAMENTOS QUÍMICOS ASSINALADOS A PARTIR DOS ESPECTROS MONO E BIDIMENSIONAIS DA FRAÇÃO oligo-W

Unidades de ramnose	Deslocamentos químicos (ppm)						Deslocamentos químicos (ppm)					
	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6
$\rightarrow 2$ - α -L-Ramp-(1 \rightarrow 3) ^a	102,1 (102,0)	79,2 (79,4)	71,1 (71,2)	73,9 (73,4)	70,5 (70,4)	17,8 (17,9)	5,22 (5,21)	4,10 (4,08)	3,97 (3,96)	3,53 (3,51)	3,86 (3,84)	1,33 (1,31)
$\rightarrow 3$ - α -L-Ramp-(1 \rightarrow 2) ^a	103,2 (103,2)	71,1 (71,0)	78,7 (79,2)	72,9 (72,8)	70,5 (70,5)	17,8 (17,9)	4,99 (4,97)	4,18 (4,17)	3,86 (3,84)	3,57 (3,56)	3,77 (3,77)	1,30 (1,28)
α -L-Ramp-(1 \rightarrow 2) ^b	103,5 (103,5)	71,1 (71,4)			70,5 (70,5)	17,8 (17,8)	4,99 (4,98)	4,10 (4,08)	3,78 (3,80)			

Entre parênteses deslocamentos de ¹³C e ¹H das referências: ^a OVOD *et al.*, 2004; ^b CASTRO *et al.*, 2006.

4.4.4 Análise Estrutural da Fração Oligossacarídica Ácida oligo-A2

A fração oligossacarídica ácida oligo-A2, obtida após cromatografia de troca iônica da fração Go4A, foi a fração de maior rendimento (38%), sendo submetida a análises de composição monossacarídica, *Electrospray-Ionization Mass Spectrometry* (ESI-MS) (FIGURA 28) e RMN de ^{13}C (FIGURA 29). Tais análises demonstraram que o oligo-A2 é constituído principalmente por ramnose (90,4 mol%; CH_3 δ 17,8), além de baixas porcentagens de glucose (6,1 mol%) e xilose (3,5 mol%). Essa fração oligossacarídica continha 37% de ácidos urônicos (dosagem colorimétrica), sendo a presença destes confirmada pelos sinais em δ 175,5 e δ 176,4 no espectro de RMN de ^{13}C (FIGURA 29).

Quando a fração oligossacarídica oligo-A2 foi analisado por ESI-MS (modo negativo) foram gerados vários fragmentos com diferentes m/z (FIGURA 28; TABELA 20), reforçando os dados previamente obtidos por análise em CCD, que indicavam que essa fração era heterogênea.

Na Figura 28 é possível observar que os principais íons obtidos a partir do oligo-A2 corresponderam a tri-, tetra- e pentassacarídeos, contendo em sua estrutura unidades de ramnose (na quantidade de 2, 3 e 4, respectivamente) e uma unidade de ácido urônico (TABELA 20). O teor de sulfato nessa fração era de 9,1%, sendo verificada a presença de íons com m/z de 681,5 e 827,6, que corresponderam a tetra- e pentassacarídeos de ramnose ($[\text{M}-\text{H}]^-$), respectivamente, monossulfatados (TABELA 20). Assim, verificou-se que não houve completa dessulfatação do polissacarídeo durante o processo de auto-hidrólise e, além disso, a presença de ácido urônico ligado a ramnose reforça os dados obtidos pela análise da estrutura química da heteroramnana Go3r, que demonstrou que tais monossacarídeos são constituintes da cadeia polissacarídica. Oligossacarídeos obtidos a partir de hidrólise parcial das ramnanas sulfatadas extraídas de *M. latissimum* não continham ácidos urônicos em suas estruturas (LEE *et al.*, 1998), o que difere do obtido para os oligossacarídeos presentes na fração oligo-A2.

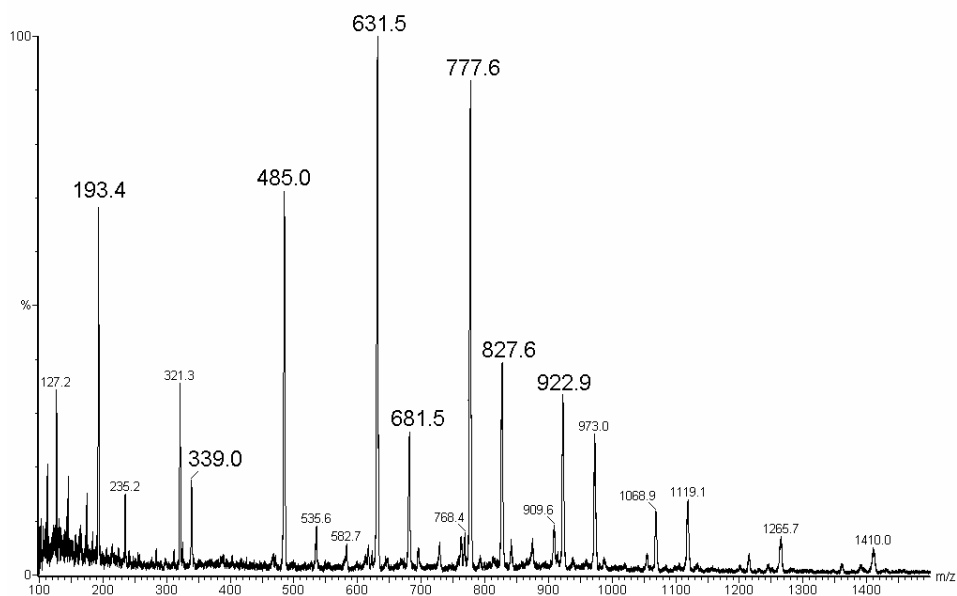


FIGURA 28 – ESI-MS (MODO NEGATIVO) DA FRAÇÃO OLIGOSSACARÍDICA oligo-A2

Voltagens: capilar= 2,91 Kv; cone= 73 v; extrator= 9 v.

REES (1963) estudou a estabilidade de grupos sulfato em meio ácido, a partir de polissacarídeos de algas vermelhas, e encontrou a seguinte ordem: sulfato em hidroxila primária > sulfato em hidroxila secundária axial > sulfato em hidroxila secundária equatorial. Talvez a labilidade dos grupos sulfato localizados em hidroxilas secundárias equatoriais justifique a dessulfatação dos oligossacarídeos obtidos por auto-hidrólise, desde que, pela análise da estrutura química da heteroramnana Go3r, foi verificado que os principais sítios de sulfatação nesse polissacarídeo apresentam as características acima citadas (FIGURA 21, p. 120).

TABELA 20 – PRINCIPAIS ÍONS FORMADOS POR ANÁLISE DE ESI-MS (MODO NEGATIVO) DA FRAÇÃO OLIGOSSACARÍDICA oligo-A2

Mw ^a	<i>m/z</i> [M-H] ⁻	Ramnose ^b	Ácido Urônico	Sulfato
194,4	193,4	—	1	—
340,0	339,0	1	1	—
486,4	485,0	2	1	—
632,6	631,5	3	1	—
778,7	777,6	4	1	—
924,8	922,9	5	1	—
682,6	681,5	4	—	1
828,8	827,6	5	—	1

^a massa molecular; ^b as unidades são apresentadas na relação identificada pela análise dos respectivos íons.

A análise de RMN de ¹³C da fração oligossacarídica oligo-A2 (FIGURA 29a) demonstrou a presença de sinais em δ 94,9 e δ 94,4, correspondentes ao C-1 de ramnose redutora (α e β , respectivamente) (GORIN e MAZUREK, 1975; LAHAYE e RAY, 1996). Os sinais em δ 101,9 e δ 103,1 (FIGURA 29a) foram atribuídos às unidades de ramnose 2- e 3-ligadas (SENCHENKOVA *et al.*, 1999; OVOD *et al.*, 2004; BEDINI *et al.*, 2006), respectivamente, podendo o primeiro corresponder ainda a ramnose 2,3-dissubstituída (TABELA 17, p. 121) (KNIREL *et al.*, 1998a). Além disso, a presença dos sinais centrados em \sim 105,0 confirma a presença de ácidos urônicos em β -configuração como constituintes do oligo-A2. Considerando que a fração Go4 contém ácido glucurônico como principal monossacarídeo ácido em sua cadeia (TABELAS 5 e 6, p. 72 e 74), pode-se sugerir que tais unidades monossacarídicas estejam presentes na fração oligossacarídica em estudo. No espectro de RMN de ¹³C do oligo-A2 (FIGURA 29a) observa-se ainda um grupo de sinais na região de δ 80,5–81,5, que podem corresponder ao C-4 ligado de ácidos urônicos (LAHAYE, BRUNEL e BONNIN, 1997).

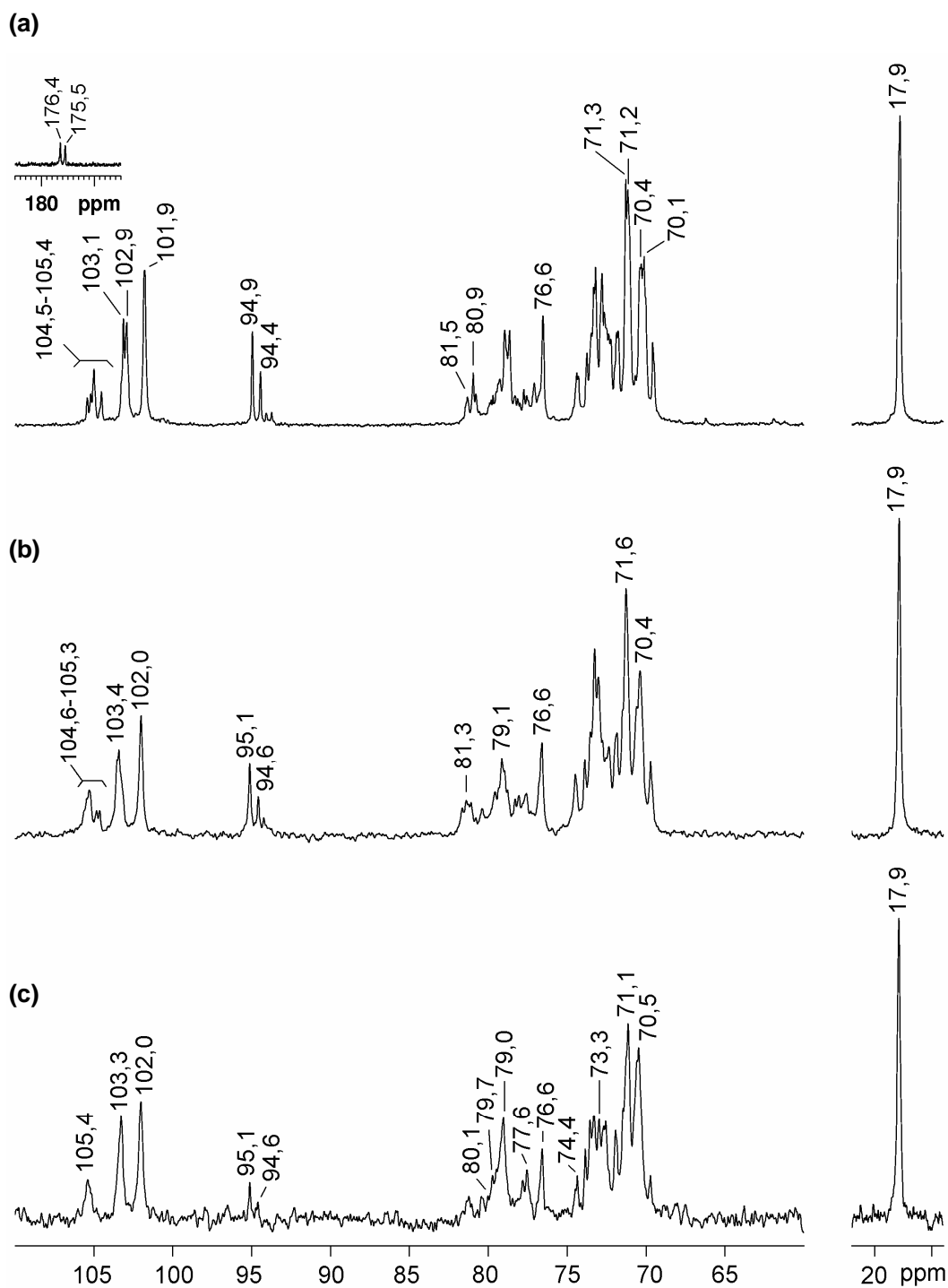


FIGURA 29 – ESPECTROS DE RMN DE ^{13}C DAS FRAÇÕES OLIGOSSACARÍDICAS oligo-A2 (a), oligo-18 (b) E oligo-D9 (c)

Solvente: D_2O (50 °C); acetona como padrão interno (δ 31,45).

Com o objetivo de se obter uma fração oligossacarídica homogênea, parte da fração oligossacarídica oligo-A2 foi submetida, separadamente, a cromatografia de exclusão (Bio-Gel P-2) e cromatografia de troca aniônica (DEAE-Sephacel), sendo os perfis cromatográficos apresentados na Figura 30.

O perfil de eluição da fração oligossacarídica oligo-A2 em cromatografia de exclusão (FIGURA 30a) demonstrou que esse método não foi eficiente para separar os oligossacarídeos com diferentes m/z presentes na mesma (FIGURA 28), o que é indicado pela presença de um único pico no cromatograma. Deste modo, para se avaliar o processo cromatográfico, foi selecionada uma fração oligossacarídica, como demonstrado na Figura 30a, que foi denominada oligo-18 (13% de rendimento).

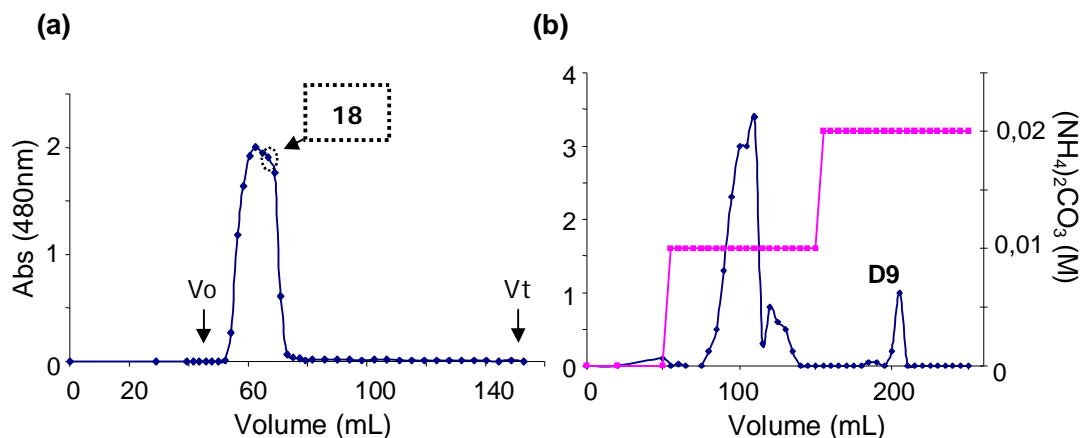


FIGURA 30 – PURIFICAÇÃO POR MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS DA FRAÇÃO OLIGOSSACARÍDICA oligo-A2: EXCLUSÃO EM BIO-GEL P-2 (a), TROCA ANIÔNICA EM DEAE-Sephacel (b)

Bio-Gel P-2: Limite de exclusão= 100-1800Da; V_o = 45 mL; V_t = 150 mL; fase móvel= água. DEAE-Sephacel: fase móvel= água e $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ (0,01-0,02M).

Ao contrário, quando a fração oligo-A2 foi submetida a cromatografia de troca aniônica, obteve-se uma fração que foi eluída em um único pico simétrico, com uma concentração de 0,02 M de $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ (FIGURA 30b), sendo esta denominada oligo-

D9 (11,3% de rendimento). As demais frações obtidas a partir dos dois processos cromatográficos discutidos não foram estudadas nesse trabalho.

Assim, as frações oligossacarídicas oligo-18 e oligo-D9 foram analisadas por CCD, ESI-MS (FIGURA 31) e RMN mono e bidimensionais.

Análise por CCD da fração oligo-18 demonstrou que tal fração era heterogênea, contendo ao menos três tipos de oligossacarídeos com massas moleculares diferentes. Análise por ESI-MS (FIGURA 31a) confirmou o caráter heterogêneo da mesma. Os íons com m/z 485,5, 631,6 e 777,7 corresponderam a tri, tetra e pentassacarídeos ácidos (contendo 2, 3 e 4 unidades de ramnose, respectivamente, $[M-H]^-$) e 1 unidade de ácido urônico. Adicionalmente, foi verificada a presença de íons que correspondem a tetra- e pentassacarídeos de ramnose monossulfatados (m/z 681,6 e 827,1, $[M-H]^-$, respectivamente).

Em contrapartida, a análise por ESI-MS do oligo-D9 apresentou majoritariamente o íon com m/z de 768,8 (FIGURA 31b), que foi identificado como um decassacarídeo constituído por oito unidades de ramnose e duas unidades de ácido urônico ($[M-H]^-$).

Deste modo, os processos cromatográficos utilizados para purificação da fração oligossacarídica oligo-A2 permitiram isolar diferentes frações oligossacarídicas, as quais contêm diferentes teores de ramnose e ácidos urônicos, podendo as mesmas estar ou não sulfatadas.

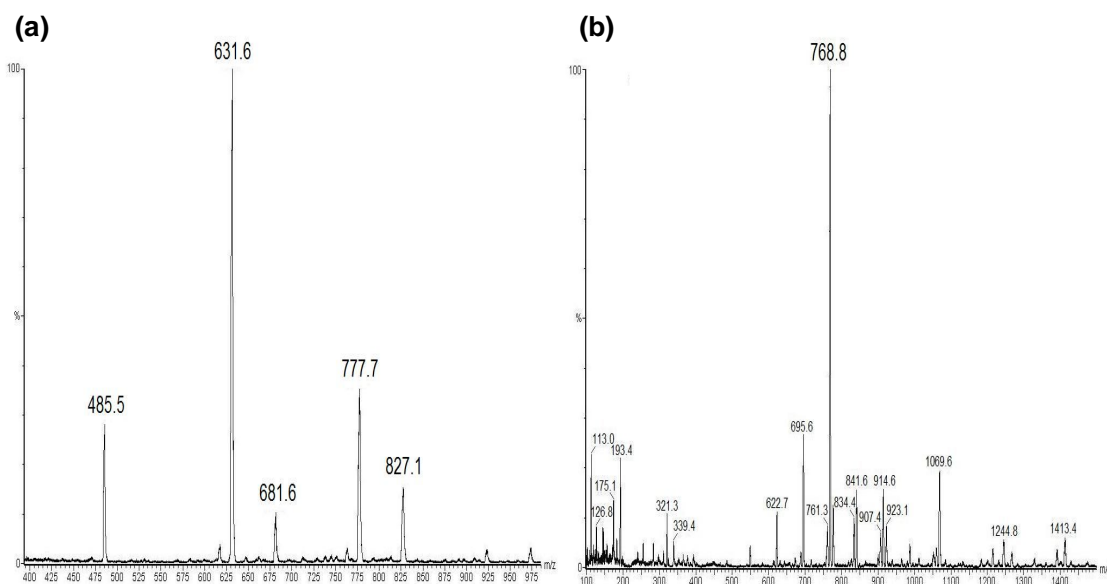


FIGURA 31 – ESI-MS (MODO NEGATIVO) DAS FRAÇÕES OLIGOSSACARÍDICAS oligo-18 (a) E oligo-D9 (b)

Oligo-18 – voltagens: capilar= 3,50 Kv; cone= 20 v; extrator= 2 v; Oligo-D9 – voltagens: capilar= 2,91 Kv; cone= 73 v; extrator= 9 v.

Os espectros de RMN de ^{13}C das frações oligossacarídicas oligo-18 e oligo-D9 foram qualitativamente similares (FIGURA 29b,c, respectivamente). Devido a menor complexidade do espectro de massa do oligo-D9, em relação ao oligo-18, esse foi selecionado para as análises por RMN de COSY, TOCSY e HMQC.

A região anomérica do espectro de RMN de ^{13}C do oligo-D9 apresentou sinais correspondentes as unidades de ramnose 2-ligadas e 2,3-dissubstituídas (δ 102,0), 3-ligadas (δ 103,2) e terminais redutores ($\alpha = \delta$ 95,1, $\beta = \delta$ 94,6). Dentre os acoplamentos presentes na região anomérica do espectro de HMQC dessa fração foram obtidos sinais cruzados que corresponderam as unidades de ramnose 3-ligadas (δ 103,2/4,99, 103,2/5,06). Assim como observado nas análises de RMN das frações polissacarídicas, esses deslocamentos químicos correspondem a unidades de ramnose glicosidicamente substituídas em C-3, as quais se apresentam ligadas

ao C-2 e ao C-3, respectivamente, de outras unidades de ramnose (SENCHENKOVA *et al.*, 1990; OVOD *et al.*, 2004; BEDINI *et al.*, 2006). Através da análise do espectro de COSY foi observado que o sinal em δ 4,99 corresponde também ao H-1 de terminais não redutores de ramnose (H-2 em δ 4,08) (CASTRO *et al.*, 2006), sendo esses valores semelhantes aos verificados nos espectros de RMN do oligo-W (FIGURA 27, p. 130).

No espectro de HMQC o sinal anomérico em δ 102,0 apresentou acoplamento com diferentes prótons anoméricos em δ 5,24, δ 5,34 e δ 5,41, os quais foram identificados como segue. O acoplamento entre H-1/H-2 em δ 5,24/4,08 foi atribuído aos deslocamentos anoméricos das unidades de ramnose glicosiladas em C-2 (δ 79,0) (OVOD *et al.* 2004). Os acoplamentos em δ 5,34/4,23/4,03 e δ 5,41/4,28/4,03 foram atribuídos aos H-1/H-2/H3 de unidades de ramnose 2,3-dissubstituídas. Estas unidades apresentam sinais de C-2 e C-3 em δ 80,1 e 77,6 e em 79,7 e 77,6, respectivamente. A ausência de sinais em δ ~4,60–4,70 confirmou que essa fração oligossacarídica não apresenta sulfatação em C-2 (KOLENDER *et al.*, 1997), reforçando assim que os sinais de H-1 em δ 5,34 e δ 5,41 referem-se as unidades 2,3-dissubstituídas.

Adicionalmente, foram assinalados os deslocamentos químicos correspondentes aos carbonos (C-1–C5) e prótons (H-1–H-5) de terminais não redutores de ácidos urônicos em: δ 105,4/74,4/76,6/73,3/77,3 e δ 4,60/3,39/3,53/3,51/3,70, respectivamente.

Desta forma, foi possível sugerir que o decassarídeo oligo-D9 é constituído pela estrutura apresentada na Figura 32, ressaltando-se que a mesma é representativa das unidades de ramnose e ácido glucurônico identificadas por análises de RMN, embora não seja possível determinar a exata distribuição de tais unidades no oligossacarídeo. Assim, o oligo-D9 possui pelo menos duas unidades de ramnose 2,3-dissubstituída (H-1 em δ 5,34 e δ 5,41), as quais provavelmente encontram-se ramificadas por terminais não redutores de ácido glucurônico (2 unidades), além de apresentar ramnose 2-ligada (1 ou 2 unidades) e 3-ligada (2 ou 3 unidades), ramnose redutora (1 unidade) e terminal não redutor desse monossacarídeo (1 unidade).

Este resultado demonstra que para cada quatro unidades de ramnose há um ponto de ramificação, relação similar ao grau de ramificação determinado na heteroramnana Go3r (um ponto de ramificação para cada cinco unidades de ramnose).

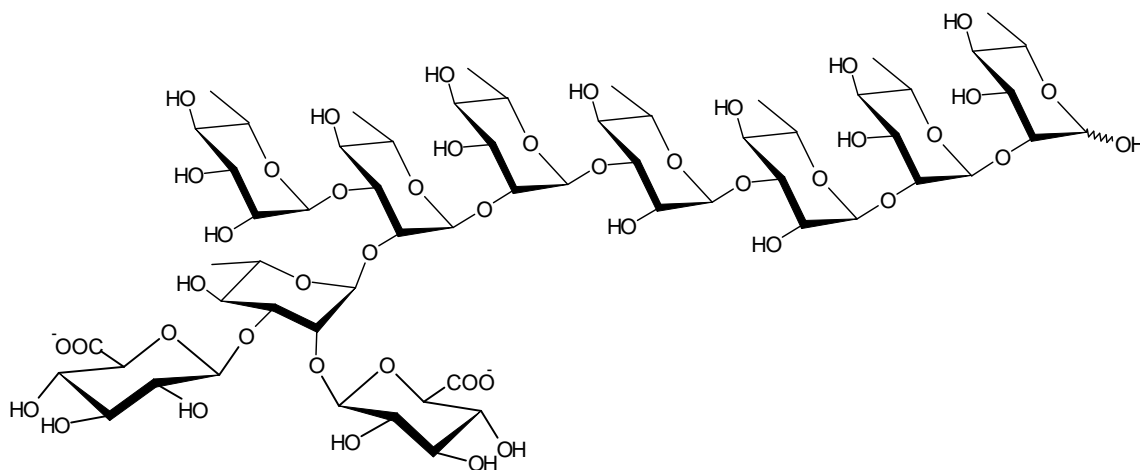


FIGURA 32 – ESTRUTURA ESQUEMÁTICA DO DECASSACARÍDEO PRESENTE NA FRAÇÃO oligo-D9

4.5 ATIVIDADE ANTIVIRAL DAS HETERORAMNANAS SULFATADAS ISOLADAS DE *G. oxysperma*

4.5.1 Teste de Citotoxicidade das Heteroramnanas Go3, Go3r e Go4

As frações polissacarídicas que apresentaram maior rendimento pelo processo de extração aquosa Go3 e Go4, assim como a heteroramnana purificada Go3r, foram inicialmente testadas quanto a sua citotoxicidade através do teste de viabilidade das células Vero quando tratadas com esses polissacarídeos. Durante a realização do teste de citotoxicidade, assim como da atividade antiviral das heteroramnanas, a heparina foi simultaneamente testada como polissacarídeo de referência.

A partir desse teste foi observado que nenhum dos polímeros obtidos de *G. oxysperma* apresentou efeito sobre a viabilidade das células Vero, mesmo em concentrações maiores que 1.000 µg/mL. Esse resultado é semelhante ao obtido em vários estudos que avaliam a atividade antiviral de polissacarídeos de algas verdes. LEE *et al.* (2004) avaliaram os polissacarídeos obtidos de 11 espécies de clorófitas pertencentes a diferentes ordens e não observaram citotoxicidade desses polímeros sobre células Vero mesmo em concentrações acima de 900 µg/mL.

4.5.2 Teste da Atividade Antiviral das Heteroramnanas Contra HSV-1 e HSV-2

Após ser verificada a ausência de citotoxicidade das frações polissacarídicas Go3, Go3r e Go4, elas foram ensaiadas quanto as suas atividades antivirais contra os vírus HSV-1 cepa F e HSV-2 cepa MS, pelo método de redução do número de placas virais em células Vero.

Os dados apresentados na Tabela 21 demonstram que todas as frações testadas exibiram potente atividade antiherpética *in vitro*, com valores de IC₅₀ na faixa de 0,27 a 0,3 µg/mL para o vírus HSV-1 e valores dez vezes menores (entre

0,036 e 0,054 $\mu\text{g/mL}$) para o HSV-2, demonstrando que as heteroramnanas estudadas são capazes de inibir a multiplicação desses dois vírus. Testada simultaneamente como uma substância de referência, a heparina foi cerca de dez vezes menos efetiva contra os vírus HSV-1 e HSV-2, quando comparada aos polissacarídeos de *G. oxysperma*.

As heteroramnanas sulfatadas obtida de *G. oxysperma* apresentaram elevados índices de seletividade ($\text{IS} = \text{CC}_{50}/\text{CI}_{50}$), na ordem de >3.333 a >27.778 , demonstrando a especificidade do efeito inibitório desses polímeros contra o vírus herpes simplex.

TABELA 21 – ATIVIDADE ANTIVIRAL DAS FRAÇÕES Go3, Go3r E Go4 OBTIDAS DE *G. oxysperma*

Frações	CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$) ^a		IS ($\text{CC}_{50}/\text{IC}_{50}$) ^b	
	HSV-1 (F)	HSV-2 (MS)	HSV-1 (F)	HSV-2 (MS)
Go3	$0,30 \pm 0,15$	$0,054 \pm 0,006$	> 3333	> 18518
Go3r	$0,27 \pm 0,03$	$0,036 \pm 0,001$	> 3704	> 27778
Go4	$0,28 \pm 0,12$	$0,037 \pm 0,001$	> 3571	> 27027
Heparina ^c	$1,30 \pm 0,1$	$0,50 \pm 0,1$	> 769	> 2000

^a CI_{50} (concentração inibitória 50%): concentração necessária para reduzir em 50% o número de placas em células Vero. Cada valor é a média de duas determinações \pm SD; ^b IS (índice de seletividade): $\text{CC}_{50}/\text{IC}_{50}$. CC_{50} (concentração citotóxica 50%): concentração necessária para reduzir 50% do número de células Vero viáveis. Esta concentração foi $> 1000 \mu\text{g/mL}$ para todas as frações testadas. ^c Heparina incluída como substância de referência.

Polissacarídeos sulfatados obtidos de diferentes gêneros de algas verdes, como *Enteromorpha*, *Monostroma*, *Caulerpa*, *Chaetomorpha* e *Codium* (GHOSH *et al.*, 2004; LEE *et al.*, 2004), também apresentaram atividade antiherpética. A ramnana sulfatada isolada de *Monostroma latissimum* apresentou potente atividade antiviral contra diferentes tipos de vírus envelopados, como o citomegalovírus humano ($\text{IS} = 2180 \pm 170$), HIV-1 ($\text{IS} = 1740 \pm 255$) e HSV-1 ($\text{IS} = 8100 \pm 98$). Nesse trabalho foi verificado que a ramnana sulfatada além de inibir a adsorção do vírus à

célula hospedeira, interfere também com etapas posteriores da replicação viral (LEE *et al.*, 1999).

A atividade antiherpética dos polissacarídeos sulfatados está relacionada com suas características aniônicas assim como sua massa molecular (KOLENDER, MATULEWICZ e CERZO, 1995). Além disso, já foi relatado que o caráter hidrofóbico dos açúcares que constituem esses polímeros são importantes para sua atividade antiviral (DUARTE *et al.*, 2004). Levando em consideração o exposto acima, a heteroramnana sulfatada Go3r isolada de *G. oxysperma* apresenta uma combinação desses fatores estruturais que determinam a atividade antiviral de um polissacarídeo, tais como alta massa molecular e elevado conteúdo de grupos sulfato, onde 75% e 80% das unidades de ramnose e de ácido urônico, respectivamente, são substituídos por grupos sulfato. Aliado a essas características o caráter hidrofóbico do grupo metil das unidades de ramnose é um fator adicional que poderia contribuir para a alta e específica atividade antiherpética desses polissacarídeos.

4.6 CARACTERIZAÇÃO GERAL DAS ULVANAS EXTRAÍDAS DE *Ulva lactuca* E *U. fasciata*

As algas verdes *U. lactuca* e *U. fasciata* foram coletadas no litoral de Santa Catarina (Florianópolis - Setembro de 2004 e Junho de 2005, respectivamente). Os polissacarídeos de *U. fasciata* foram obtidos por extração em autoclave (condições gerais), realizado pela Mestra Roberta Paulert (Departamento de Biotecnologia da UFSC), e cedidos para estudo de sua estrutura química, sendo o extrato bruto denominado Uf. A alga *U. lactuca* foi extraída com a mesma metodologia utilizada para extração dos polissacarídeos de *G. oxysperma* (FIGURA 33). Em resumo, a alga seca e moída foi submetida a extrações aquosas seqüenciais, duas a 25 °C e quatro a 80 °C, o sobrenadante das mesmas foi tratado com etanol e o precipitado foi dialisado e liofilizado. Assim, foram obtidas as frações brutas Uv1, Uv2 (extrações a 25 °C), Uv3–Uv6 (extrações a 80 °C). A fração de maior rendimento Uv2 foi adicionalmente tratada com KCl 2 M, para remoção das proteínas presentes na amostra, sendo que ao material solúvel foi mantido o nome da fração original e o material insolúvel foi descartado (33,0% de proteína).

A alga *U. fasciata* apresentou maior rendimento quando comparada a *U. lactuca*, sendo esse de 30% para a primeira e 21% para a segunda (TABELA 22). O rendimento obtido para *U. lactuca* é similar ao obtido por outros autores para a mesma espécie (~20%; BRADING, GEORG-PLANT e HARDY, 1954; PERCIVAL e WOLD, 1963). Os teores de carboidratos e grupos sulfato mantiveram-se aproximadamente constantes em todas as extrações realizadas com a alga *U. lactuca* (TABELA 22). O teor desses dois compostos é maior em *U. fasciata* e, ao contrário, o teor de ácidos urônicos é menor nessa última. As porcentagens de grupos sulfato observados nos polissacarídeos brutos obtidos das espécies do gênero *Ulva* em estudo foram semelhantes aos dos polissacarídeos obtidos para outras algas da ordem Ulvales (TABELA 1, p. 33). Os resultados de grau de sulfatação das frações de *U. lactuca* são semelhantes aos obtidos por BRADING, GEORG-PLANT e HARDY (1954) (16%) e PERCIVAL e WOLD (1963) (15%), quando analisaram a mesma alga, porém o conteúdo de ácidos urônicos obtido por esses autores foi menor (~19%) que o observado nesse trabalho.

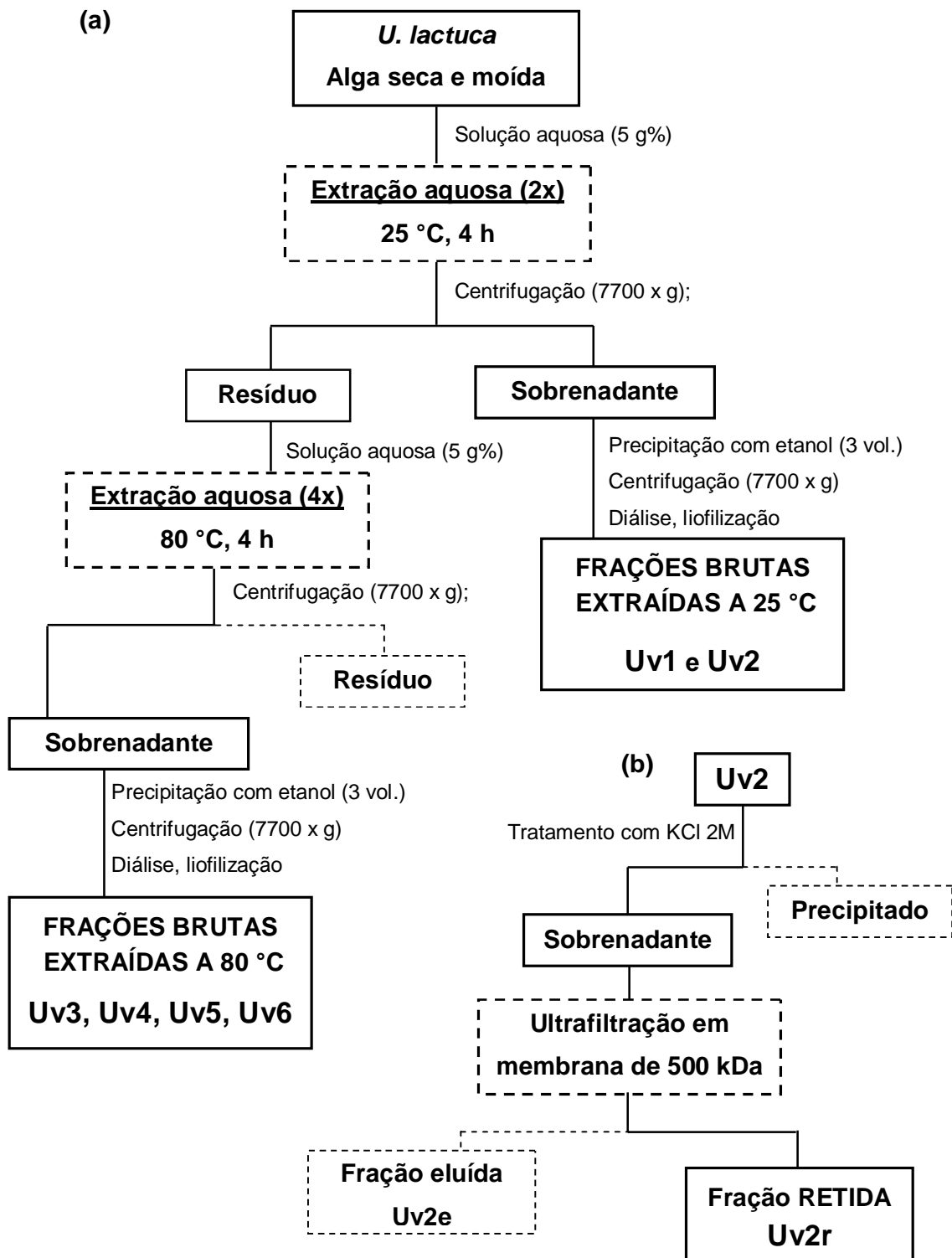


FIGURA 33 – ESQUEMA DE EXTRAÇÃO (a) E FRACIONAMENTO (b) DOS POLISSACARÍDEOS SINTETIZADOS PELA ALGA VERDE *U. lactuca*

TABELA 22 – RENDIMENTOS E ANÁLISES QUÍMICAS DAS FRAÇÕES BRUTAS OBTIDAS DE *U. lactuca* (Uv) E *U. fasciata* (Uf)

Fração ^a	Rendimento ^b	Açúcar Total ^c	Sulfato ^d	Ácido Urônico ^e	Proteína ^f
	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
Uv1	4,3	47,1	20,3	32,3	7,9
Uv2	7,7	62,1	20,3	37,5	7,9
Uv3	5,9	48,0	19,8	32,3	7,5
Uv4	1,0	47,2	16,7	30,3	12,5
Uv5	1,8	43,6	15,3	19,9	12,5
Uv6	0,6	40,7	18,5	30,1	n.d.
Uf	30,0	60,9	27,5	25,2	6,8

n.d. = não determinado; ^a frações obtidas por extrações aquosas: a 25 °C (Uv1, Uv2); a 80 °C (Uv3–Uv6); ^b em relação à massa de alga seca e moída submetida a extração aquosa (116,0 g); ^c segundo DUBOIS *et al.* (1956); ^d segundo DODGSON e PRICE (1962); ^e segundo FILISETTI-COZZI e CARPITA (1991); ^f segundo LOWRY *et al.* (1951).

As análises de composição monossacarídica das frações brutas obtidas das algas verdes *U. lactuca* e *U. fasciata* foram realizadas pelo processo de hidrólise total e são apresentados na Tabela 23. Estas apresentaram variação na constituição monossacarídica, porém em ambas o principal monossacarídeo foi a ramnose (48,5–68,8 mol%). As frações brutas também apresentaram, em diferentes proporções, unidades de glucose (10,3–34,1 mol%), xilose (10,7–26,1 mol%), galactose (2,2–3,5 mol%) e manose (1,7–7,5 mol%), sendo que esses dois últimos não foram encontrados em *U. fasciata*. Os teores de xilose foram maiores para a fração Uf (26,1 mol%). As análises químicas aliadas aos dados de composição monossacarídica mostram que as duas espécies em estudos sintetizam glicuronoxiloramnanas denominadas **ulvanas** (LAHAYE e AXELOS, 1993). Essa variação na composição monossacarídica dos polissacarídeos obtidas de algas do gênero *Ulva* foi observada por outros autores, sendo que Lahaye (1998) identificou que ulvanas extraídas da mesma espécie (*U. rigida*), porém de regiões diferentes, apresentavam diferentes distribuições de xilose e ácido glucurônico na cadeia

polissacarídica (TABELA 2, p. 36). Apesar dos elevados teores de glucose encontrados em todas as frações brutas obtidas de *U. lactuca* e *U. fasciata*, no RMN de ^{13}C dessas frações não foram verificados sinais referentes ao C-6 livre de hexoses. Desta forma, a glucose presente nas frações pode corresponder a um polímero insolúvel nas condições utilizadas para análise de RMN de ^{13}C , enquanto que são passíveis de hidrólise em meio ácido, o que promoveria a sua quantificação nas análises monossacarídicas. Durante a caracterização dos polissacarídeos sintetizados por *U. rigida* Ray e Lahaye (1995) obtiveram frações ricas em glucose somente quando realizaram extrações com hidróxido de potássio, sendo que nesse caso essa hexose foi identificada como constituinte de uma xiloglucana. Dessa forma, não foi possível afirmar se a glucose é constituinte ou não das ulvanas biossintetizadas por *U. lactuca* e *U. rigida*.

As frações Uv2–Uv4 e Uf foram submetidas a análise por HPSEC-MALLS-IR para avaliação do seu perfil de homogeneidade e os cromatogramas são apresentados na Figura 34. É possível observar que todas as frações apresentam um perfil heterogêneo em relação a massa molecular, sendo que da fração Uf foi obtido um cromatograma mais complexo, sugerindo que a mesma é mais heterogênea que as frações de *U. lactuca*.

Desde que a fração Uf foi estudada quanto a sua atividade biológica sem ser previamente submetida a processos de purificação (PAULERT, 2005), sua estrutura química também foi avaliada sem a realização de tal processo. Por sua vez, a fração de maior rendimento obtida de *U. lactuca* (Uv2) foi submetida a filtração em membrana de 500 kDa como descrito no item 3.4, sendo obtido um material retido na membrana (denominado Uv2r) e um material eluído (denominado Uv2e), cujos perfis cromatográficos em HPSEC, obtidos a partir do detector IR, são apresentados na Figura 35 e seus rendimentos e análises químicas na Tabela 24 (p. 151).

TABELA 23 – MONOSSACARÍDEOS NEUTROS PRESENTES NAS FRAÇÕES BRUTAS OBTIDAS DE *U. lactuca* (U) E *U. fasciata* (Uf)

Fração	Monossacarídeos (mol%) ^a				
	Ram ^b	Xil	Glc	Gal	Man
Uv1	55,2	10,8	23,3	3,1	7,5
Uv2	68,8	11,1	10,3	3,5	6,3
Uv3	63,0	14,3	13,7	3,0	2,4
Uv4	52,1	10,7	32,1	2,4	2,7
Uv5	48,5	13,6	34,1	2,2	1,7
Uv6	57,9	11,0	25,7	3,4	2,0
Uf	51,1	26,1	22,8	—	—

— não detectado; ^a monossacarídeos quantificados na forma de acetatos de alditóis; ^b abreviatura dos monossacarídeos: Ram= ramnose; Xil= xilose; Glc= glucose; Gal= galactose; Man= manose.

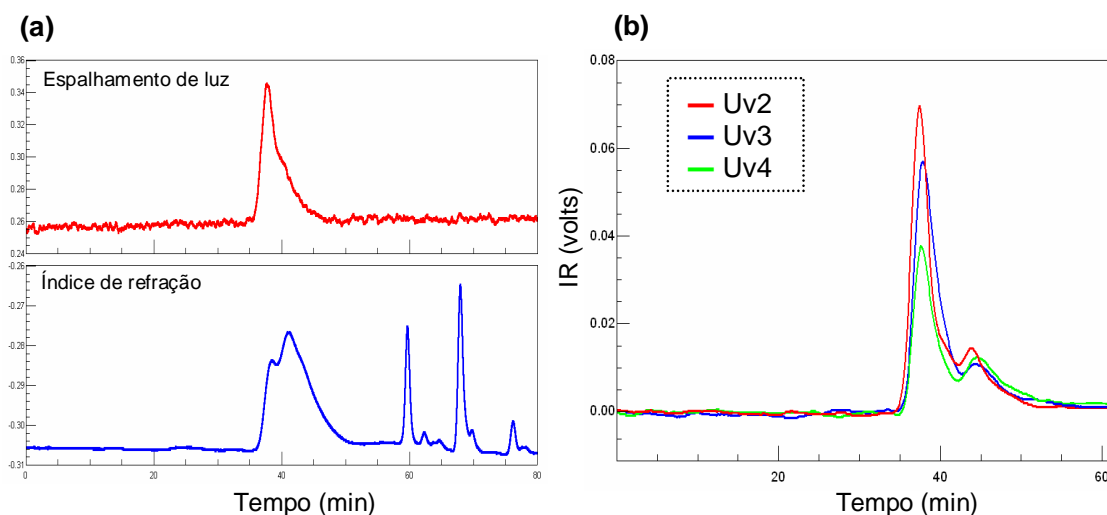


FIGURA 34 – PERFIL DE ELUIÇÃO EM HPSEC DAS FRAÇÕES BRUTAS Uf OBTIDA DE *U. fasciata* (a) E Uv2–Uv4 OBTIDAS DE *U. lactuca* (b)

Nota-se no cromatograma das frações retida e eluída uma grande diferença nos tempos de eluição, assim como no perfil cromatográfico, sendo que a fração

Uv2r apresentou um perfil menos heterogêneo que o obtido para a fração que lhe deu origem Uv2. Dessa forma, Uv2r foi considerada parcialmente purificada em termos de massa molecular, e a caracterização dos polissacarídeos de *U. lactuca* foi conduzida pelo estudo dessa fração. Uv2r e Uv2e apresentaram características químicas semelhantes, entre si e com a fração original, sendo que as maiores diferenças observadas foram os teores de proteína, os quais são menores na fração Uv2r (1,8%) e a composição monossacarídica, desde que a filtração conduziu a um acúmulo da manose (20,7 mol%) na fração Uv2e (TABELA 25).

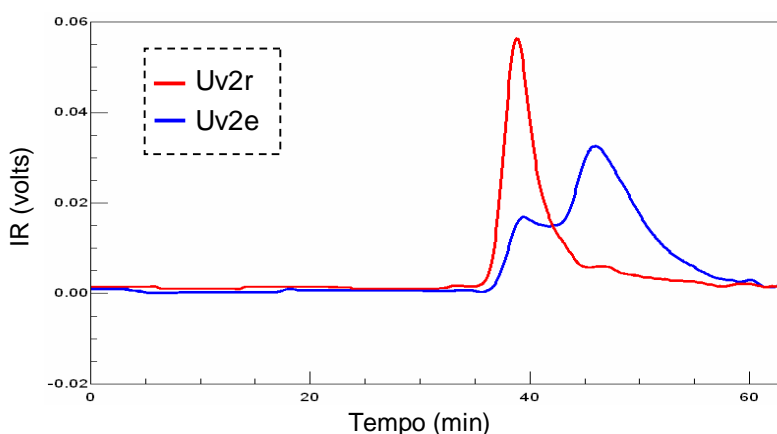


FIGURA 35 – PERFIL DE ELUIÇÃO EM HPSEC COM DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO DAS FRAÇÕES Uv2r E Uv2e

A fração retida na membrana de 500 kDa é majoritariamente constituída por ramnose (70,8 mol%), além de xilose (12,0 mol%) e glucose (11,1 mol%) em porcentagens semelhantes. Assim, a fração nativa Uv2r difere da fração nativa Uf por apresentar maiores teores de ramnose e menores teores de xilose e glucose (TABELA 25). Além disso, esta última apresenta menores porcentagens de ácidos urônicos que a primeira, o que indica diferença estrutural entre as duas ulvanas em estudo (TABELA 22 e 24, p. 146 e 151).

Para investigar o tipo de ácido urônico presente na fração Uv2r, esta foi submetida ao processo de carboxi-redução em escala preparativa, para posterior análise de RMN de ^{13}C (na presença de NaBH_4) e em escala analítica, na qual a redução foi realizada na presença de NaBD_4 , para quantificação e identificação exatas dos ácidos urônicos presentes na mesma. Os produtos de carboxi-redução foram denominados Uv2r-R. Como pode ser observado na Tabela 25, a fração carboxi-reduzida Uv2r-R apresenta teores de ramnose (49,4 mol%) e xilose (9,3 mol%) menores que os obtidos para Uv2r, não apresentando galactose e manose em sua constituição. Conseqüentemente houve aumento nas porcentagens de glucose (11,1→37,2 mol%), resultado esse que demonstra a presença de ácido glucurônico na amostra obtida de *U. lactuca*. Análise por CLG-EM demonstrou que glucitol hexaacetato, obtido entre os produtos de hidrólise, redução e acetilação de Uv2r-R, apresentava os fragmentos com m/z 217 e 219 (FIGURA 13, p. 93). A partir da porcentagem relativa destes íons foi determinado que 30% e 70% do glucitol hexaacetato correspondiam a glucose e ácido glucurônico, respectivamente, no polímero original. Esses resultados indicam que 26,0 mol% da glucose, detectada entre os produtos de hidrólise da fração carboxi-reduzida, foram proveniente dos ácidos urônicos reduzidos a glucose (TABELA 25). Adicionalmente, a análise por CLG-EM demonstrou a presença de 2,3,4-tri-O-acetil-1,6-anidro-hexose, que foi atribuída a presença de idose nessa fração (4,1 mol%, TABELA 25). O ácido idurônico está presente nos polissacarídeos obtidos de algas do gênero *Ulva* e foi relatado pela primeira vez por Quemener, Lahaye e Bobin-Dubigeon (1997), quando esses autores desenvolveram uma metodologia para quantificação dos ácidos urônicos por HPLC (TABELA 3, p. 40). Neste trabalho foi relatado que a ulvana obtida de *U. lactuca* apresentava 3,7% de ácido idurônico (em relação a massa de ulvana seca analisada). Para Uv2r-R a porcentagem de ácido idurônico foi calculado levando-se em consideração que em meio ácido a idose encontra-se em equilíbrio com seu correspondente 1,6-anidro-derivado na relação de 6,1:1,0, respectivamente. Desta forma, corrigindo os teores de idose para 100%, Uv2r-R contém 4,8 mol% de ácido idurônico. Como discutido no item 4.1.3.1, nenhuma das frações carboxi-reduzidas obtidas de *G. oxysperma* apresentaram ácido idurônico, sendo esse mais um ponto de diferenciação entre as ulvanas e as heteroramnanas sulfatadas estudadas nesse trabalho.

TABELA 24 – RENDIMENTOS E ANÁLISES QUÍMICAS DAS FRAÇÕES Uv2e, Uv2r, Uv2r-R, Uv2r-RD e Uf-D

Fração	Rendimento (%)	Açúcar Total ^a (%)	Sulfato ^b (%)	Ácido Urônico ^c (%)	Proteína ^d (%)
Uv2 ^e	7,7	62,1	20,3	37,5	7,9
Uv2e	37,0 ^f	64,6	24,4	52,0	4,5
Uv2r	63,0 ^f	62,1	16,2	32,0	1,8
Uv2r-R	60,4 ^g	n.d.	n.d.	4,2	n.d.
Uv2r-RD	64,0 ^g	n.d.	5,0	n.d.	n.d.
Uf ^e	30,0	60,9	27,5	25,2	6,8
Uf-D	63,3 ^g	n.d.	9,7	n.d.	n.d.

n.d. = não determinado; ^a segundo DUBOIS *et al.* (1956); ^b segundo DODGSON E PRICE (1962); ^c segundo FILISETTI-COZZI e CARPITA (1991); ^d segundo LOWRY *et al.* (1951); ^e frações incluídas com fins comparativos; ^f em relação ao material recuperado após ultrafiltração. Rendimento da ultrafiltração foi de 85%; ^g em relação a massa utilizada nas respectivas modificações químicas.

TABELA 25 – MONOSSACARÍDEOS NEUTROS PRESENTES NAS FRAÇÕES Uv2e, Uv2r, Uv2r-R, Uv2r-RD E Uf-D

Fração	Monossacarídeos (mol%) ^a					
	Ram ^b	Xil	Glc	1,6-anidro-idose	Gal	Man
Uv2 ^c	68,8	11,1	10,3	—	3,5	6,3
Uv2e	48,5	12,2	12,7	—	5,8	20,7
Uv2r	70,8	12,0	11,1	—	3,9	2,2
Uv2r-R	49,4	9,3	37,2	4,1	—	—
Uv2r-RD	50,5	10,0	35,7	3,8	—	—
Uf ^c	51,1	26,1	22,8	—	—	—
Uf-D	49,4	32,8	17,5	—	—	—

— = não detectado; ^a monossacarídeos quantificados na forma de acetatos de alditóis; ^b abreviatura dos monossacarídeo: Ram= ramnose; Xil= xilose; Glc= glucose; Gal= galactose; Ara=arabinose; Man= manose; ^c frações incluídas com fins comparativos.

Dando seqüência ao estudo das ulvanas extraídas de *U. lactuca* e *U. fasciata* as frações Uv2r-R e Uf foram submetidas ao processo de dessulfatação solvolítica para remoção dos grupos sulfato e simplificação da estrutura polissacarídica, obtendo-se com isso as frações dessulfatadas, que foram denominadas Uv2r-RD e Uf-D. Essas frações continham 5,0% e 9,7% de grupos sulfato após o processo solvolítico, havendo assim uma dessulfatação de 69% e 65%, respectivamente. As frações parcialmente dessulfatadas apresentaram composição monossacarídica semelhante a das frações originais (TABELA 25), o que demonstrou que não houve degradação dos polissacarídeos durante tal procedimento.

Após as caracterizações químicas e monossacarídicas, a fração retida em membrana de 500 kDa (Uv2r) e seus produtos de carboxi-redução (Uv2r-R) e carboxi-redução/dessulfatação (Uv2r-RD), assim como a fração Uf e seu produto de dessulfatação (Uf-D), foram analisadas por RMN de ^{13}C (FIGURAS 36 e 37, p. 155 e 156). Os deslocamentos químicos das principais díades presentes nas frações acima referidas foram assinalados e são apresentados na Tabela 26, sendo suas estruturas apresentadas na Figura 38 (p. 158). Para o assinalamento desses espectros foram utilizadas as referências presentes na Tabela 3 (p. 40).

Os espectros de RMN de ^{13}C das frações Uv2r e Uf apresentaram variação em seus deslocamentos químicos, confirmando a diferença das estruturas dissacarídicas que compõem essas ulvanas (FIGURAS 36a e 37a, p. 155 e 156). O espectro da ulvana nativa Uv2r apresentou dois sinais principais na região anomérica em δ 104,4 e δ 101,1, os quais foram atribuídos aos C-1 da díade [\rightarrow 4)- β -D-GlcpA-(1 \rightarrow 4)- α -L-Ramp 3S-(1 \rightarrow)]], denominada ácido ulvanobiurônico 3-sulfato A (LAHAYE, BRUNEL e BONNIN, 1997). Os sinais correspondentes a essa estrutura dissacarídica também foram identificados no espectro da fração Uf obtida de *U. fasciata* (FIGURA 37a, p. 156).

No espectro de Uv2r (FIGURA 37a, p. 156) sinais anoméricos de baixa intensidade em δ 100,5 e 99,3 foram atribuídos a díade [\rightarrow 4)- β -D-Xilp 2S-(1 \rightarrow 4)- α -L-Ramp 3S-(1 \rightarrow)]. O sinal correspondente ao C-2 sulfatado das unidades de xilose 4-ligadas foi observado em δ 78,5, o que está de acordo com dados de literatura que atribuem os deslocamentos químicos na região de δ 78,5–78,8 ao C-2 sulfatado de

tais unidades (LAHAYE, 1998). De modo similar, o espectro de RMN de Uf também apresentou sinais correspondentes àquela díade. Adicionalmente, o espectro de Uf (FIGURA 37a, p. 156) apresenta deslocamentos químicos em δ 104,8 e δ 98,9, atribuídos a estrutura dissacarídica formada por $[\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-D-Xilp-(1}\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-L-Ramp 3S-(1}\rightarrow]$. Os demais deslocamentos químicos correspondentes as díades acima descritas foram assinalados e são apresentados na Tabela 26.

No espectro de RMN de ^{13}C da fração carboxi-reduzida Uv2r-R (FIGURA 36b, p. 155) houve o aparecimento dos sinais correspondentes ao C-6 livre de hexoses (δ 60,7–61,8), com concomitante desaparecimento do sinal em δ 175,9 (carboxila dos ácidos urônicos) confirmando assim a eficiência da carboxi-redução. A região anomérica desse espectro apresenta sinais em δ 104,1 e δ 101,5, correspondentes ao C-1 da díade $[\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-L-Ramp 3S-(1}\rightarrow]$, resultado da carboxi-redução do ácido glucurônico presente na ulvana original. Nesse espectro os sinais em δ 79,5, δ 79,1 e δ 78,9 foram atribuídos ao C-3 e C-4 das unidades de ramnose 4-ligada 3-sulfato e ao C-4 das unidades de glucose (ácido glucurônico carboxi-reduzido), respectivamente. Os demais sinais correspondentes a essa díade estão apresentados na Tabela 26. Devido a alta relação sinal ruído não foi possível identificar os sinais referentes a díade constituída por unidades de xilose 2-sulfato e ramnose 3-sulfato.

A fração carboxi-reduzida foi submetida a solvólise e o espectro de ^{13}C do produto dessulfatado Uv2r-RD (FIGURA 36c, p. 155) apresentou dois sinais principais na região anomérica em δ 104,3 e δ 101,8 atribuídos a díade $[\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-L-Ramp-(1}\rightarrow]$ (ácido glucurônico carboxi-reduzido), respectivamente. Após dessulfatação o sinal de C-3 das unidades de ramnose aparecem em δ 71,5, o que está de acordo com o efeito α (+7,8 ppm) ocasionado pela presença de sulfato em C-3 (δ 79,5) no polímero sulfatado. O sinal em δ 82,4 foi atribuído ao C-4 das unidades de ramnose, o que está de acordo com o deslocamento deste carbono para campo mais baixo após dessulfatação. Em menor intensidade, sinais anoméricos em δ 105,0 e δ 99,2 (FIGURA 36c, p. 155) foram atribuídos a díade $[\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-D-Xilp-(1}\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-L-Ramp-(1}\rightarrow]$, respectivamente, formada pela dessulfatação do dissacarídeo constituído por unidades de xilose 2-sulfato e ramnose 3-sulfato.

Na região anomérica do espectro de RMN de ^{13}C da fração Uf-D (FIGURA 37b, p. 156) foi observado a presença dos sinais em δ 104,3 e δ 101,6, atribuídos ao C-1 das unidades de ácido glucurônico 4-ligado e ramnose 4-ligada. Os sinais correspondentes ao C-4 ligado destas últimas foram observados em δ 82,1–82,4, sendo que o C-3 livre aparece em campo mais alto em δ 71,4, semelhante ao obtido na análise do espectro da fração Uv2r-RD. Adicionalmente, na região anomérica de Uf-D são verificados sinais de alta intensidade em δ 105,1 e δ 99,1 atribuídos a díade dessulfatada composta por $[\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-D-Xilp}\text{-}(1\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-L-Ramp}\text{-}(1\rightarrow)]$. A permanência dos pares de sinais em δ 104,6/100,9 e δ 105,1/98,8, correspondentes aos C-1 dos dissacarídeos $[\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-D-GlcpA}\text{-}(1\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-L-Ramp}$ 3S-(1 \rightarrow)] e $[\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-D-Xilp}\text{-}(1\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-L-Ramp}$ 3S-(1 \rightarrow)]), respectivamente, estão de acordo com a parcial dessulfatação desse polímero, o qual permanece com 9,7% de grupos sulfato (TABELA 24, p. 151).

A partir dos dados obtidos por análises químicas, monossacarídicas e de RMN foi possível identificar os polissacarídeos extraídos das clorófitas *U. lactuca* e *U. fasciata* como ulvanas. As ulvanas Uv2r e Uf são majoritariamente constituída pela díade $[\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-D-GlcpA}\text{-}(1\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-L-Ramp}$ 3S-(1 \rightarrow)]. Ainda, a ulvana Uf contém as díades $[\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-D-Xilp}\text{-}(1\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-L-Ramp}$ 3S-(1 \rightarrow)] e $[\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-D-Xilp}$ 2S-(1 $\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-L-Ramp}$ 3S-(1 \rightarrow)], enquanto que Uv2r contém somente esta última (FIGURA 38, p. 158). Esses dados demonstraram que as ulvanas produzidas por *U. lactuca* e *U. fasciata* apresentam diferenças na composição e distribuição de suas unidades dissacarídicas, o que havia sido identificado através dos estudos das estruturas químicas de diferentes espécies de algas do gênero *Ulva* (TABELA 2, p. 36).

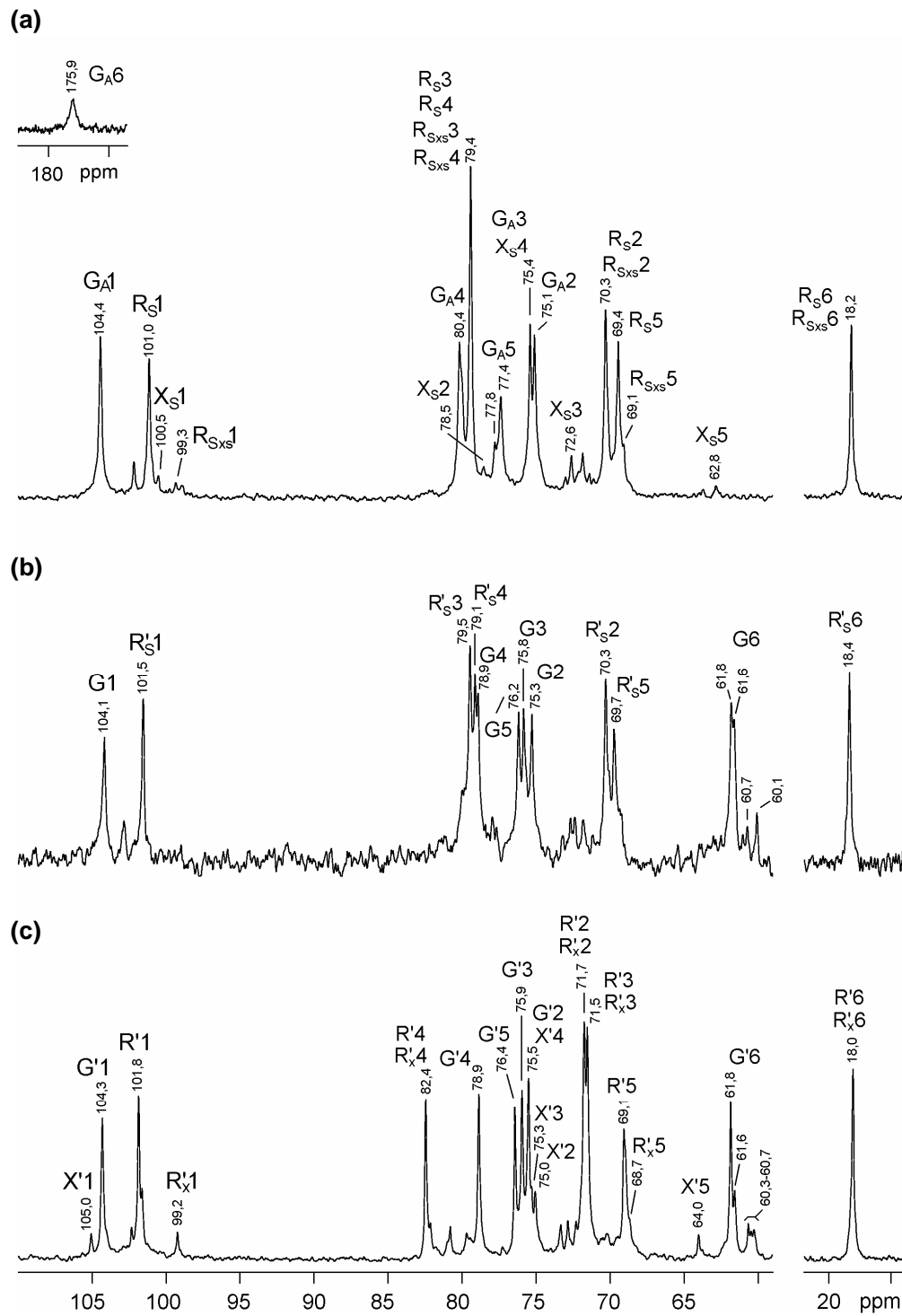


FIGURA 36 – ESPECTROS DE RMN DE ^{13}C DAS FRAÇÕES Uv2r (a), Uv2r-R (b) E Uv2r-RD (c)

Solvente: D_2O (70 °C); acetona como padrão interno (δ 31,45); ver FIGURA 38.

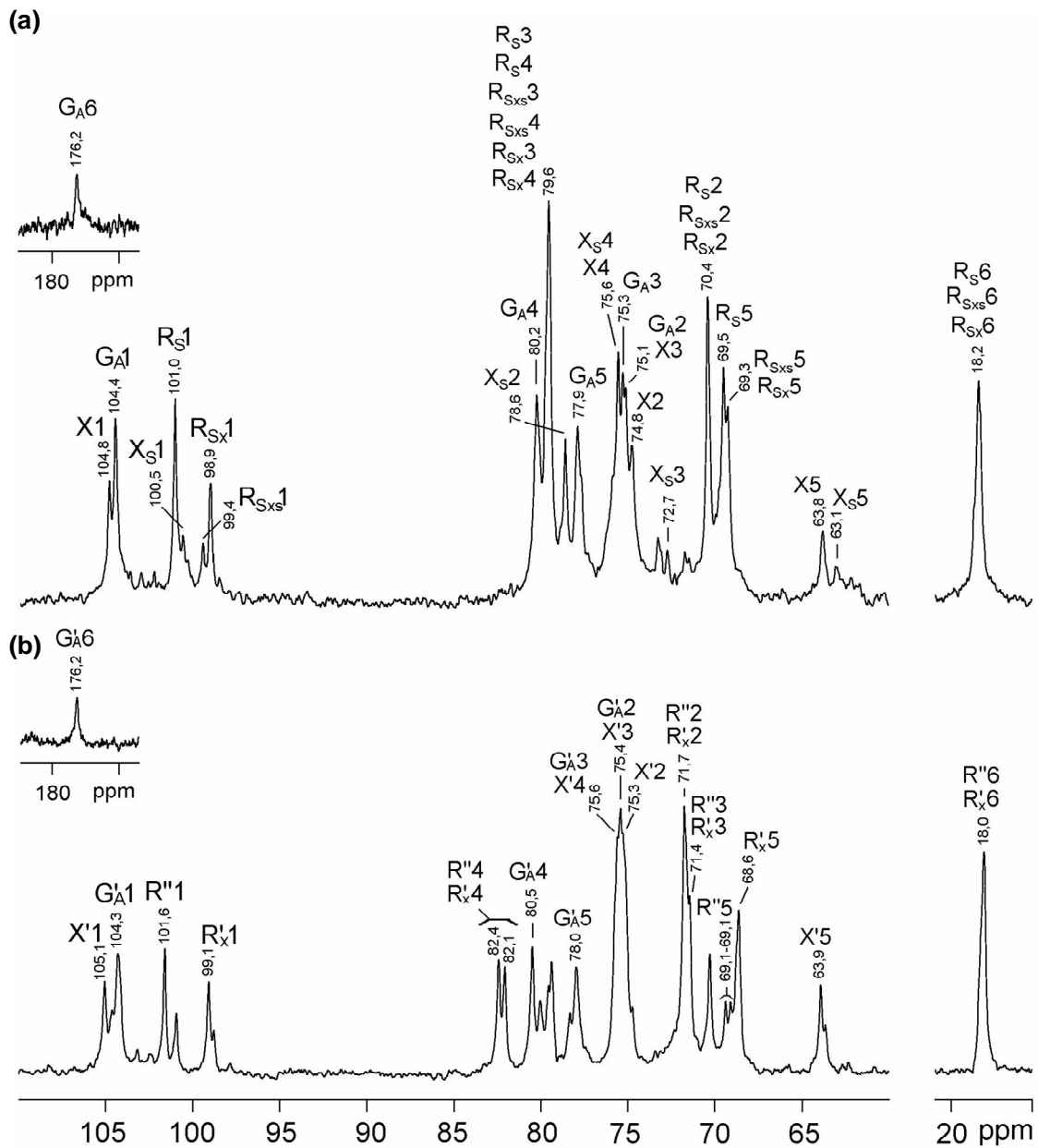


FIGURA 37 – ESPECTROS DE RMN DE ^{13}C DAS FRAÇÕES Uf (a) E Uf-D (b)

Solvente: D_2O (70 °C); acetona como padrão interno (δ 31,45); ver FIGURA 38.

TABELA 26 – DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DAS PRINCIPAIS UNIDADES DISSACARÍDICAS OBTIDAS POR RMN DE ^{13}C DAS FRAÇÕES Uv2r, Uv2r-R, Uv2r-RD, Uf E Uf-D

Frações	Díades ^a	Deslocamentos químicos (ppm)											
		C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
Uv2r	$\mathbf{G}_A \rightarrow \mathbf{R}_S$	104,4	75,1	75,4	80,2	77,4/77,8	175,9	101,0	70,3	79,4	79,4	69,4	18,2
	$\mathbf{X}_S \rightarrow \mathbf{R}_{SxS}$	100,5	78,5	72,6	75,4	62,8		99,3	70,3	79,4	79,4	69,1	18,2
Uv2r-R	$\mathbf{G} \rightarrow \mathbf{R}'_S$	104,1	75,3	75,8	78,9	76,2	60,1-61,8	101,5	70,3	79,5	79,1	69,7	18,4
Uv2r-RD	$\mathbf{G}' \rightarrow \mathbf{R}'$	104,3	75,5	75,9	78,9	76,4	60,3-61,8	101,8	71,7	71,5	82,4	69,1	18,0
	$\mathbf{X}' \rightarrow \mathbf{R}'_x$	105,0	75,0	75,3	75,6	64,0		99,2	71,7	71,5	82,4	68,7	18,0
Uf	$\mathbf{G}_A \rightarrow \mathbf{R}_S$	104,4	75,1	75,3	80,2	77,9	176,2	101,0	70,4	79,6	79,6	69,5	18,2
	$\mathbf{X}_S \rightarrow \mathbf{R}_{SxS}$	100,5	78,6	72,7	75,6	63,1		99,4	70,4	79,6	79,6	69,3	18,2
	$\mathbf{X} \rightarrow \mathbf{R}_{Sx}$	104,8	74,8	75,1	75,6	63,8		98,9	70,4	79,6	79,6	69,3	18,2
Uf-D	$\mathbf{G}'_A \rightarrow \mathbf{R}''$	104,3	75,4	75,6	80,5	78,0	176,2	101,6	71,7	71,4	82,1/82,4	69,1/69,4	18,0
	$\mathbf{X}' \rightarrow \mathbf{R}'_x$	105,1	75,3	75,4	75,6	63,9		99,1	71,7	71,4	82,1/82,4	68,6	18,0

^a abreviatura das unidades dissacarídicas apresentadas na FIGURA 38.

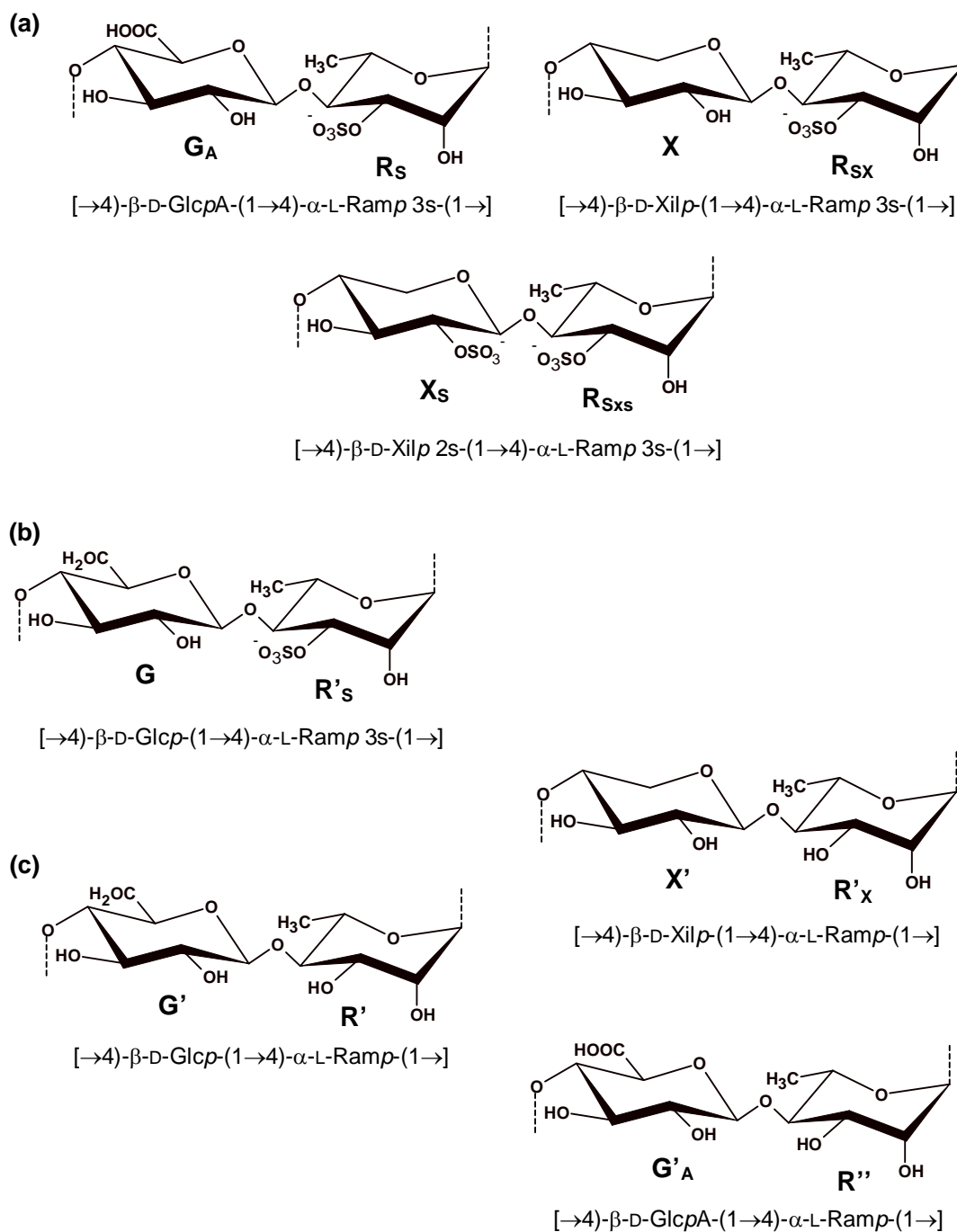


FIGURA 38 – ESQUEMA DAS PRINCIPAIS DÍADES PRESENTES NAS FRAÇÕES Uv2r E Uf (a) E EM SEUS RESPECTIVOS PRODUTOS DE MODIFICAÇÕES QUÍMICAS: Uv2r-R (b) E Uv2r-RD E Uf-D (c)

5. CONCLUSÕES

A alga verde (Chlorophyta) *Gayralia oxysperma* pertencente a ordem Ulvales sintetiza heteroramnanas sulfatadas como principal polissacarídeo solúvel em meio aquoso.

Análises químicas e espectroscópicas conduzidas com uma heteroramnana homogênea (Mw 1.519 kDa) demonstraram a presença majoritária de unidades de α -L-ramnose, as quais se encontram 2,3-dissubstituídas, 3- e 2-ligadas, na proporção de 0,38:1,0:0,43, respectivamente. As unidades de ramnose 3-ligadas estão sulfatadas em C-2 (38%) e C-4 (29%), enquanto aproximadamente 50% das unidades 2-ligadas e 2,3-dissubstituídas estão sulfatadas em C-4.

A seqüência metodológica composta por metilação, dessulfatação e trideuteriometilação do polímero carboxi-reduzido, seguida da análise dos fragmentos de massa por CLG-EM, foi eficaz para a identificação exata dos sítios de sulfatação nas unidades de ramnose presentes na heteroramnana nativa.

Adicionalmente, ácidos glucurônico e galacturônico 2-sulfato são constituintes dessa heteroramnana, os quais foram pela primeira vez descritos em polissacarídeos obtidos de algas verdes.

As heteroramnanas de *G. oxysperma* apresentaram potente e seletiva atividade antiherpética contra o vírus herpes simplex tipo 1 (cepa F) e tipo 2 (cepa MS).

O processo de auto-hidrólise promoveu a dessulfatação parcial dos oligossacarídeos obtidos. Apesar disso, a obtenção de oligossacarídeos ácidos (contendo ácidos urônicos) e neutros foi importante para a confirmação de alguns aspectos estruturais das heteroramnanas obtidas de *G. oxysperma*, sendo eles: presença de ácidos urônicos como constituintes da cadeia polissacarídica e blocos de ramnose contendo a seqüência: $[\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-L-Ram}\rho\text{-}(1\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-L-Ram}\rho\text{-}(1\rightarrow]$.

De modo diferente, as algas verdes pertencentes ao gênero *Ulva* (*U. lactuca* e *U. fasciata*) sintetizam ulvanas constituídas principalmente pelo dissacarídeo ácido: $[\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-D-ácido glucurônico-(1}\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-L-ramnose 3-sulfato-(1}\rightarrow]$, denominado ulvanobiurônico 3-sulfato A.

REFERÊNCIAS

- ALBAN, S. In: Witczak, Z.J.; Nieforth, K.A. (Eds.). **Carbohydrates in Drug Design: Carbohydrates with Anticoagulant and Antithrombotic Properties**. Marcel Dekker, New York, p. 209-276, 1997.
- ANDERSON, M.A.; STONE, B.A. A radiochemical approach to the determination of carboxylic acid groups in polysaccharides. **Carbohydr. Polym.**, v. 5, p. 115-129, 1985.
- BACKINOWSKY, L.V.; BALAN, M.F.; SHASHKOV, A.S.; KOCHETKOV, N.K. Synthesis and ¹³C-N.M.R. spectra of β-L-rhamnopyranosides. **Carbohydr. Res.**, v. 84, p. 225-235, 1980.
- BEDINI, E.; CARABELLESE, A.; COMEGNA, D.; CASTRO, C.; PARRILLI, M. Synthetic oligorhamnans related to the most common O-chain backbone from phytopathogenic bacteria. **Tetrahedron**, v. 62, p. 8474-8483, 2006.
- BeMILLER, J.N. Acid-catalyzed hydrolysis of glycosides. **Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.**, v. 22, p. 25-108, 1967.
- BILAN, M.I.; VINOGRADOVA, E.V.; SHASHKOV, A.S.; USOV, A.I. Structure of a highly pyruvylated galactan sulfate from the Pacific green alga *Codium yezoense* (Bryopsidales, Chlorophyta). **Carbohydr. Res.**, v. 342, p. 586-596, 2007.
- BOCK, K.; PEDERSEN, C.; PEDERSEN, H. Carbon-13 nuclear magnetic resonance data for oligosaccharides. **Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.**, v. 42, p. 193-225, 1990.
- BRADING, J.W.E.; GEORG-PLANT, M.M.T.; HARDY, D.M. The polysaccharide from the alga *Ulva lactuca*. Purification, hydrolysis, and methylation of the polysaccharide. **J. Chem. Soc.**, p. 319-324, 1954.
- BRAGA, M.R.; FUJII, M.T.; CORDEIRO-MARINO, M. Monostromatic green algae (Ulvales, Chlorophyta) of São Paulo and Paraná states (Brazil): distribution, growth and reproduction. **Rev. Bras. Bot.**, v. 20, p. 197-203, 1997.
- CARVALHO, I. S. **Paleontologia**. 2 ed. Interciência, Rio de Janeiro, p. 12-32, 2004.
- CASES, M.R.; CERESO, A.S.; STORTZ, C.A. Separation and quantitation of enantiomeric galactoses and their mono-O-methylethers as their diastereomeric acetylated 1-deoxy-1-(2-hydroxypropylamino) alditols. **Carbohydr. Res.**, v. 269, p. 333-341, 1995.
- CASTRO, C.; CARANNANTE, A.; LANZETTA, R. LIPAROTI, V.; MOLINARO, A.; PARRILLI, M. Core oligosaccharide structure from the highly

phytopathogenic *Agrobacterium tumefaciens* TT111 and conformational analysis of the putative rhamnan epitope. **Glycobiology**, v. 16, p. 1272-1280, 2006.

CASU, B.; GRAZIOLI, G.; RAZI, N.; GUERRINI, M.; NAGGI, A.; TORRI, G.; ORESTE, P.; TURSI, F.; ZOPPETTI, G.; LINDAHL, U. Heparin-like compounds prepared by chemical modification of capsular polysaccharide from *E. coli* K5. **Carbohydr. Res.** 1994, v. 263, p. 271–284, 1994.

CEREZO, A.S.; STACEY, M.; WEBBER, J.M. Some structural studies of brea gum (an exudates from *Cercidium australe* Jonhst.). **Carbohydr. Res.**, v. 9, p. 505-517, 1969.

CHARLES, A.L.; CHANG, C.-K.; WU, M.-L.; HUANG, T.-C. Studies on the expression of liver detoxifying enzymes in rats fed seaweed (*Monostroma nitidum*). **Food Chem. Toxicol.**, v. 45, p. 2390-2396, 2007.

CHATTOPADHYAY, K.; ADHIKARI, U.; LEROUGE, P.; RAY, B. Polysaccharides from *Caulerpa racemosa*: purification and structural features. **Carbohydr. Polym.**, v. 68, p. 407-415, 2007a.

CHATTOPADHYAY, K.; MANDAL, P.; LEROUGE, P.; DRIOUICH, A.; GHOSAL, P.; RAY, B. Sulphated polysaccharides from Indian samples of *Enteromorpha compressa* (Ulvaes, Chlorophyta): isolation and structural features. **Food Chem.**, v. 104, p. 928-935, 2007b.

CHEN, R.H.; CHEN, W.Y. Rheological properties of the water-soluble mucilage of a green laver, *Monostroma nitidum*. **J. Appl. Phycol.**, v. 13, p. 481-488, 2001.

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

CIANCIA, M.; MATULEWICZ, M.C.; STORTZ, C.A.; CEREZO, A.S. Room temperature, low-field ¹³C-n.m.r. spectra of degraded carrageenans. Part II. On the specificity of the autohydrolysis reaction in kappa/iota and mu/nu structures. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 13, p. 337-340, 1991.

CIANCIA, M.; QUINTANA, I.; VIZCARGÜÉNAGA, M.I.; KASULIN, L.; DIOS, A.; ESTEVEZ, J.M.; CEREZO, A.S. Polysaccharides from the green seaweeds *Codium fragile* and *C. vermilara* with controversial effects on hemostasis. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 41, p. 641-649, 2007.

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

COLLINS, P.; FERRIER, R. Reactions and products of reactions at the anomeric centre. In: _____. (Ed.) **Monosaccharides: the chemistry and their roles in natural products**. Wiley, New York, p. 60-188, 1995.

CLUZET, S.; TORREGROSA, C.; JACQUET, C.; LAFITE, C.; FOURNIER, J.; MERCIER, L.; SALAMAGNE, S.; BRIAND, X.; ESQUERRÉ-TUGAYÉ, M.T.; DUMAS, B. Gene expression profiling and protection of *Medicago truncatula* against a fungal infection in response to an elicitor from green algae *Ulva* spp. **Plant, Cell and Environment**, v. 27, p. 917-928, 2004.

DODGSON, K. S.; PRICE, R. G. A note on the determination of the sulphate ester of sulphated polysaccharide. **Biochem. J.**, v. 84, p. 106-110, 1962.

DUARTE, M.E.R.; CAUDURO, J.P.; NOSEDA, D.G.; NOSEDA, M.D.; GONÇALVES, A.G.; PUJOL, C.A.; DAMONTE, E.B.; CERZO, 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.**, v. 339, p. 335-347, 2004.

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

FARIAS, E.H.C. **Homogalactans sulfatadas da alga *C. isthmocladum* com atividade anticoagulante**. Natal 2006. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

FARIAS, E.H.C.; POMIN, V.H.; VALENTE, A.P.; NADER, H.B.; ROCHA, H.A.O.; MOURÃO, P.A.S. A preponderantly 4-sulfated, 3-linked galactan from the green alga *Codium isthmocladum*. **Glycobiology**, v. 18, p. 250-259, 2008.

FARIA-TISCHER, P.C.S.; TALARICO, L.B.; NOSEDA, M.D.; DAMONTE, E.B.; DUARTE, M.E.R. Chemical structure and antiviral activity of carrageenans from *Meristiella gelidium* against herpes simplex and dengue virus. **Carbohydr. Polym.**, v. 63, p. 459-465, 2006.

FEYZI, E.; TRYBALA, E.; BERGSTRÖM, T.; LINDAHL, U.; SPILLMANN, D. Structural requirement of heparan sulfate for interaction with herpes simplex virus type 1 virions and isolated glycoprotein C. **J. Biol. Chem.**, v. 272, p. 24850-24857, 1997.

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

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

FREITAS, R.A. **Estrutura e interações entre galactoxiloglucanas e amidos.** Curitiba, 2003. Tese (Doutorado em Ciências – Bioquímica) – Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Paraná.

GHOSH, P.; ADHIKARI, U.; GHOSAL, P.; PUJOL, C.A.; CARLUCCI, M.J.; DAMONTE, E.B.; RAY, B. *In vitro* anti-herpetic activity of sulfated polysaccharide fractions from *Caulerpa racemosa*. **Phytochemistry**, v. 65, p. 3151-3157, 2004.

GOLDSTEIN, I.J.; HAY, G.W.; LEWIS, B.A.; SMITH, F. Controlled degradation of polysaccharides by periodate oxidation, reduction and hydrolysis. In: Whistler, R. L.; Wolfrom, M. L. (Eds.). **Methods Carbohydr. Chem.** Academic Press, New York, v. 5, p. 361-369, 1965.

GORIN, P.A.J.; MAZUREK, M. Further studies on the assignment of signals in ¹³C magnetic resonance spectra of aldoses and derived methyl glycosides. **Can. J. Chem.**, v. 53, p. 1212-1223, 1975.

GOSSELIN, C.C.; HOLT, A.; LOWE, P.A. The polysaccharides of *Enteromorpha* species. **J. Chem. Soc.**, p. 5877-5880, 1964.

HARADA, N.; MAEDA, M. Chemical structure of antithrombin-active rhamnan sulfate from *Monostroma nitidum*. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v. 62, p. 1647-1652, 1998.

HAYAKAWA, Y.; HAYASHI, T.; LEE, J.-B.; SRISOMPORN, P.; MAEDA, M.; OZAWA, T.; SAKURAGAWA, N. Inhibition of thrombin by sulfated polysaccharides isolated from green algae. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1543, p. 86-94, 2000.

HEROLD, B.C.; GERBER, S.I.; POLONSKY, T.; BELVAL, B.J.; SHAKLEE, P.N.; HOLME, K. Identification of structural features of heparin required for inhibition of herpes simplex virus type 1 binding. **Virology**, v. 206, p. 1108-1116, 1995.

HIRST, E.L.; JONES, J.K.N. The constitution of damson gum. Part I. Composition of damson gum and structure of aldobionic acid (glycuronosido-2-mannose) derived from it. **J. Chem. Soc.**, p. 1174-1180, 1938.

IVANOVA, V.; ROUSEVA, R.; KOLAROVA, M.; SERKEDJIEVA, J.; RACHEV, R.; MANOLOVA, N. Isolation of a polysaccharide with antiviral effect from *Ulva lactuca*. **Prep. Biochem.**, v. 24, p. 83-97, 1994.

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

JANSSON, P.E.; KENNE, L.; WIDMALM, G. Computer-assisted structural analysis of polysaccharides with an extended version of CASPER using ¹H- and ¹³C-N.M.R. data. **Carbohydr. Res.**, v. 188, p. 169-191, 1989.

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

KNIREL, Y.A.; OVOD, V.V.; ZDOROVENKO, G.M.; GVOZDYAK, R.I.; KROHN, K.J. Structural of the O-polysaccharide and immunochemical relationships between the lipopolysaccharides of *Pseudomonas syringae* pathovar tomato and pathovar maculicola. **Eur. J. Biochem.**, v. 258, p. 657-661, 1998a.

KNIREL, Y.A.; OVOD, V.V.; PARAMONOV, N.A.; KROHN, K.J. Structural heterogeneity in the O-polysaccharide of *Pseudomonas syringae* pv. coriandricola GSPB 2028 (NCPPB 3780, W-43). **Eur. J. Biochem.**, v. 258, p. 716-721, 1998b.

KOCHETKOV, N.K.; LIPKIND, G.M.; SHASHKOV, A.S.; NIFANT'EV, N.E. NMR and conformational analysis of some 2,3-disubstituted methyl α -L-rhamnopyranosides. **Carbohydr. Res.**, v. 221, p. 145-168, 1991.

KOLENDER, A. A.; MATULEWICZ, M. C.; CERESO, A. S. Structural analysis of antiviral sulfated α -D-(1 \rightarrow 3)-linked mannans. **Carbohydr. Res.**, v. 273, p. 179-185, 1995.

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

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

KOVENSKI; J.; CIRELLI, A.F. Chemical modification of glycosaminoglycans. Selective 2-sulfation of D-glucuronic acid units in heparan sulfate. **Carbohydr. Res.**, v. 303, p. 119-122, 1997.

KUDA, T.; GOTO, H.; YOKOYAMA, M.; FUJII, T. Effects of edible marine algae on cecal microflora and levels of serum lipid in rats. **Nippon Suisan Gakkaiishi**, v. 63, p. 928-933, 1997.

LAHAYE, M. NMR spectroscopic characterization of oligosaccharides from two *Ulva rigida* samples (Ulvales, Chlorophyta) degraded by a lyase. **Carbohydr. Res.**, v. 314, p. 1-12, 1998.

LAHAYE, M.; AXELOS, M.A.V. Gelling properties of water-soluble polysaccharides from proliferating marine green seaweeds (*Ulva* spp.). **Carbohydr. Polym.**, v. 22, p. 261-265, 1993.

LAHAYE, M.; BRUNEL, M.; BONNIN, E. Fine chemical structure analysis of oligosaccharides produced by an ulvan-lyase degradation of the water-soluble

cell-wall polysaccharides from *Ulva* sp. (Ulvales, Chlorophyta). **Carbohydr. Res.**, v. 304, p. 325-333, 1997.

LAHAYE, M.; CIMADEVILLA, E.A.-C.; KUHLENKAMP, R.; QUEMENER, B.; LOGNONÉ, V.; DION, P. Chemical composition and ^{13}C NMR spectroscopic characterization of ulvans from *Ulva* (Ulvales, Chlorophyta). **J. Appl. Phycol.**, v. 11, p. 1-7, 1999.

LAHAYE, M.; INIZAN, F.; VIGOUROUX, J. NMR analysis of the chemical structure of ulvan and of ulvan-boron complex formation. **Carbohydr. Polym.**, v. 36, p. 239-249, 1998.

LAHAYE, M.; RAY, B. Cell-wall polysaccharides from the marine green alga *Ulva "rigida"* (Ulvales, Chlorophyta) – NMR analysis of ulvan oligosaccharides. **Carbohydr. Res.**, v. 283, p. 161-173, 1996.

LAHAYE, M.; ROBIC, A. Structure and functional properties of ulvan, a polysaccharide from green seaweed. **Biomacromol.**, v. 8, p. 1765-1774, 2007.

LEE, J.B.; HAYASHI, K.; HAYASHI, T.; SANKAWA, U.; MAEDA, M. Antiviral activities against HSV-1, HCMV, and HIV-1 of rhamnan sulfate from *Monostroma latissimum*. **Planta Medica**, v. 65, p. 439-441, 1999.

LEE, J.-B.; HAYASHI, K.; MAEDA, M.; HAYASHI, T. Antiherpetic activities of sulfated polysaccharides from green algae. **Planta Medica**, v. 70, p. 813-817, 2004.

LEE, J.B.; YAMAGAKI, T.; MAEDA, M.; NAKANISHI, H. Rhamnan sulfate from cell walls of *Monostroma latissimum*. **Phytochemistry**, v. 48, p. 921-925, 1998.

LIPKIND, G.M.; SHASHKOV, A.S.; KNIREL, Y.A.; VINOGRADOV, E.V.; KOCHETKOV, N.K. A computer-assisted structural analysis of regular polysaccharides on the basis of ^{13}C -N.M.R. data. **Carbohydr. Res.**, v. 175, p. 59-75, 1988.

LOVE, J.; PERCIVAL, E. The polysaccharides of the green seaweed *Codium fragile*. Part II. The water-soluble sulphated polysaccharides. **J. Chem. Soc.**, p. 3338-3345, 1964.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J. FARR, A.L.; RANDALL, K.L. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, v. 193, p. 265-275, 1951.

LYCKE, E.; JOHANSSON, M. SVENNERHOLM, B.; LINDAHL, U. Binding of herpes simplex virus to cellular heparan sulphate, and initial step in the adsorption process. **J. Gen. Virol.**, v. 72, p. 1131-1137, 1991.

MAEDA, M.; UEHARA, T.; HARADA, N.; SEKIGUCHI, M.; HIRAOKA, A. Heparinoid-active sulphated polysaccharides from *Monostroma nitidum* and

their distribution in the Chlorophyta. **Phytochemistry**, v. 30, p. 3611-3614, 1991.

MATSUBARA, K.; MATSUURA, Y.; BACIC, A.; LIAO, M.-L.; HORI, K.; MIYAZAWA, K. Anticoagulant properties of a sulfated galactan preparation from a marina green alga, *Codium cylindricum*. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 28, p. 395-399, 2001.

McKINNEL, J.P.; PERCIVAL, E. Structural investigations on the water-soluble polysaccharide of the green seaweed *Enteromorpha compressa*. **J. Chem. Soc.**, p. 3141-3148, 1962a.

McKINNELL, J.P.; PERCIVAL, E. The acid polysaccharide from the green seaweed *Ulva lactuca*. **J. Chem. Soc.**, p. 398-399, 1962b.

MEDCALF, D.G.; LIONEL, T.; BRANNON, J.H.; SCOTT, J.R. Seasonal variation in the mucilaginous polysaccharides from *Ulva lactuca*. **Bot. Mar.**, v. 18, p. 67-70, 1975.

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

NOSEDA, M.D.; CEREZO, A.S. Room temperature, low-field ¹³C-n.m.r. spectra of degraded carrageenans. Part III. Autohydrolysis of a lambda-carrageenan and of its alkali-treated derivative. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 15, p. 177-187, 1993.

OLIVEIRA, E.C.; HORTA, P.A.; AMÂNCIO, C.E.; SANT'ANNA, C.L. 1999. "Algas e angiospermas marinhas bênticas do litoral brasileiro: diversidade, exploração e conservação". **Citação e referência a documentos eletrônicos**. Disponível em: <http://www.anp.gov.br/brnd/round6/guias/PERFURACAO/PERFURACAO_R6/refere/plantas_marinhas.pdf> Acessado em 20 de Fevereiro de 2007.

ORTIZ, J.; ROMERO, N. ROBERT, P. ARAYA, J.; LOPEZ-HERNÁNDEZ, J.; BOZZO, C.; NAVARRETE, E.; OSORIO, A.; RIOS, A. Dietary fiber, amino acid, fatty acid and tocopherol contents of the edible seaweeds *Ulva lactuca* and *Durvillaea antarctica*. **Food Chem.**, v. 99, p. 98-104, 2006.

OVOD, V.V.; ZDOROVENKO, E.L.; SHASHKOV, A.S.; KOCHAROVA, N.A.; KNIREL, Y.A. Structural diversity of O-polysaccharide and serological classification of *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* and other strains of genomospecies 4. **Microbiology**, v. 73, p. 666-677, 2004.

PÁDUA, M.; FONTOURA, P.S.G.; MATHIAS, A.L. Chemical composition of *Ulvaria oxysperma* (Kützinger) Bliding, *Ulva lactuca* (Linnaeus) and *Ulva fasciata* (Delile). **Braz. Arch. Biol. Technol.**, v. 47, p. 49-55, 2004.

PAINTER, T.J. Algal polysaccharides. In: Aspinall, G.O. (Ed.). **The polysaccharides**, v. 2, p. 195-285, 1983.

PARADOSSI, G.; CAVALIERI, F.; PIZZOFERRATO, L.; LIQUORI, A.M. A physico-chemical study on the polysaccharide ulvan from hot water extraction of the macroalga *Ulva*. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 25, p. 309-315, 1999.

PARK, J.T.; JOHNSON, M. A submicrodetermination of glucose. **J. Biol. Chem.**, v. 181, p. 149-151, 1949.

PAULERT, R. **Atividade antimicrobiana e controle da antracnose do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) utilizando polissacarídeo e extratos da macroalga marinha *Ulva fasciata***. Florianópolis 2005. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Departamento de Biotecnologia, Universidade Federal de Santa Catarina.

PELLIZZARI, F.M.; OLIVEIRA, E.C.; YOKOYA, N.S. Coverage and recruitment of the edible green macroalga *Monostroma oxyspermum* in Paranaguá Bay in southeastern Brazil. **J. Coast. Res.**, v. 39 (special issue), 2004.

PELLIZZARI, F.M.; ABSHER, T.; YOKOYA, N.S.; OLIVEIRA, E.C. Cultivation of the edible green seaweed *Gayralia* (Chlorophyta) in southern Brazil. **J. Appl. Phycol.**, v. 19, p. 63-69, 2007.

PELLIZZARI, F.M.; ABSHER, T.; YOKOYA, N.S.; OLIVEIRA, E.C. Life-history, thallus ontogeny, and the effects of temperature, irradiance and salinity on growth of the edible green seaweed *Gayralia* spp. (Chlorophyta) from southern Brazil. **J. Appl. Phycol.**, v. 20, p. 75-82, 2008.

PENGZHAN, Y.; QUANBIN, Z.; NING, L.; ZUHONG, X.; YANMEI, W.; ZHI'EN, L. Polysaccharides from *Ulva pertusa* (Chlorophyta) and preliminary studies on their antihyperlipidemia activity. **J. Appl. Phycol.**, v. 15, p. 21-27, 2003a.

PENGZHAN, Y.; NING, L.; XIGUANG, L.; GEFEI, Z.; QUANBIN, Z.; PENGCHENG, L. Antihyperlipidemic effects of different molecular weight sulfated polysaccharides from *Ulva pertusa* (Chlorophyta). **Pharmac. Res.**, v. 48, p. 543-549, 2003b.

PERCIVAL, E; WOLD, J.K. The acid polysaccharides from the green seaweed *Ulva lactuca*. Part II. The site of the ester sulphate. **J. Chem. Soc.**, p. 5459-5468, 1963.

QI, H.; ZHANG, Q.; ZHAO, T.; CHEN, R.; ZHANG, H.; NIU, X.; LI, Z. Antioxidant activity of different sulfate content derivatives of polysaccharide extracted from *Ulva pertusa* (Chlorophyta) *in vitro*. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 37, p. 195-199, 2005.

QI, H.; ZHANG, Q.; ZHAO, T.; HU, R.; ZHANG, K.; LI, Z. *In vitro* antioxidant activity of acetylated and benzoylated derivatives of polysaccharide extracted from *Ulva pertusa* (Chlorophyta). **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v. 16, p. 2441-2445, 2006.

QUEMENER, B.; LAHAYE, M.; BOBIN-DUBIGEON, C. Sugar determination in ulvans by a chemical-enzymatic method coupled to high performance anion exchange chromatography. **J. Appl. Phycol.**, v. 9, p. 179-188, 1997.

RAMAN, V.B.; RAO, D.N.; RADHAKRISHNAN, R.M. *Enteromorpha compressa* (L.) Greville an edible green alga as a source of anti-allergic principle (S). **Indian J. Clin. Biochem.**, v. 19, p. 105-109, 2004.

RAMANA, K.S.; RAO, E.V. Structural features of the sulphated polysaccharide from a green seaweed, *Cladophora socialis*. **Phytochemistry**, v. 30, p. 259-262, 1991.

RAO, E.V.; RAO, N.V.S.A.V.P.; RAMANA, K.S. Structural features of the sulphated polysaccharide from a green seaweed, *Spongomorpha indica*. **Phytochemistry**, v. 30, p. 1183-1186, 1991.

RAO, N.V.S.A.V.P.; RAMANA, K.S. Structural studies of a polysaccharide isolated from the green seaweed *Chaetomorpha anteninna*. **Carbohydr. Res.**, v. 217, p. 163-170, 1991.

RAO, N.V.S.A.V.P.; RAO, E.V. Structural features of the sulphated polysaccharide from a green seaweed, *Caulerpa taxifolia*. **Phytochemistry**, v. 25, p. 1645-1647, 1986.

RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E. **Biologia Vegetal**. 6 ed. Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro, p. 344-366, 2001.

RAY, B. Polysaccharides from *Enteromorpha compressa*: isolation, purification and structural features. **Carbohydr. Polym.**, v. 66, p. 408-416, 2006.

RAY, B.; LAHAYE, M. Cell-wall polysaccharides from the marine green alga *Ulva "rigida"* (Ulvales, Chlorophyta). Extraction and chemical composition. **Carbohydr. Res.**, v. 274, p. 251-261, 1995a.

RAY, B.; LAHAYE, M. Cell-wall polysaccharides from the marine green alga *Ulva "rigida"* (Ulvales, Chlorophyta). Chemical structure of ulvan. **Carbohydr. Res.**, v. 274, p. 313-318, 1995b.

RAYMUNDO, M.S.; HORTA, P.; FETT, R. Atividade antioxidante *in vitro* de extratos de algumas algas verdes (Chlorophyta) do litoral catarinense (Brasil). **Rev. Bras. Cienc. Farm.**, v. 40, p. 495-503, 2004.

REES, D.A. The carrageenan system of polysaccharides. Part I: the relation between the κ - and λ -components. **J. Chem. Soc.**, p. 1821-1832, 1963.

RISSE, S.; ESCUDERO, C.; ESTEVÃO BELCHIOR, S.; de PORTELA, M.L.; FAJARDO, M.A. Contenido em algunos nutrientes del alga marina comestible, *Monostroma undulatum*, Wittrock de la costa patagónica argentina. **Arch. Latinoamer. Nutr.**, v. 53, p. 306-311, 2003.

ROGER, O.; KERVAREC, N.; RATISKOL, J.; COLLIEC-JOUAULT, S.; CHEVOLOT, L. Structural studies of the main exopolysaccharide produced by the deep-sea bacterium *Alteromonas infernuna*. **Carbohydr. Res.**, v. 339, p. 2371-2380, 2004.

SANTOS, M.G.M.; LAGROTA, M.H.C.; MIRANDA, M.M.F.S.; YONESHIGUE-VALENTIN, Y.; WIGG, M.D. A screening for the antiviral effect of extracts from Brazilian marine algae against acyclovir resistant herpes simplex virus type 1. **Bot. Mar.**, v. 42, p. 227-230, 1999.

SASSAKI, G.L.; GORIN, P.A.J.; SOUZA, L.M.; CZELUSNIAK, P.A.; IACOMINI, M. Rapid synthesis of partially O-methylated alditol acetate standards from GC-MS: some relative activities of hydroxyl groups of methyl glycopyranosides on Purdie methylation. **Carbohydr. Res.**, v. 340, p. 731-739, 2005.

SENCHENKOVA, S.N.; SHASHKOV, A.S.; LAUX, P.; KNIREL, Y.A.; RUDOLPH, K. The O-chain polysaccharide of the lipopolysaccharide of *Xanthomonas campestris* pv. *Begoniae* GSPB 525 is a partially L-xylosylated L-rhamnan. **Carbohydr. Res.**, v. 319, p. 148-153, 1999.

SIDDHANTA, A.K.; SHANMUGAM, M.; MODY, K.H.; GOSWAMI, A.M. RAMAVAT, B.K. Sulphated polysaccharides of *Codium dwarkense* Boergs. from the west coast of India: chemical composition and blood anticoagulant activity. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 26, p. 151-154, 1999.

SMIDSRÖD, O.; HAUG, A.; LARSEN, B. The influence of pH on the rate of hydrolysis of acid polysaccharides. **Acta Chem. Scand.**, v. 20, p. 1026-1034, 1966.

SMITH, F. The constitution of arabic acid. Part I. The isolation of 3-D-galactosido-L-arabinose. **J. Chem. Soc.**, p. 744-753, 1939.

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

STORTZ, C.A.; CEREZO, A.S. Specific fragmentation of carrageenans. **Carbohydr. Res.**, v. 166, p. 317-323, 1987.

SUDO, M.; SATO, K.; CHAIDEDGUMJORN, A.; TOYODA, H.; TOIDA, T.; IMANARI, T. ¹H nuclear magnetic resonance spectroscopic analysis for determination of glucuronic and iduronic acids in dermatan sulfate, heparin, and heparan sulfate. **Anal. Biochem.**, v. 297, p. 42-51, 2001.

TALARICO, L. B.; ZIBETTI, R. G. M.; FARIA, P. C. S.; SCOLARO, L. A.; DUARTE, M. E. R.; NOSEDA, M. D.; PUJOL, C. A.; DAMONTE, E. B. Anti-herpes simplex virus activity of sulfated galactans from the red seaweeds *Gymnogongrus griffithsiae* and *Cryptonemia crenulata*. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 34, p. 63-71, 2004.

TAYLOR, R. L.; CONRAD, H. E. Stoichiometric depolymerization of polyuronides and glycosaminoglycuranans to monossaccharides following reduction of their carbodiimide-activated carboxyl groups. **Biochemistry**, v. 11, p. 1383-1388, 1972.

UEHARA, T.; TAKESHITA, M.; MAEDA, M. Studies on anticoagulant-active arabinan sulfates from the green alga, *Codium latum*. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 235, p. 309-311, 1992.

UNIVERSITY OF HAWAII. Botany Department. Algae: invasive native *Ulva fasciata*. Disponível em:
<http://www.hawaii.edu/reefalgae/invasive_algae/chloro/ulva_fasciata.htm>
Acesso em: julho de 2004.

WANG, Q.; WOOD, P.J.; CUI, W.; ROSS-MURPHY, S.B. The effect of autoclaving on the dispersibility and stability of three neutral polysaccharides in dilute aqueous solutions. **Carbohydr. Polym.**, v. 45, p. 355-362, 2001.

WuDUNN, D.; SPEAR, P.G. Initial interaction of herpes simplex virus with cells is binding to heparan sulfate. **J. Virol.**, v. 63, p. 52-58, 1989.

WYNNE, M.J. **A checklist of benthic marine algae of the tropical and subtropical Western Atlantic: second revision**. Nova Hedwigia. 129:1-152, 2005.

YAMAMOTO, M.; Physicochemical studies on sulfated polysaccharides extracted from seaweeds at various temperatures. **Agric. Biol. Chem.**, v. 44, p. 589-593, 1980.

YAMAMOTO, M.; TADOKORO, Y.; IMAI, H.; MITA, K. Physicochemical characterization of sulfated polysaccharides from green seaweeds: *Ulva pertusa* and *Ulva conglobata*. **Agric. Biol. Chem.**, v. 44, p. 723-729, 1980.

ZDOROVENKO, E.L.; OVOD, V.V.; SHASHKOV, A.S.; KOCHAROVA, N.A.; KNIREL, Y.A.; KROHN, K. Structure of the O-polysaccharide of the lipopolysaccharide of *Pseudomonas syringae* pv. *Garcae* ICMP 8047. **Biochemistry**, v. 64, p. 914-923, 1999.

ZHANG, H.-J.; MAO, W.-J.; FANG, F.; LI, H.-Y.; SUN, H.-H.; CHEN, Y.; QUI, X.-H. Chemical characteristics and anticoagulant activities of a sulfated polysaccharide and its fragments from *Monostroma latissimum*. **Carbohydr. Polym.**, v. 71, p. 428-434, 2008.

ANEXO



Chemical structure and antiviral activity of the sulfated heterorhamnan isolated from the green seaweed *Gayralia oxysperma*

Juliana E. F. Cassolato^a, Miguel D. Noseda^a, Carlos A. Pujol^b, Franciane M. Pellizzari^c,
Elsa B. Damonte^b, 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 Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina

^c Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade Estadual de Paranaguá, Paranaguá, Paraná, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 22 July 2008

Received in revised form 16 September 2008

Accepted 17 September 2008

Available online 24 September 2008

Keywords:

Sulfated heterorhamnan

Chemical structure

Antiviral activity

Green seaweed

Gayralia oxysperma

Ulvaes

ABSTRACT

A homogeneous sulfated heterorhamnan was obtained by aqueous extraction, then by ultrafiltration from the green seaweed *Gayralia oxysperma*. Besides α -L-rhamnose it contains glucuronic and galacturonic acids, xylose and glucose. The structure was established by methylation analyses of the carboxyl-reduced, carboxyl-reduced/desulfated, carboxyl-reduced/Smith-degraded, and carboxyl-reduced/Smith-degraded/desulfated products and 1D, 2D NMR spectroscopy analyses. The heterorhamnan backbone is constituted by 3- and 2-linked rhamnosyl units (1.00:0.80), the latter being ~50% substituted at C-3 by side chains containing 2-sulfated glucuronic and galacturonic acids and xylosyl units. The 3- and 2-linked rhamnosyl units are unsulfated (20%), disulfated (16%), and mostly monosulfated at C-2 (27%) and C-4 (37%). The branched and sulfated heterorhamnan had high and specific activity against herpes simplex virus.

© 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Marine green algae (Chlorophyta) synthesize a great variety of water-soluble polysaccharides.¹ Most of them are sulfated and contain predominant amounts of rhamnose^{1–12} or galactose^{13–15} as well as pyruvic acid ketal.^{13–15}

Algae from the genera *Ulva* and *Enteromorpha* (order Ulvaes) produce sulfated glucuronoxylorhamnans,^{4–8,12} named ulvans.¹⁶ These contain a major repeating disaccharide unit defined as ulvanobiuronic acid 3-sulfate which is composed of 4-linked rhamnose 3-sulfate and 4-linked glucuronic or iduronic acid residues.^{3–7,17} Additionally, several other repeating sequences have been identified for ulvans.^{4,6–8} Recently, an excellent review describing the structure and properties of ulvans has been published.¹⁸ In contrast, other species of genus *Monostroma* (order Ulvaes) biosynthesize 2- and 3-linked rhamnans sulfated at C-2, C-3, or C-4.^{9,10}

Sulfated polysaccharides isolated from the genera *Monostroma*, *Ulva*, and *Enteromorpha* genera are known to have a broad range of biological activities, comprising antiviral,^{19–22} immunomodulating,²³ anticoagulant,^{10,24–26} antioxidant^{27,28} besides antihyperlipidemic properties.^{29,30}

We now report the structure of the major water-soluble polysaccharide obtained from the green seaweed *Gayralia oxysperma* (Ulvaes) and its antiviral activity against herpes simplex virus type 1 (HSV-1) and 2 (HSV-2).

2. Results and discussion

2.1. Extraction and purification of the sulfated polysaccharides from *G. oxysperma*

The milled green alga *G. oxysperma* was successively extracted twice with water at room temperature yielding fractions Go1 and Go2, respectively. The residue was then sequentially extracted four times with the same solvent at 80 °C giving rise to Go3–Go6, respectively. Yields, analyses, and monosaccharide composition of these crude extracts are given in Table 1. The six fractions contained rhamnose as the major neutral sugar (56–88 mol %), together with glucose (3–21 mol %), xylose (4–10 mol %), and arabinose (3–10 mol %). Small amounts of mannose (1–2 mol %) were also detected. GC–MS analysis of acetylated aminoalditol derivatives showed that rhamnose has the L-configuration. All the fractions present high sulfate content (21.2–30.9%) besides uronic acids (12.2–17.0%). On the basis of their monosaccharide composition, the term heterorhamnan is now adopted to define this kind of polysaccharide.

* Corresponding author. Tel.: +55 41 33611663; fax: +55 41 32662042.

E-mail address: eugenia.duarte@pq.cnpq.br (M. E. R. Duarte).

Table 1

Yield, chemical analyses, specific rotation, and monosaccharide composition of polysaccharidic fractions obtained from *G. oxysperma*

	Go1 ^a	Go2	Go3	Go4	Go5	Go6
Yield ^b (%)	1.4	0.6	13.8	12.7	4.5	5.8
Carbohydrate (%)	38.4	44.0	49.6	46.7	45.1	51.7
Sulfate ^c (%)	21.2	22.2	26.1	30.9	23.5	30.9
Uronic acid (%)	12.2	12.9	17.0	16.2	13.7	13.8
Protein (%)	7.3	8.8	3.9	2.0	6.0	4.6
[α] _D ^c (°)	−43.0	−24.5	−38.0	−37.5	−29.0	−33.0
Monosaccharide (mol %)						
Rha	65	56	67	75	88	71
Xyl	10	9	10	9	4	9
Glc	17	21	10	11	3	12
Gal	2	3	6	5	—	3
Ara	4	10	5	—	3	3
Man	2	1	2	—	2	2

— = Not detected.

^a Fractions are defined in the text.

^b Percentage based on milled seaweed.

^c Determined as SO₃Na.

Considering that Go3 had the highest yield (13.8%) among all the crude extracts, it was selected for the structural studies. It was fractionated by ultrafiltration through a 300 kDa cut-off membrane, yielding a retained Go3r (70% yield) and an eluted fraction, Go3e (30% yield). The former is rich in uronic acids (19.0%) and sulfate groups (25.8%), having rhamnose (77 mol%) and xylose (17 mol%) as the major monosaccharides, besides small amounts of glucose (5 mol%) and galactose (1 mol%). The monosaccharide composition of Go3e was different from that of Go3r, since it contains a significant proportion of glucose (20 mol%) and a lower uronic acid content (9.7%), Table 2.

HPSEC-MALLS-RI analysis of Go3r gave a homogeneous profile (Fig. 1) with MW of 1519 kDa (dn/dc of 0.118), whereas Go3e showed an asymmetric peak when analyzed by the same technique and was kept for further investigation. A great variation in molecular weights, in the range of 91–820 kDa, is reported for ulvans, depending on the species and approach utilized for extraction and analysis.^{31–33}

2.2. Carboxyl-reduction of the heterorhamnan

Identification and quantification of the uronic acids present in fraction Go3r were carried out by esterification with 1-cyclohexyl-3-(2-morpholinoethyl) carbodiimide metho-*p*-toluenesulfonate followed by reduction of the corresponding products with NaBD₄.^{34,35} GC-MS analysis of the carboxyl-reduced polysaccha-

Table 2

Yield, chemical analyses, specific rotation, and monosaccharide composition of polysaccharidic fractions obtained from Go3

	Go3-R ^a	Go3e	Go3r	Go3r-R	Go3r-RD	Go3r-RS	Go3r-RSD	Go3r-S	Go3r-SD
Yield (%)	68.3	30.0 ^b	70.0 ^b	70.0	70.0	50.0	80.0	50.0	72.0
Carbohydrate (%)	45.9	39.0	49.8	51.7	78.4	52.7	79.9	54.0	55.0
Sulfate ^c (%)	25.3	29.5	25.8	25.0	2.0	26.1	3.0	26.0	3.0
Uronic acid (%)	—	9.7	19.0	—	—	—	—	4.0	n.d.
Protein (%)	n.d.	3.7	—	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
[α] _D ^c (°)	n.d.	−20.0	−45.0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Monosaccharide (mol %)									
Rha	59	54	77	64	64	91	92	95	95
Xyl	9	16	17	13	13	3	3	3	3
Glc	21	20	5	19	18	6	5	2	2
Gal	9	4	1	4	5	—	—	—	—
Ara	1	3	—	—	—	—	—	—	—
Man	1	3	—	—	—	—	—	—	—

— = Not detected. n.d. = not determined.

^a Fractions are defined in the text.

^b Percentage based on material recovered after ultrafiltration of Go3. Yields of ultrafiltration were 90%.

^c Determined as SO₃Na.

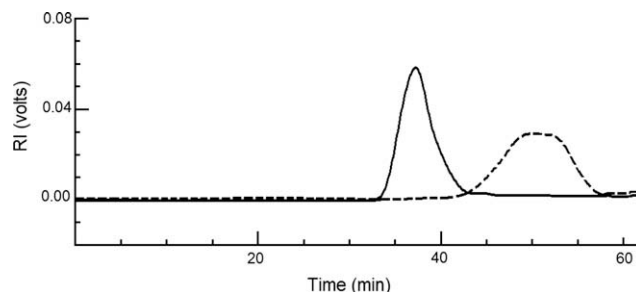


Figure 1. Elution profiles of Go3r (—) and Go3r-S (---) using HPSEC, obtained with a refractive index detector.

rides (Go3r-R, 70.0% yield) showed a net increase of glucitol and galactitol (Table 2), and that 65% and 73% of these alditols corresponded to 1,6,6-trideutero glucitol and galactitol hexaacetate, respectively. These results indicate the presence of 12.3 and 2.9 mol% of glucuronic and galacturonic acid residues, respectively, in the original polymer. In order to determine if the purification procedure carried out with the crude extract Go3 affected its uronic acid composition, it was submitted to carboxyl-reduction (Go3-R, Table 2) followed by GC-MS analysis. The presence of the same uronic acids identified in the purified fraction was confirmed in the crude extract (11 and 3 mol% of glucuronic and galacturonic acids, respectively). Glucuronic acid together with iduronic acid have been reported as components of ulvans isolated from different species of *Ulva* genus.^{4–8,17,18} The lack of 2,3,4-tri-*O*-acetyl-1,6-anhydrohexose in the GC-MS analysis of Go3r-R and Go3-R excludes the possibility of the presence of iduronic acid residues in heterorhamnans of *G. oxysperma*.

2.3. Solvolytic desulfation of the carboxyl-reduced heterorhamnan

Solvolytic desulfation³⁶ of Go3r-R removed 92% of the sulfate giving rise to the partially desulfated fraction Go3r-RD (70.0% yield, Table 2). Monosaccharide analysis of Go3r-RD was similar to that obtained for the parent fraction indicating lack of degradation during the solvolytic treatment (Table 2).

2.4. Methylation analyses of fractions Go3r-R and Go3r-RD

Methylation analysis was initially carried out with two polysaccharidic fractions, the carboxyl-reduced one (Go3r-R) and the carboxyl-reduced and desulfated fraction (Go3r-RD). The results of

Table 3

Methylation analysis of the carboxyl-reduced (Go3r-R), carboxyl-reduced, and Smith-degraded (Go3r-RS) fractions and their partially desulfated products (Go3r-RD and Go3r-RSD) obtained from Go3r

Derivative ^a	Deduced linkage	Fractions			
		Go3r-R	Go3r-RD	Go3r-RS	Go3r-RSD
2,3,4-Rha ^b	Rhap-(1→	—	—	3	3
2,4-Rha	→3)-Rhap-(1→	6	35	15	50
3,4-Rha	→2)-Rhap-(1→	4	15	1	33
2-Rha	→3,4)-Rhap-(1→	11	1	17	1
3-Rha	→2,4)-Rhap-(1→	9	1	16	2
4-Rha	→2,3)-Rhap-(1→	19	13	20	5
Rha	→2,3,4)-Rhap-(1→	17	1	20	—
2,3,4-Xyl	Xylp-(1→	5	5	—	—
2,4-Xyl	→3)-Xylp-(1→	2	2	3	2
2,3-Xyl	→4)-Xylp-(1→	4	4	—	—
2/3-Xyl	→3,4/2,4)-Xylp-(1→	1	1	—	—
2,3,4,6-Glc	GlcAp-(1→	—	5	—	—
3,4,6-Glc	→2)-GlcAp-(1→	5	—	—	—
2,3,6-Glc	→4)-GlcAp-(1→	3	7	—	4
3,6-Glc	→2,4)-GlcAp-(1→	4	—	5	—
2,3,6-Glc	→4)-GlcAp-(1→	4	4	—	—
2,3,4,6-Gal	GalAp-(1→	—	4	—	—
3,4,6-Gal	→2)-GalAp-(1→	5	1	—	—
2,3,4,6-Gal	Galp-(1→	1	1	—	—

— = not detected. / = and/or.

^a Mol % of monosaccharide bearing methyl groups at the positions indicated.

^b 2,3,4-Rha analyzed as 1,5-di-O-acetyl-2,3,4-O-methylrhamnitol, etc.

these analyses are shown in Table 3. Although the methylation process was sequentially repeated three-times to obtain the per-O-methylated product, the content of nonmethylated rhamnose (Rha) for Go3r-R remained unaltered and was thus attributed to 2,3,4-trisubstituted rhamnosyl units. Besides this, monomethylated rhamnose (4-Rha, 3-Rha, and 2-Rha) and dimethylated rhamnose residues (2,4-Rha and 3,4-Rha) were also found indicating the presence of disubstituted (39 mol %), 3-linked (6 mol %), and 2-linked (4 mol %) rhamnosyl units in Go3r-R. Xylosyl units were mainly detected as nonreducing terminal residues (2,3,4-Xyl, 5 mol %) followed by lower amounts of 3-linked, 4-linked, and 2,4- plus 2,3-disubstituted xylosyl units. Additionally, 3,4,6-Glc, 2,3,6-Glc and 3,6-Glc (reduced glucuronic acid), 3,4,6-Gal (reduced galacturonic acid), and nonreducing terminal galactose residues were also identified.

Methylation analysis of the desulfated product (Go3r-RD), when compared with that of the parent compound (Go3r-R), showed the disappearance of previously present 2-, 2,4-substituted glucuronic acid and a decrease of 2-substituted galacturonic acid with a concomitant appearance of nonreducing glucuronic (5 mol %) and galacturonic acid (4 mol %) residues, and an increase of 4-substituted glucuronic acid (3–7 mol %). These results showed that ~80% of the uronic acids are sulfated on C-2 either as nonreducing or 4-linked residues and that ~20% are nonsulfated 4-linked residues. Nevertheless, the major derivatives among the Go3r-RD methylation products were 2,4-Rha (35 mol %), 3,4-Rha (15 mol %), and 4-Rha (13 mol %) corresponding to 3-linked, 2-linked, and 2,3-disubstituted rhamnosyl units. The later represents branching points in the heterorhamnan in agreement with the amount of nonreducing terminal residues (14 mol %) detected among the partially O-methylated derivatives from Go3r-RD (Table 3). After desulfation, the increase of 3-linked and 2-linked rhamnose residues (2,4-Rha and 3,4-Rha, respectively) along with the decrease of 2-Rha, 3-Rha, Rha, and 4-Rha, showed that the parent polysaccharide contains 3- and 2-linked rhamnosyl units with sulfation at C-4 (10 and 8 mol %, respectively). In addition, it could contain 3-linked units sulfated at C-2 and/or C-2,C-4 (19 mol %), besides 2-linked rhamnosyl units sulfated on C-3 and/or C-3,C-4

Table 4

Analysis of rhamnose derivatives from Go3r-R after successive methylation, desulfation, and trideuteromethylation

Derivative	Composed by ^a	Corresponding units ^b	Mol %	Mass fragments (<i>m/z</i>) ^c
4-Rha	4-Me Rha	2L3R/3L2R	6	131, 203, 262, 290
	4-CD ₃ Rha	2L3R4S/3L2R4S	7	134, 206, 265, 293
2,4-Rha	2,4-Me Rha	3L	6	118, 131, 187, 234, 262
	2,4-CD ₃ Rha	3L2,4S	5	121, 134, 193, 240, 268
	2-CD ₃ 4-Me Rha	3L2S	13	121, 134, 190, 237, 265
	2-Me 4-CD ₃ Rha	3L4S	10	118, 131, 190, 237, 265
3,4-Rha	3,4-Me Rha	2L	4	115, 130, 131, 190, 262
	3,4-CD ₃ Rha	2L3, 4S	3	121, 133, 134, 193, 268
	3-Me 4-CD ₃ Rha	2L4S	8	118, 130, 134, 190, 265

/ = and/or.

^a Me = methyl, CD₃ = trideuteromethyl.

^b L, R, S correspond to glycosidic linkage, side chain and sulfate at the position indicated, respectively.

^c Fragment ions observed in the partially trideuteromethylated alditol acetates.

positions (3 mol %). It follows that the results of these methylation analyses were not sufficient to determine the position of all the sulfate groups.

However, when the carboxyl-reduced polysaccharide Go3r-R was sequentially per-O-methylated, desulfated, and trideuteromethylated, the sulfation pattern was clarified. The results of this analysis (Table 4) showed that 4-Rha, 2,4-Rha, and 3,4-Rha derivatives were partially methylated and/or trideuteromethylated, and the CD₃ location was interpreted as the sulfation position in the original polysaccharide. The 4-Rha derivative gave rise to fragments at *m/z* 131 and 134, indicating the presence of CH₃ and CD₃ at C-4 in the proportion of 0.88:1.00, respectively. Therefore, from the 13 mol % of 4-Rha, detected among the Go3r-RD products of methylation (Table 3), corresponding to branched rhamnosyl units, 6 mol % was unsulfated and 7 mol % C-4 sulfated.

The 2,4-Rha derivative showed characteristic fragments ions at *m/z* 234 and 240 indicating the presence of CH₃ and CD₃ groups, respectively, at both C-2 and C-4 positions, besides a fragment ion at *m/z* 237 corresponding to a CD₃ group at C-2 (CH₃ at C-4) and/or at C-4 (CH₃ at C-2). Therefore, from the ratios of these fragments (0.26:0.21:1.00, respectively), the 35 mol % of 2,4-Rha observed in the methylation analysis of Go3r-RD (Table 3) was derived from 3-linked nonsubstituted rhamnopyranosyl units (6 mol %), sulfated on both C-2 and C-4 (5 mol %), sulfated on C-2 (13 mol %) and sulfated on C-4 (10 mol %).

Similarly, the 3,4-Rha derivative (Table 4) gave fragment ions at *m/z* 130 and 133 indicating the presence of CH₃ and CD₃ groups, respectively, at C-3 position together with fragment ions at *m/z* 131 and 134 indicative of CH₃ and CD₃ groups, respectively, at the C-4 position. The ratio of the above mentioned fragments (0.95:0.37:0.31:1.00, respectively) confirmed that the 2-linked rhamnosyl units are unsulfated (27%) and C-4 sulfated (53%), as previously determined from the methylation analysis of the Go3r-RD polysaccharide (Table 3). Taking into account that the 4-Rha derivative detected among the products of methylation analysis of Go3r-R (19 mol %, Table 3) corresponds to unsulfated branching points (6 mol %) and to 3-linked 2-sulfated rhamnosyl units (13 mol %), it is possible to conclude that 2-linked 3-sulfated rhamnosyl units are not present in this polysaccharide. Therefore, these data indicate that the 3,4-disulfated rhamnosyl units gave rise to 20% of the 2-linked residues after desulfation.

Thus, the polysaccharide fraction Go3r, isolated from *G. oxysperma*, is a branched and sulfated heterorhamnan with 2,3-substituted, and 3- and 2-linked rhamnose residues in a molar ratio of 0.37:1.00:0.43, respectively, corresponding to one branching point every five rhamnose residues. The 3- and 2-linked rhamnose

residues are mostly 4-sulfated (37%) and to a lesser extent 2-sulfated and disulfated (27% and 16%, respectively). Notwithstanding of the fact that the branching position was not completely established (at C-2 or C-3 of the 2,3-disubstituted rhamnosyl units), approximately 50% of these are sulfated on C-4. The complexity of the sulfation pattern is increased by the presence of glucuronic and galacturonic acids, each 2-sulfated, as nonreducing end-units and 2-sulfated 4-linked glucuronic acid residues.

Ulvans isolated from genus *Ulva* contain ulvanobiuronic acid ([\rightarrow 4)- β -D-GlcpA-(1 \rightarrow 4)- α -L-Rhap 3-sulfate-(1 \rightarrow)] as the major disaccharide repeating structure.^{4–8,17,18} This is also substituted on C-2 of its rhamnose 3-sulfate residue by single stubs of glucuronic acid together with other disaccharide repeating structures containing xylose and xylose 2-sulfate, which were also identified in ulvans.¹⁸ A heteroglycan produced by *Enteromorpha compressa* (Ulvales) also contains rhamnose 3-sulfate besides 4-linked glucuronic acid and xylose 2-sulfate residues.¹¹ In contrast, *Monostroma* spp. produced branched sulfated rhamnans with different proportions of 2- and 3-linked rhamnosyl units^{9,10,25} with sulfate substitution mainly at C-2,^{9,10} C-3, or C-4.⁹ Hence, the glycosidic linkage and sulfation patterns of the heterorhamnan of *G. oxysperma* are distinctly different from those observed for other green algae belonging to genera *Ulva* and *Enteromorpha*.

2.5. Controlled Smith degradation and methylation analysis of the Smith-degraded product

In order to complement the structural information discussed above, the carboxyl-reduced heterorhamnan Go3r-R was submitted to a controlled Smith degradation^{37,38} giving rise to the carboxyl-reduced and Smith-degraded product (Go3r-RS, 50% yield, 26.1% SO₃Na) that was sequentially submitted to solvolytic treatment (Go3r-RSD, ~88% of desulfation) (Table 2). Monosaccharide composition of both products was similar and showed mainly rhamnose (91–92 mol %) besides minor amounts of xylose (3 mol %) and glucose (6–5 mol %) (Table 2). Methylation analysis of resulting Go3r-RS (Table 3) showed that the nonreducing end-units, as well as other units susceptible to periodate oxidation (2-linked rhamnose, 4-linked xylose, and 4-linked glucose) were removed. Methylation analysis of Go3r-RSD (Table 3) showed the presence of 4-Rha derivative (5 mol %) indicating that the Smith-degraded and desulfated product still retained a low level of branching (one branching point every eighteen rhamnosyl units). Although the composition and length of the branches were partially determined, in addition to uronic acids and xylose units they must also contain rhamnosyl units, in accord with the detection of 2,3,4-Rha amongst the methylation derivatives of both sulfated (Go3r-RS) and desulfated (Go3r-RSD) products (3 mol %). Go3r-RSD methylation data also showed that the 2,3-substituted 3-linked, 2-linked rhamnosyl units are present in a molar ratio of 0.10:1.00:0.66, respectively. When compared with Go3r-RD, the Smith-degraded product Go3r-RSD showed an increase of 2-linked rhamnosyl (from 0.43 to 0.66) with a concomitant decrease of 2,3-disubstituted rhamnosyl units from 0.37 to 0.10. This result could indicate that, at least in part, the branches are located at C-3 of the 2-linked rhamnosyl units in the heterorhamnan of *G. oxysperma*.

The native polysaccharide Go3r was also submitted to a controlled Smith degradation to afford Go3r-S (Table 2). Its HPSEC-MALLS-RI analysis gave a homogeneous profile with MW of 109 kDa (dn/dc of 0.251). The HPSEC-RI elution profile of Go3r-S is shown in Figure 1. The ~14-fold decrease of the molecular weight, when compared with that of Go3r, suggests that the heterorhamnan backbone contains units susceptible to periodate oxidation, and that these are randomly distributed along the polysaccharide.

2.6. FTIR analyses

FTIR spectra of Go3r-R and Go3-R were similar and showed absorptions of high intensity at 1250 cm⁻¹ related to sulfate groups (stretching vibration of S–O of sulfate) together with two other bands at 850 and 829 cm⁻¹. Absorptions at 850 cm⁻¹ were observed in the FTIR spectra of ulvans from *Ulva lactuca* and *E. compressa* and attributed to axial sulfate on C-2 of rhamnose.^{39,40} However, the FTIR spectrum of the ulvan from *U. rigida* bearing sulfate groups at equatorial position³ (on C-3 of rhamnose) also showed absorption at 850 cm⁻¹. From these results, the authors³ suggested that this absorption did not correspond to sulfate groups at an axial position. Taking into account these results, the absorptions at 850 and 829 cm⁻¹ present in the FTIR spectra of Go3r-R and Go3-R cannot be employed as diagnostic stretching vibrations of C–O–S in equatorial and/or axial positions.

2.7. NMR analyses

2.7.1. NMR analyses of the sulfated polysaccharidic fractions

The ¹³C NMR spectra of the crude extracts Go1–Go6 showed the same signal pattern (data not shown), so that it was decided to perform the NMR analyses with Go3, as a representative of the water-soluble polysaccharide system produced by *G. oxysperma*.

The ¹H and ¹³C NMR spectra of the native polysaccharide and its modified products were partially assigned using COSY, TOCSY, and HMQC experiments and by comparison with the chemical shift data of similarly substituted sugar residues.^{41–45} As these references correspond to unsulfated polysaccharides (bacterial rhamnans), we complemented their chemical shifts considering the α - and β -effect of sulfation.^{46,7}

The ¹³C NMR analyses of the sulfated polysaccharides (Go3, Go3r) show complex spectra with broadened signals in agreement with the heterogeneous pattern of glycosylation and sulfation of the rhamnosyl units together with the presence of other monosaccharides such as xylose and uronic acids. In addition, the presence of sulfated and nonsulfated branching points in the polysaccharidic fractions results in spectra with a high degree of overlapping. In accord with this structural complexity the ¹³C NMR spectra of Go3, Go3r (Figs. 2a and b), and Go3r-R show several anomeric resonances, at ~105 ppm attributed to β -glycosidic configurations⁴⁶ with those between 103 and 98 ppm being mainly assigned to α -rhamnosyl units.

The very intense high-field signals at 18.2–17.9 ppm (Figs. 2a–c) arise from C-6 of rhamnosyl units in agreement with major amounts of this 6-deoxysugar (Tables 1 and 2) and its complex pattern of substitution (Table 3). After carboxyl-reduction, the disappearance of the lower-field signal at 175.5 ppm (not shown) from carboxyl groups of uronic acids, along with the increase of the signal corresponding to unsubstituted C-6 (61.7 ppm), is in agreement with the conversion of glycopyranosiduronic acids to the corresponding neutral monosaccharides.

The α -anomeric configuration of rhamnosyl units was deduced from H-5 signals (data not shown) at 3.77–3.88 ppm (compared with the β -anomer at 3.39 ppm)⁴⁷ and C-5 signal at 70.6 ppm (compared with that of the β -anomer at 72.3–73.4 ppm),^{48,49} present in all the ¹³C NMR spectra (Figs. 2a–c and 3a, b).

Due to the relatively low glucuronic acid and xylose contents (Tables 1 and 2), their heterogeneous substitution patterns (Table 3), and overlapping of signals, it was very difficult to identify their chemical shifts. However, the low intensity signal at 105.2 ppm present in the spectrum of Go3r (Fig. 2b) could arise from nonreducing terminal β -D-xylosyl units based on the corresponding methyl glycoside resonance⁴⁶ as well as from 4-linked β -D-xylose and β -D-glucuronic acid residues.⁶ In addition, the C-1 signal at 102.6 ppm showed HMQC correlation with its linked proton at

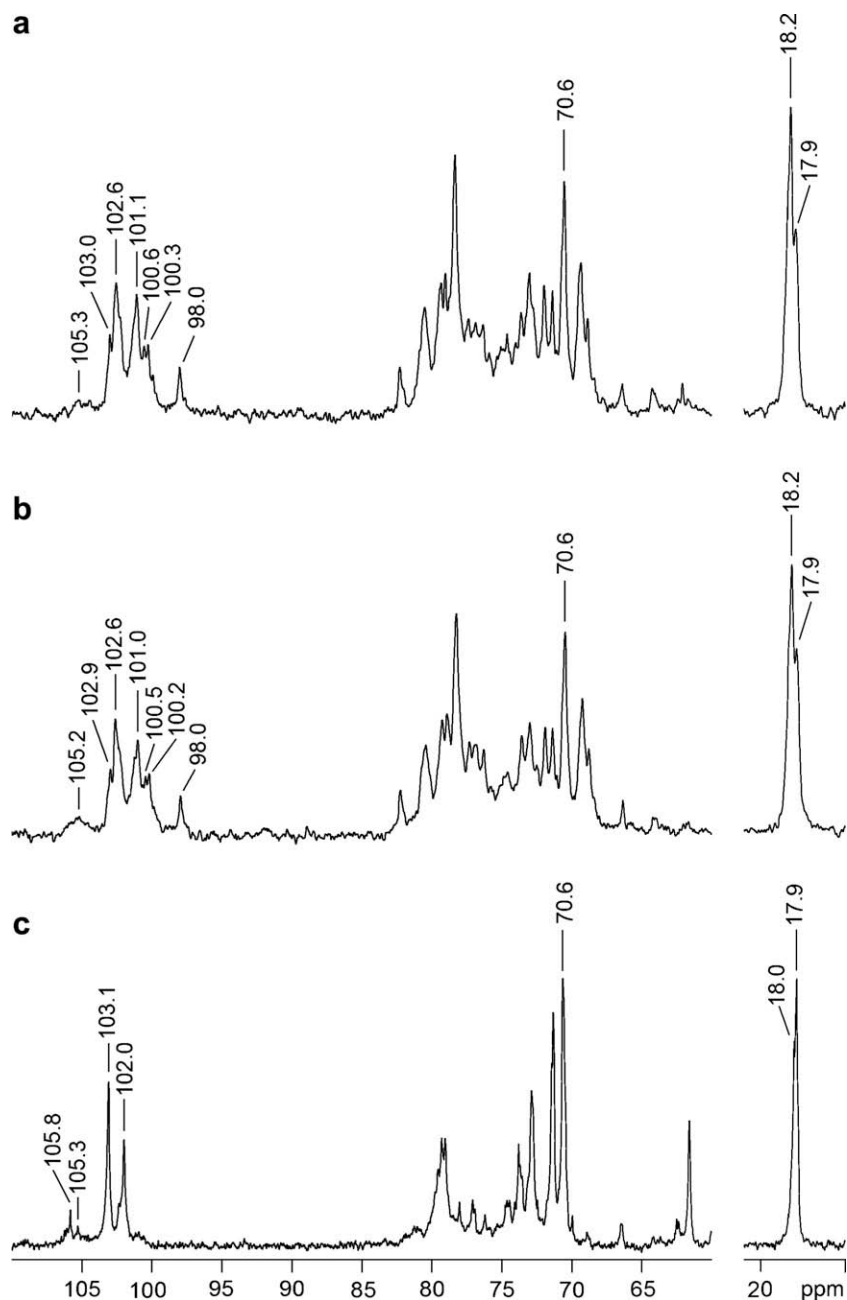


Figure 2. ^{13}C NMR spectra of the crude extract Go3 (a), purified polysaccharide Go3r (b), and the carboxyl-reduced and desulfated derivative Go3r-RD (c).

4.79 ppm, and could arise from β -D-glucuronic acid 2-sulfate residues. These resonances are in close agreement with those reported for 4-linked 2-substituted glucuronosyl residues present in an exopolysaccharide produced by a deep-sea bacterium⁵⁰ taking into account the additional effect of sulfation as well as those reported for 4-linked 2-sulfated glucuronosyl units.^{51,52} These assignments were corroborated by the disappearance of the correlation in the HMQC spectrum of the desulfated polysaccharide.

The ^1H NMR spectra of Go3r and the Smith-degraded product (Go3r-S) were qualitatively similar, and the anomeric resonances between 5.79 and 5.03 ppm were assigned to α -rhamnosyl units (Fig. 4a and c). The ^{13}C NMR spectra of Go3r (and Go3r-S) showed in the anomeric region several signals between 102.9 and 98.0 (103.6–98.0) ppm mainly attributed to α -L-rhamnosyl units (Figs. 2b and 3a). From the HMQC and COSY experiments of Go3r and (Go3r-S), the anomeric signals at 100.5 (100.4)/5.33, 100.2

(100.1)/5.48 (5.50), and 98.0/5.78 (5.79) ppm were assigned to 3-linked rhamnosyl units sulfated at C-2 and at both C-2 and C-4. Their C-2 signal appeared at 78.2 ppm, in agreement with the α -effect (+6.9 ppm) of sulfation of the 3-linked rhamnose residues (see Table 5). The H-1–H-2 cross-peaks, 5.48(5.50)/4.70 and 5.33/4.70 ppm, are consistent with sulfation at C-2. The influence of sulfation on these resonances was confirmed by the lack of those signals in the spectra of the desulfated products Go3r-RD and Go3r-SD (Figs. 2c, 3b, and 4b, d). The H-1, C-1, and C-2 resonances are in good agreement with those reported for the related α -D-mannose 2-sulfate units in the 3-linked mannans isolated from the red seaweed *Nothogenia fastigiata*.⁵³

In the HMQC spectra of Go3r and (Go3r-S), the anomeric signals at 101.3 (101.4) and 101.0 ppm correlated with their geminal hydrogens at 5.22 (5.23) and 5.27 (5.28) ppm that were ascribed to 3,4- and 4-sulfated 2-linked rhamnose residues (C-4 at

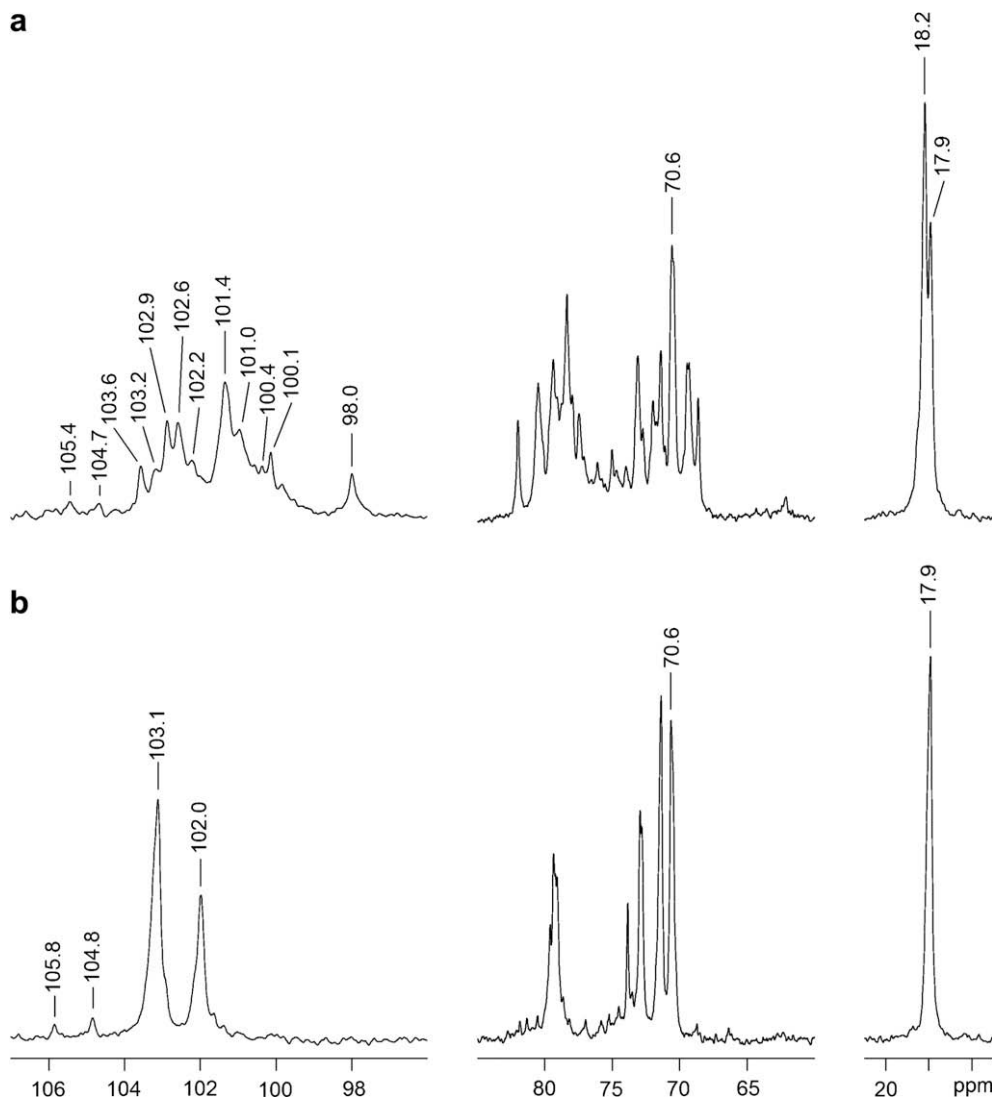


Figure 3. ¹³C NMR spectra of the Smith-degraded Go3r-S (a) and Smith-degraded and desulfated Go3r-SD (b) products.

82.0 ppm). Additionally these anomeric signals correspond to 2,3-substituted 4-sulfated or unsulfated rhamnose residues,⁴³ showing that part of the branching points remained after controlled Smith degradation. The anomeric signals at 102.9–102.6 and (103.6–102.6) ppm showed correlations with their geminal protons at 5.03–5.10 and (5.05–5.09) ppm, respectively. These resonances were attributed to 3-linked and 3-linked 4-sulfated rhamnose residues. The values for C-2 (71.4 ppm) and H-2 (4.17 ppm) are consistent with the lack of C-2 substitution, and are in accord with literature data for 3-linked and 3-linked 4-substituted rhamnose residues.^{41,42,54} For Go3r-S, the 4-sulfated residue gave C-4/H-4 and C-5/H-5 resonances at 80.5/4.36 and 69.3–69.2/3.94 ppm, respectively. In the spectrum of Go3r, similar resonances at 80.4/4.34 and 69.2/3.94 ppm were assigned to C-4/H-4 and C-5/H-5 of the 3-linked 4-sulfated rhamnose residues. In agreement with C-4 sulfation, these carbon resonances are shifted downfield (~7.6 ppm) and upfield (~1.1 ppm), respectively, when compared with the corresponding signals of the 3-linked rhamnose residues in the spectrum of the desulfated product (Figs. 2c and 3b, Table 5).

NMR analyses of the sulfated heterorhamnan thus confirm the presence of several types of sulfated 3- and 2-linked rhamnose residues as determined by methylation analysis.

2.7.2. NMR analyses of the desulfated polysaccharidic fractions

The desulfated polysaccharide (Go3r-RD) and the Smith-degraded and desulfated product (Go3r-SD, Table 2) were analyzed using 1D and 2D NMR spectroscopy. ¹³C NMR spectra of Go3r-RD (Fig. 2c) and Go3r-SD (Fig. 3b) showed two main anomeric signals attributed to 2,3-linked, 2-linked (102.0 ppm), and 3-linked (103.1 ppm) rhamnose residues in agreement with methylation results. The HMQC spectra of Go3r-RD and Go3r-SD (Fig. 5) contain well-defined cross-peaks for these anomeric nuclei at 102.0/5.20 for the 2-linked rhamnose residues^{41,42} (designed as residue **A** in Chart 1) and at 103.1/5.07 and 103.1/4.99 assigned to 3-linked rhamnose-(1→3)- and 3-linked rhamnose-(1→2)-rhamnose residues, respectively (residues **C** and **D**, respectively, Chart 1). The assignments for **C** and **D** residues (Table 5) are in accordance with those reported for the rhamnosyl repeating units present in the O-polysaccharide chains of the lipopolysaccharide from *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* NCPPB 2708.⁴¹ In addition, the signals at 5.26 and 5.27 ppm present in the spectra of Go3r-RD and Go3r-SD (Fig. 4b and d, respectively) were attributed to H-1 of 2,3-disubstituted rhamnose residues (residue **B**, Chart 1). For Go3r-RD, the HMQC spectrum showed that the H-1 signal at 5.26 ppm correlated with a carbon at 102.0 ppm. These assignments are in good agreement with the values reported for 2-linked 3-substituted

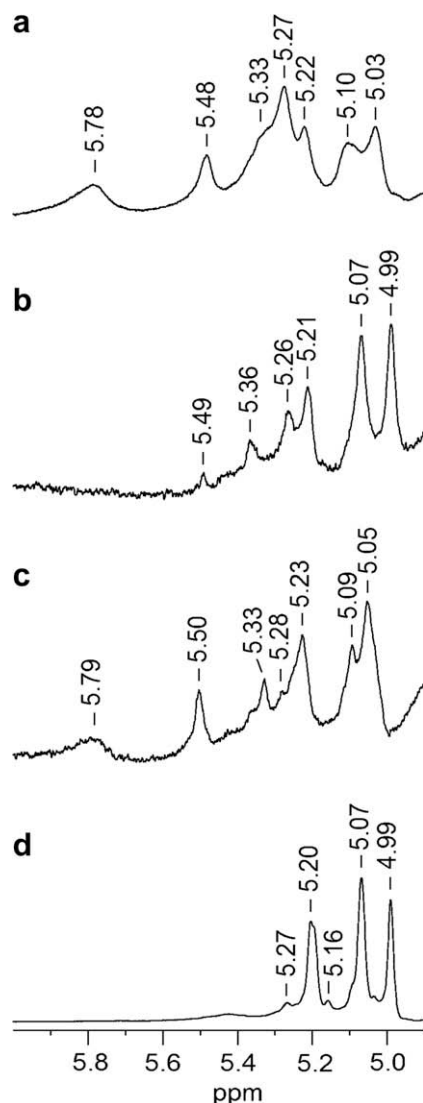


Figure 4. ^1H NMR spectra of the purified polysaccharide Go3r (a) carboxyl-reduced and desulfated derivative Go3r-RD (b), Smith-degraded Go3r-S (c), and Smith-degraded and desulfated Go3r-SD (d) products.

rhamnose residues from the O-polysaccharide of *P. syringae* pv. tomato GSPB 483.⁴³

The H-1 resonances of Go3r-RD and Go3r-SD at 5.26–5.27, 5.20, 5.07, and 4.99 ppm (Fig. 4b,d, Table 5) had relative integrals of

0.6:0.7:1.1:1.0 and 0.2:1.4:1.7:1.0, respectively. The H-1 signal intensity for 2,3-linked rhamnose residues (5.27 ppm) in Go3r-SD spectrum decreased in comparison with the corresponding signal (5.26 ppm) in the Go3r-RD spectrum. This result is in agreement with methylation analysis, which showed a decrease of the branching points after controlled Smith degradation. Furthermore, after this modification the intensity of the signal at 5.20 ppm increased with a concomitant decrease of that at 5.27 ppm, indicating the presence of branching points at C-3 of the 2-linked rhamnose residues. Therefore, NMR analyses complement and confirm methylation data and allow us to propose the major structural features of the heterorhamnan Go3r that are shown in Chart 2.

2.8. Cytotoxicity test of the sulfated heterorhamnans from *G. oxysperma*

The extracts with the highest yields Go3 and Go4 and the purified fraction Go3r, obtained on ultrafiltration, were initially evaluated for cytotoxicity by assessing their effects on Vero cell viability. For comparative purposes, heparin was simultaneously assayed as a known reference polysaccharide. No effect on cell viability was observed with any of these compounds at concentrations up to 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

2.9. Antiviral activity of the sulfated heterorhamnans against herpes simplex virus

The three polysaccharidic fractions were then screened for antiviral activity against strain F of HSV-1 and strain MS of HSV-2, by a virus plaque reduction assay on Vero cells. As shown in Table 6, Go3, Go3r, and Go4 exhibited potent in vitro antiherpetic activity with IC_{50} values ranging from 0.27 to 0.3 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for HSV-1 and values 10-fold lower from 0.036 to 0.054 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for HSV-2. Heparin was simultaneously assayed as a reference substance, and it was found less effective than the fractions obtained from *G. oxysperma* to inhibit the multiplication of HSV-1 and HSV-2.

Good anti HSV activity has also been reported with structurally different sulfated polysaccharides produced by green algae from genera *Enteromorpha*, *Monostroma*, *Caulerpa*, *Chaetomorpha*, and *Codium*.^{22,55} A rhamnan sulfate isolated from *Monostroma latissimum* showed potent antiviral effect against human cytomegalovirus (HCMV) and HIV-1. The antiviral action of the rhamnan sulfate was not only due to the inhibition of virus adsorption, but also might involve the later replication of virus in host cells.²⁰

Given the lack of cytotoxicity exhibited by the sulfated heterorhamnans analyzed in this work, and the very good antiviral activity against the two serotypes of HSV tested, they present very high selectivity indices (SI: ratio $\text{CC}_{50}/\text{IC}_{50}$), indicating the specificity of the inhibitory effect against herpesviruses.

Table 5

Chemical shift assignments of NMR spectra of Go3r-RD and Go3r-SD

Rhamnosyl residues	Chemical shift (ppm)						Chemical shift (ppm)					
	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6
C^a	103.1 (103.1)	71.3 (71.4)	79.3 (79.3)	72.9 (72.8/72.9)	70.6 (70.6)	17.9/18.0 (17.9)	5.07 (5.07)	4.18 (4.15)	3.92 (3.91)	3.60 (3.60)	3.76–3.88 (3.78–3.88)	1.30–1.33 (1.32)
D^a	103.1 (103.1)	71.3 (71.4)	79.0 (79.1)	72.9 (72.8/72.9)	70.6 (70.6)	17.9/18.0 (17.9)	4.99 (4.99)	4.18 (4.15)	3.87 (3.86)	3.62 (3.62)	3.76–3.88 (3.78–3.88)	1.30–1.33 (1.29)
A^a	102.0 (102.0)	79.3 (79.3)	71.3 (71.4)	73.8 (73.8)	70.6 (70.6)	17.9/18.0 (17.9)	5.21 (5.20)	4.09 (4.08)	3.96 (3.95)	3.53 (3.51)	3.76–3.88 (3.78–3.88)	1.30–1.33 (1.32)
B^b	102.0 (102.0)					17.9/18.0 (17.9)	5.26 (5.27)	4.09				1.30–1.33 (1.29–1.32)

In parentheses chemical shifts in Go3r-SD ^1H and ^{13}C NMR spectra.

^a In accordance with Refs. 41 and 42.

^b In accordance with Ref. 43.

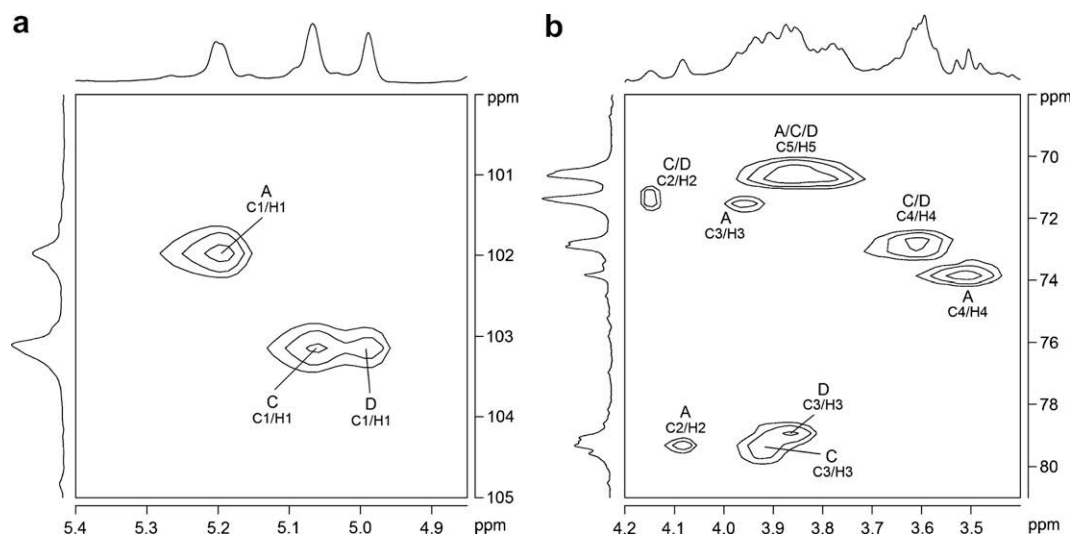


Figure 5. HMQC spectrum of Smith-degraded and desulfated Go3r-SD product, anomeric (a) and C-2-C-5/H-2-H-5 (b) regions. **A**, **C**, and **D** correspond to [\rightarrow 2]- α -L-Rhap-(1 \rightarrow), [\rightarrow 3]- α -L-Rhap-(1 \rightarrow 3)], and [\rightarrow 3]- α -L-Rhap-(1 \rightarrow 2)] residues, respectively (see Chart 1).

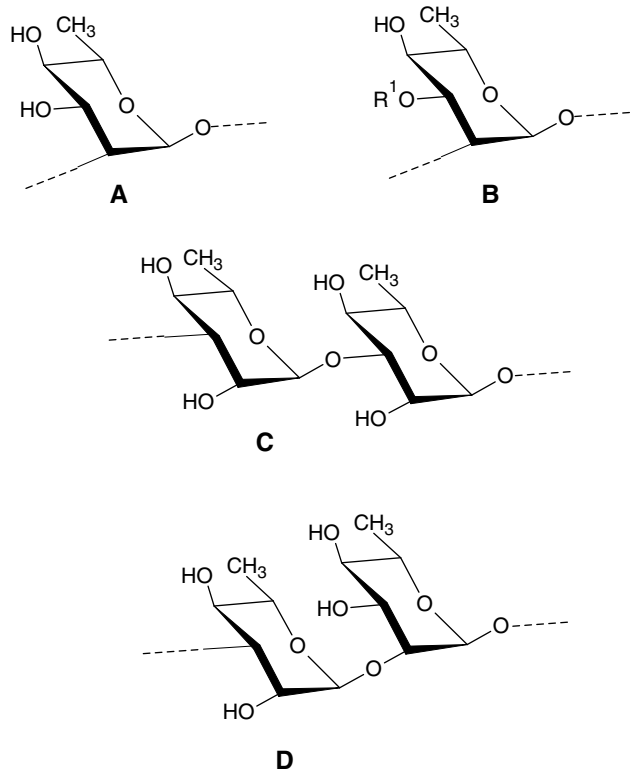


Chart 1. Major rhamnose residues present in the carboxyl-reduced and desulfated polysaccharide Go3r-RD and in the Smith-degraded and desulfated product Go3r-SD. **A**, **B**, **C**, and **D** correspond to [\rightarrow 2]- α -L-Rhap-(1 \rightarrow), [\rightarrow 2,3]- α -L-Rhap-(1 \rightarrow 3)], [\rightarrow 3]- α -L-Rhap-(1 \rightarrow 3)], and [\rightarrow 3]- α -L-Rhap-(1 \rightarrow 2)] residues, respectively. Go3r-RD: R¹ = side chains containing Glc, Gal (reduced uronic acids), or Xyl as nonreducing terminal units; Go3r-SD: R¹ = side chains containing Rha as nonreducing terminal units.

The antiviral activity of sulfated polysaccharides is linked to anionic features of the macromolecules as well as to their molecular weight.^{56–66} Moreover, as previously reported, the hydrophobic character of the constituent sugars seems to be important for antiviral activity of the polysaccharide.^{58,59} Therefore, the sulfated heterorhamnan from *G. oxysperma* presents a combination of

structural factors that determine its antiherpetic activity, such as high molecular weight and sulfate content (75% and 80% of the rhamnosyl and uronic acids, respectively are substituted by sulfate groups). Together with these structural characteristics, the hydrophobic character of the methyl group at C-5 of the rhamnosyl units is an additional factor that could contribute to the high and specific activity of the sulfated heterorhamnan isolated from the green seaweed *G. oxysperma*.

3. Experimental

3.1. Collection of specimens

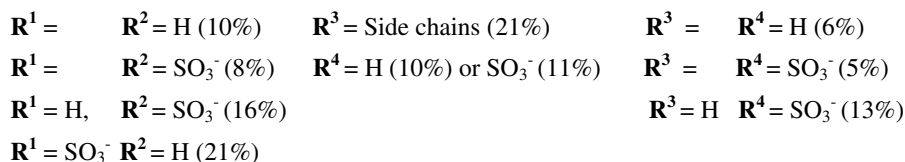
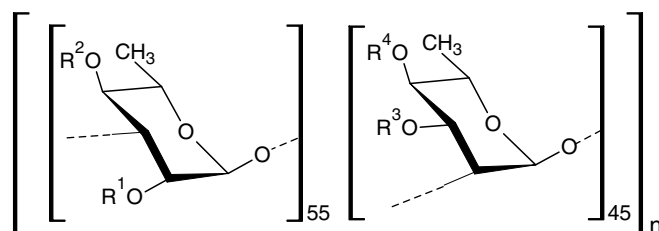
The specimen of the green seaweed *G. oxysperma* (Kützinger) K.L. Vinogradova ex Scagel et al. was cultivated at Bahia de Paranaguá, Paraná State (southern coast of Brazil).⁶⁷ The voucher specimen was deposited in the herbarium of the Department of Botany, Federal University of Paraná (Curitiba, Brazil) with herbarium number UPCB-58059. The fresh material was cleaned to remove undesirable contaminants, washed with tap water, sun-dried, and milled.

3.2. Extraction and purification of polysaccharides

The milled seaweed *G. oxysperma* was extracted twice with water (5% w/v) at 25 °C with mechanical stirring for 4 h. After centrifugation, the supernatant was precipitated with EtOH (3 vols), and the resulting precipitate was redissolved in water, dialyzed (cut-off 12–14 kDa), concentrated, and freeze-dried to give the crude extract Go1. This was repeated to give fraction Go2. The residue was then submitted to similar four successive aq extractions at 80 °C for 4 h, to afford the crude extracts Go3 to Go6. Fraction Go3 was submitted to ultrafiltration through a 300 kDa cut-off membrane, yielding a retained fraction (Go3r) and an eluted fraction (Go3e).

3.3. Analytical methods

Sulfate and uronic acid contents were determined by the methods of Dodgson and Price⁶⁸ and Filisetti-Cozzi and Carpita,⁶⁹ respectively. Total carbohydrate content was estimated by the phenol-sulfuric acid method,⁷⁰ using rhamnose as standard. Protein content was measured by the method of Lowry using the



Side chains containing Glc_pA 2-S (8%) or Gal_pA 2-S (6%) or Xyl_p (8%) as NRT

Chart 2. Major rhamnose residues present in the sulfated heterorhamnan Go3r. NRT = nonreducing terminal units.

Table 6

Antiviral activities of fractions obtained from *G. oxyperma*

Fractions	IC ₅₀ ^a (μg mL ⁻¹)		SI ^b (CC ₅₀ /IC ₅₀)	
	HSV-1 (F)	HSV-2 (MS)	HSV-1 (F)	HSV-2 (MS)
Go3	0.30 ± 0.15	0.054 ± 0.006	>3333	>18,518
Go3r	0.27 ± 0.03	0.036 ± 0.001	>3704	>27,778
Go4	0.28 ± 0.12	0.037 ± 0.001	>3571	>27,027
Heparin ^c	1.30 ± 0.1	0.50 ± 0.1	>769	>2000

^a IC₅₀ (inhibitory concentration 50%): concentration required to reduce plaque number in Vero cells by 50%. Each value is the mean of two determinations ± SD.

^b SI (selectivity index): CC₅₀/IC₅₀. CC₅₀ (cytotoxic concentration 50%): concentration required to reduce the number of viable Vero cells by 50% after 48 h of incubation with the fractions. This concentration was >1000 μg mL⁻¹ for all the fractions.

^c Heparin included as a reference substance.

Folin–Ciocalteu reagent with bovine serum albumin as standard.⁷¹ For monosaccharide composition, the polysaccharide samples were hydrolyzed using M TFA at 100 °C for 4 h. Hydrolysis products were reduced with NaBD₄, and after acetylation with 1:1 acetic anhydride–pyridine for 12 h at room temperature, the resulting alditol acetates derivatives were analyzed by GC–MS. GC–MS analyses were performed with a Varian 3800 chromatograph, equipped with a fused silica capillary column (30 m x 0.25 mm) coated with DB-225MS (Durabond), and a Varian Saturn 2000R 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. The enantiomeric configuration of rhamnose was carried out after reductive amination with chiral (*S*)- α -methylbenzylamine as previously described.⁷²

3.4. Carboxyl-reduction

The crude extract Go3 was esterified with 1-cyclohexyl-3-(2-morpholinoethyl) carbodiimide metho-*p*-toluenesulfonate and the product reduced with NaBH₄ to give Go3-R (68% yield).³⁴ Buffers MES and TES were used to maintain the pH.³⁵ Fraction Go3r was carboxyl-reduced using the same method described above, but using NaBD₄ to give Go3r-R (70% yield).

3.5. Controlled Smith degradation

Go3r-R (130 mg) and Go3r (130 mg) were oxidized with 0.05 M aq NaIO₄ (20 mL) for 72 h at 25 °C in the dark.³⁷ Each sample was dialyzed, and treated with NaBH₄ (pH 9–10) for 20 h, neutralized

with HOAc, dialyzed, freeze-dried, and submitted to partial acid hydrolysis (M TFA, 20 h, 25 °C).³⁸ The products of controlled Smith degradation were dialyzed and freeze-dried to afford Go3r-RS and Go3r-S (50% yield).

3.6. Desulfation

Partial solvolytic desulfation was carried out as previously described.³⁶ The polysaccharides Go3r-R (60 mg), Go3r-RS (40 mg), and Go3r-S (50 mg) in the pyridinium salt form were treated with 89:10:1 Me₂SO–MeOH–pyridine at 100 °C for 4 h. The desulfated polysaccharides were recovered after dialysis and freeze-drying to afford Go3r-RD (70% yield), Go3r-RSD (80% yield), and Go3r-SD (72% yield), respectively.

3.7. Methylation analysis

Per-O-methylation was carried out by the method of Ciucanu and Kerek⁷³ with the carboxyl-reduced polysaccharides (Go3r-R and Go3r-RD) and carboxyl-reduced and Smith-degraded products (Go3r-RS and Go3r-RSD). The samples (15 mg) in the triethylammonium salt form⁷⁴ were dissolved in Me₂SO (1 mL), and powdered NaOH (30 mg) was added. After 30 min at 25 °C with stirring, MeI (0.1 mL) was added, and the reaction was allowed to proceed as described above. The process was repeated twice and the reaction was interrupted by addition of water (2 mL) and neutralized with 50% aqueous AcOH. The products were dialyzed against distilled water, freeze-dried and submitted to more two steps of methylation in the same way as described above. Partially methylated alditol acetates were generated by hydrolysis in aqueous formic acid (45%, for 16 h, at 100 °C), followed by NaBD₄ reduction and acetylation. The products were analyzed by GC–MS and identified by their typical electron-impact breakdown profiles and retention times.^{75,76} A portion of per-O-methylated Go3r-R was sequentially desulfated,³⁶ then trideuteromethylated as described above, but using trideuterated iodomethane. The partially methylated and trideuteromethylated alditol acetates were generated and analyzed as described above.

3.8. High-pressure size-exclusion chromatography (HPSEC) analysis

HPSEC-MALLS-RI analysis was carried out with a 1 mg mL⁻¹ soln of the polysaccharide, using a Waters high-performance size exclusion chromatography (HPSEC) apparatus coupled to a

differential refractometer (RI) and a Wyatt Technology Dawn-F multi-angle laser light scattering (MALLS) detector adapted on-line. Four Waters Ultrahydrogel columns (2000, 500, 250, and 120) were connected in series and coupled with multi-detection equipment. A 0.1 M NaNO₃ soln, containing NaN₃ (0.5 g L⁻¹), was used as eluent. The value of dn/dc (differential refractive index to change in solute concentration) was determined using five concentrations, between 1.0 and 0.2 mg mL⁻¹. HPSEC data were collected and analyzed by the Wyatt Technology ASTRA program. All experiments were carried out at 25 °C.

3.9. Spectroscopic methods

For nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR) analysis, each lyophilized sample was dissolved in D₂O (~30 mg mL⁻¹). The NMR spectrum of the solution was recorded at 70 °C using a Bruker Advance DRX400 NMR spectrometer, equipped with a 5 mm multi-nuclear inverse detection probe, at a base frequency of 100.63 MHz for ¹³C and 400 MHz for ¹H nuclei. Chemical shifts are expressed in ppm using acetone as internal standard at 31.45 and 2.225 ppm for ¹³C and ¹H, respectively. For ¹H and 2D NMR experiments, the samples were deuterium exchanged by successive freeze-drying steps in D₂O (99.9%) and then dissolved in D₂O (20–30 mg mL⁻¹). ¹H and ¹³C acquisition parameters were previously reported.⁷⁷ 2D ¹H, ¹H COSY, TOCSY, and ¹H, ¹³C HMQC experiments were carried out using the pulse programs supplied with the Bruker manual.

Fourier-transform infrared (FTIR) spectra were recorded on a Perkin–Elmer series 2000 FTIR spectrometer using the polysaccharides in the KBr pellets form.

3.10. Cells and viruses

Vero (African green monkey kidney) cells were grown in Eagle's minimum essential medium (MEM) (GIBCO, USA) supplemented with 5% calf serum (GIBCO, USA). For maintenance medium (MM), the serum concentration was reduced to 1.5%.

HSV-1 strain F and HSV-2 strain MS were used for the antiviral assays. Virus stocks were propagated and titrated by plaque formation in Vero cells.

3.11. Cytotoxicity test

Vero cell viability was measured by the MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide; Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA) method. Confluent cultures in 96-well plates were exposed to different concentrations of the polysaccharides, with three wells for each concentration, using incubation conditions equivalent to those used in the antiviral assays. Then 10 µL of MM containing MTT (final concentration 0.5 mg mL⁻¹) was added to each well. After 2 h of incubation at 37 °C, the supernatant was removed and 200 µL of EtOH was added to each well to solubilize the formazan crystals. After vigorous shaking, absorbance was measured in a microplate reader at 595 nm. The cytotoxic concentration 50% (CC₅₀) was calculated as the compound concentration required to reduce cell viability by 50%.

3.12. Virus plaque reduction assay

Antiviral activity was evaluated by a virus plaque reduction assay. Vero cell monolayers grown in 24-well plates were infected with about 50 PFU/well in the absence or presence of various concentrations of the fractions. After 1 h of adsorption at 37 °C, the residual inoculum was replaced by MM containing 0.7% methylcellulose and the corresponding dose of each fraction. Plaques were counted after 2 days of incubation at 37 °C. The IC₅₀ was calculated

as the fraction concentration required to reduce virus plaques by 50%. All determinations were performed twice and each in duplicate. Heparin was from Sigma–Aldrich, USA.

Acknowledgments

This work was supported by grants from Fundação Araucária/CNPq-Brasil (PRONEX–Carboidratos), MCT/CNPq/MS–SCTIE–DECIT/CT–Saúde (processo 554671/2006–9, Brasil), Universidad de Buenos Aires, Agencia Nacional para la Promoción Científica y Tecnológica and Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). M.D.N. and M.E.D. are Research Members of the National Research Council of Brazil (CNPq), E.B.D. is Research member of CONICET (Argentina). J.E.F.C. acknowledges a doctoral scholarship from CNPq.

References

- Painter, T. J. In *The Polysaccharides*; Aspinall, G. O., Ed.; Academic: London, UK, 1983; Vol. 2., pp 195–285.
- Ray, B.; Lahaye, M. *Carbohydr. Res.* **1995**, *274*, 251–261.
- Ray, B.; Lahaye, M. *Carbohydr. Res.* **1995**, *274*, 313–318.
- Lahaye, M.; Ray, B. *Carbohydr. Res.* **1996**, *283*, 161–173.
- Quemener, B.; Lahaye, M.; Bobin-Dubigeon, C. *J. Appl. Phycol.* **1997**, *9*, 179–188.
- Lahaye, M.; Brunel, M.; Bonnin, E. *Carbohydr. Res.* **1997**, *304*, 325–333.
- Lahaye, M.; Inizan, F.; Vigouroux, J. *Carbohydr. Polym.* **1998**, *36*, 239–249.
- Lahaye, M. *Carbohydr. Res.* **1998**, *314*, 1–12.
- Lee, J. B.; Yamagaki, T.; Maeda, M.; Nakanishi, H. *Phytochemistry* **1998**, *48*, 921–925.
- Harada, N.; Maeda, M. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1998**, *62*, 1647–1652.
- Ray, B. *Carbohydr. Polym.* **2006**, *66*, 408–416.
- Chattopadhyay, K.; Mandal, P.; Lerouge, P.; Driouich, A.; Ghosal, P.; Ray, B. *Food Chem.* **2007**, *104*, 928–935.
- Bilan, M. I.; Vinogradova, E. V.; Shashkov, A. S.; Usov, A. I. *Carbohydr. Res.* **2007**, *342*, 586–596.
- Ciancia, M.; Quintana, I.; Vizcargüenaga, M. I.; Kasulin, L.; Dios, A.; Estevez, J. M.; Cerezo, A. S. *Int. J. Biol. Macromol.* **2007**, *41*, 641–649.
- Farias, E. H. C.; Pomin, V. H.; Valente, A. P.; Nader, H. B.; Rocha, H. A. O.; Mourão, P. A. S. *Glycobiology* **2008**, *18*, 250–259.
- Lahaye, M.; Axelos, M. A. V. *Carbohydr. Polym.* **1993**, *22*, 261–265.
- Lahaye, M.; Cimadevilla, E. A. C.; Kuhlenskamp, R.; Quemener, B.; Lognonné, V.; Dion, P. *J. Appl. Phycol.* **1999**, *11*, 1–7.
- Lahaye, M.; Robić, A. *Biomacromolecules* **2007**, *8*, 1765–1774.
- Ivanova, V.; Rouseva, R.; Kolarova, M.; Serkedjieva, J.; Rachev, R.; Manolova, N. *Prep. Biochem.* **1994**, *24*, 83–97.
- Lee, J. B.; Hayashi, K.; Hayashi, T.; Sankawa, U.; Maeda, M. *Planta Med.* **1999**, *65*, 439–441.
- Santos, M. G. M.; Lagrota, M. H. C.; Miranda, M. M. F. S.; Yoneshigue-Valentin, Y.; Wigg, M. D. *Bot. Mar.* **1999**, *42*, 227–230.
- Lee, J. B.; Hayashi, K.; Maeda, M.; Hayashi, T. *Planta Med.* **2004**, *70*, 813–817.
- Leiro, J. M.; Castro, R.; Arranz, J. A.; Lamas, J. *Int. Immunopharmacol.* **2007**, *7*, 879–888.
- Maeda, M.; Uehara, T.; Harada, N.; Sekiguchi, M.; Hiraoka, A. *Phytochemistry* **1991**, *30*, 3611–3614.
- Zhang, H. J.; Mao, W. J.; Fang, F.; Li, H. Y.; Sun, H. H.; Chen, Y.; Qi, X. H. *Carbohydr. Polym.* **2008**, *71*, 428–434.
- Mao, W.; Zang, X.; Li, Y.; Zhang, H. J. *Appl. Phycol.* **2006**, *18*, 9–14.
- Qi, H.; Zhang, Q.; Zhao, T.; Chen, R.; Zhang, H.; Niu, X.; Li, Z. *Int. J. Biol. Macromol.* **2005**, *37*, 195–199.
- Qi, H.; Zhang, Q.; Zhao, T.; Hu, R.; Zhang, K.; Li, Zhen. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 2441–2445.
- Pengzhan, Y.; Ning, L.; Xiguang, L.; Gefei, Z.; Quanbin, Z.; Pengcheng, L. *Pharmacol. Res.* **2003**, *48*, 543–549.
- Pengzhan, Y.; Quanbin, Z.; Ning, L.; Zuhong, X.; Yanmei, W.; Zhi'en, L. *J. Appl. Phycol.* **2003**, *15*, 21–27.
- Yamamoto, M. *Agric. Biol. Chem.* **1980**, *44*, 589–593.
- Yamamoto, M.; Tadokoro, Y.; Imai, H.; Mita, K. *Agric. Biol. Chem.* **1980**, *44*, 723–729.
- Paradossi, G.; Cavalieri, F.; Pizzoferrato, L.; Liquori, A. M. *Int. J. Biol. Macromol.* **1999**, *25*, 309–315.
- Taylor, R. L.; Conrad, H. E. *Biochemistry* **1972**, *11*, 1383–1388.
- Stone, B. A.; Anderson, M. A. *Carbohydr. Polym.* **1985**, *5*, 115–120.
- Nagasawa, K.; Inoue, Y.; Tokuyasu, T. *J. Biol. Chem.* **1979**, *86*, 1323–1327.
- Goldstein, I. J.; Hay, W. G.; Lewis, A. B.; Smith, F. *Methods Carbohydr. Chem.* **1965**, *5*, 361–370.
- Furneaux, R. H.; Stevenson, T. T. *Hydrobiologia* **1990**, *204/205*, 615–620.
- Percival, E.; Wold, J. K. *J. Chem. Soc.* **1963**, 5459–5468.
- McKinnell, J. P.; Percival, E. *J. Chem. Soc.* **1962**, 3141–3148.
- Ovod, V. V.; Zdorovenko, E. L.; Shashkov, A. S.; Kocharova, N. A.; Knirel, Y. A. *Microbiology* **2004**, *73*, 666–677.

42. Senchenkova, S. N.; Shashkov, A. S.; Laux, P.; Knirel, Y. A.; Rudorph, K. *Carbohydr. Res.* **1999**, *319*, 148–153.
43. Knirel, Y. A.; Ovod, V. V.; Zdorovenko, G. M.; Gvozdyak, R. I.; Krohn, K. J. *Eur. J. Biochem.* **1998**, *258*, 657–661.
44. Knirel, Y. A.; Ovod, V. V.; Paramonov, N. A.; Krohn, K. J. *Eur. J. Biochem.* **1998**, *258*, 716–721.
45. Bock, K.; Pedersen, C.; Pedersen, H. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **1990**, *42*, 193–225.
46. Gorin, P. A. J.; Mazurek, M. *Can. J. Chem.* **1975**, *53*, 1212–1223.
47. Jansson, P. E.; Kenne, L.; Widmalm, G. *Carbohydr. Res.* **1989**, *188*, 169–191.
48. Lipkind, G. M.; Shashkov, A. S.; Knirel, Y. A.; Vinogradov, E. V.; Kochetkov, N. K. *Carbohydr. Res.* **1988**, *175*, 59–75.
49. Backinowsky, L. V.; Balan, N. F.; Shashkov, A. S.; Kochetkov, N. K. *Carbohydr. Res.* **1980**, *84*, 225–235.
50. Roger, O.; Kervarec, N.; Ratskol, J.; Collic-Jouault, S.; Chevolut, L. *Carbohydr. Res.* **2004**, *339*, 2371–2380.
51. Casu, B.; Grazioli, G.; Razi, N.; Guerrini, M.; Naggi, A.; Torri, G.; Oreste, P.; Tursi, F.; Zoppetti, G.; Lindahl, U. *Carbohydr. Res.* **1994**, *263*, 271–284.
52. Kovensky, J.; Cirelli, A. F. *Carbohydr. Res.* **1997**, *303*, 119–122.
53. Kolender, A. A.; Pujol, C. A.; Damonte, E. B.; Matulewicz, M. C.; Cerezo, A. S. *Carbohydr. Res.* **1997**, *304*, 53–60.
54. Zdorovenko, E. L.; Ovod, V. V.; Shashkov, A. S.; Kocharova, N. A.; Knirel, Y. A.; Krohn, K. *Biochemistry (Moscow)* **1999**, *64*, 765–773.
55. Ghosh, P.; Adhikari, U.; Ghosal, P. K.; Pujol, C. A.; Carlucci, M. J.; Damonte, E. B.; Ray, B. *Phytochemistry* **2004**, *65*, 3151–3157.
56. Witvrouw, M.; De Clercq, E. *Gen. Pharmacol.* **1997**, *29*, 497–511.
57. Talarico, L. B.; Zibetti, R. G. M.; Faria, P. C. S.; Scolaro, L. A.; Duarte, M. E. R.; Nosedá, M. D.; Pujol, C. A.; Damonte, E. B. *Int. J. Biol. Macromol.* **2004**, *34*, 63–71.
58. Duarte, M. E. R.; Cauduro, J. P.; Nosedá, D. G.; Nosedá, M. D.; Gonçalves, A. G.; Pujol, C. A.; Damonte, E. B.; Cerezo, A. S. *Carbohydr. Res.* **2004**, *339*, 335–347.
59. Damonte, E. B.; Matulewicz, M. C.; Cerezo, A. S. *Curr. Med. Chem.* **2004**, *11*, 2399–2419.
60. Talarico, L. B.; Pujol, C. A.; Zibetti, R. G. M.; Faria, P. C. S.; Nosedá, M. D.; Duarte, M. E. R.; Damonte, E. B. *Antivir. Res.* **2005**, *66*, 103–110.
61. Matsuhira, B.; Conte, A. F.; Damonte, E. B.; Kolender, A. A.; Matulewicz, M. C.; Mejias, E. G.; Pujol, C. A.; Zúñiga, E. A. *Carbohydr. Res.* **2005**, *340*, 2392–2402.
62. Faria-Tischer, P. C. S.; Talarico, L. B.; Nosedá, M. D.; Guimarães, S. M. P. B.; Damonte, E. B.; Duarte, M. E. R. *Carbohydr. Polym.* **2006**, *63*, 459–465.
63. Talarico, L. B.; Duarte, M. E. R.; Zibetti, R. G. M.; Nosedá, M. D.; Damonte, E. B. *Planta Med.* **2007**, *73*, 1464–1468.
64. Qiu, H.; Tang, W.; Tong, X.; Ding, K.; Zuo, J. *Carbohydr. Res.* **2007**, *342*, 2230–2236.
65. Ponce, N. M. A.; Pujol, C. A.; Damonte, E. B.; Flores, M. L.; Stortz, C. A. *Carbohydr. Res.* **2003**, *338*, 153–165.
66. Kolender, A. A.; Matulewicz, M. C.; Cerezo, A. S. *Carbohydr. Res.* **1995**, *273*, 179–185.
67. Pellizzari, F. M.; Absher, T.; Yokoya, N. S.; Oliveira, E. C. *J. Appl. Phycol.* **2007**, *19*, 63–69.
68. Dodgson, K. S.; Price, R. G. *Biochem. J.* **1962**, *84*, 106–110.
69. Filisetti-Cozzi, T. M. C. C.; Carpita, N. C. *Anal. Biochem.* **1991**, *197*, 157–162.
70. Dubois, M.; Gilles, K. A.; Hamilton, J. K.; Rebers, P. A.; Smith, F. *Anal. Chem.* **1956**, *28*, 350–356.
71. Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L.; Randall, R. J. *J. Biol. Chem.* **1951**, *193*, 265–275.
72. Cases, M. R.; Cerezo, A. S.; Stortz, C. A. *Carbohydr. Res.* **1995**, *269*, 333–341.
73. Ciucanu, I.; Kerek, F. *Carbohydr. Res.* **1984**, *131*, 209–217.
74. Stevenson, T. T.; Furneaux, R. H. *Carbohydr. Res.* **1991**, *210*, 277–298.
75. Janson, P. E.; Kenne, L.; Liedgren, H.; Lindberg, B.; Lönngrén, J. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1976**, *41*, 1–70.
76. Sasaki, G. L.; Gorin, P. A. J.; Souza, L. M.; Czelusniak, P. A.; Iacomini, M. *Carbohydr. Res.* **2005**, *340*, 731–739.
77. Ascêncio, S. D.; Orsato, A.; França, R. A.; Duarte, M. E. R.; Nosedá, M. D. *Carbohydr. Res.* **2006**, *341*, 677–682.