

ADRIANO GONÇALVES VIANA

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DE POLISSACARÍDEOS NEUTROS E
SULFATADOS ISOLADOS DE ALGAS VERMELHAS E CINÉTICA QUÍMICA
DA REAÇÃO DE CICLIZAÇÃO EM GALACTANAS SULFADAS.**

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

Orientador: Prof. Dr. Miguel Daniel Nosedá

Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria Eugênia Duarte Nosedá

CURITIBA

2005

ADRIANO GONÇALVES VIANA

**ESTRUTURA QUÍMICA DE POLISSACARÍDEOS NEUTROS E
SULFATADOS ISOLADOS DE ALGAS VERMELAS E CINÉTICA
QUÍMICA DA REAÇÃO DE CICLIZAÇÃO EM GALACTANAS
SULFATADAS**

Tese aprovada como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Ciências – Bioquímica, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora.

Prof. Dr. Miguel Daniel Nosedá (Orientador),
Depto. de Bioquímica e Biologia Molecular - UFPR

Profª Drª Selma Faria Zawadzki Baggio
Depto. de Bioquímica e Biologia Molecular - UFPR

Profª Drª Eliana Beleski Borba Carneiro
Departamento de Química – UEPG

Profª Drª Cirene Lesniowski Delgobo
Departamento de Análises Clínicas – UFSC

Prof. Dr. Alberto Saul Cerezo
Departamento de Química Orgânica – Universidade Buenos Aires, Argentina

Curitiba, 28 de fevereiro de 2005.

Dedico esta tese a minha Mãe, ao meus
irmãos Cris e Luís e ao meu sobrinho João
Luís.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Miguel D. Nosedá e à Prof^a. Ma. Eugênia D. Nosedá, pela orientação, ensinamentos e pela amizade oferecida durante todos estes longos anos de convivência (estágio, monitoria, iniciação científica, mestrado e doutorado), muito obrigado.

Ao Prof. Marcelo Iacomini e à Prof^a. Selma F. Z. Baggio, por terem aceito prontamente o convite para integrarem a banca interna examinadora deste tese.

Ao Prof. Cerezo, pela presença marcante e incentivadora na banca, com certeza uma “personalidade” no mundo científico em quem se espelhar.

A Prof^a. Eliana B. B. Carneiro, que me acompanhou em todos os meus passos (monografia, mestrado e doutorado), sempre muito crítica e incentivadora, obrigado por suas valiosas sugestões e pela amizade.

A Prof^a. Cirene Delgobo, pela disponibilidade e pela valiosa correção da tese, muito obrigado.

Às Prof^{as}. Nair S. Yokoya e Silvia M. P. B. Guimarães do Instituto de Botânica do estado de São Paulo e ao Prof. José Marcos de C. Nunes da UFBA pela coleta e identificação de algumas das algas marinhas estudadas neste trabalho.

À Rosiane, mais que uma companheira de laboratório, mais que uma grande amiga, um modelo de caráter, respeito, competência e profissionalismo. Você é e sempre será uma fonte de inspiração para todos aqueles que tiverem a sorte, que eu tive, de tela ao lado. Te adoro!!!

Ao meu amlllllgo Rodrigo Vassoler (o Vassa), por nossa amizade que se consolidou nestes últimos anos, pelo companheirismo, pelas farras, pelos longos papos de cantina e boteco, e por não deixar que nenhuma “pedra” se colocasse no nosso caminho. Valeu cara!!!

A Juliana, amorzinho meu, gralhinha e pipipi pipipiiii pipi pipi!!!! Sem você essa 248 não teria a menor graça!!!! Te adoro, você mora no meu coração!!!!

Ao Alan, por nossa amizade, pelas bebedeiras, caronas, festas, academias, ensinamentos, “Dragon Mega I”, longos papos, praias e por que não, pelas nossas brigas. Valeu garoto!!!

À Fernanda, pela amizade e pelos bons momentos, muito obrigado por tudo, você sempre estará no meu coração e nas minhas lembranças.

À Paula, pela nossa amizade, companheirismo, conversas, risadas e caronas. Você é uma grande amiga, te adoro!!!

Ao Diogo, ao Marco, a Luciana e ao Sérgio pela nossa amizade, pela solidariedade, pelos ensinamentos e pelas trocas de experiências, mas principalmente pelas boas risadas que deixavam o dia a dia muito divertido.

À Lilian, ao Luciano e à Carol, pelas festas da época da faculdade e pelas mais recentes, pelas viagens, pelo “Dragon Mega I” e principalmente pela nossa amizade já antiga e com certeza ainda mais duradoura, valeu galera!!!!.

Ao Leonardo, à Giovana, à Rose Adele, ao Helisson, `a Lys, à Juliana Ramos, ao Humberto e ao Stefan pela nossa amizade, pelas festas, brincadeiras, companheirismo e pela sempre divertida convivência, muito obrigado vocês são D+!!!

Ao Guilherme e à Elaine “the crazy”, por nossa amizade e risadas, mas principalmente pelos conselhos, ensinamentos, disponibilidade e por me transmitirem suas experiências, sempre de muita valia, obrigado.

À Ana Helena, à Carol M., ao Rodrigo Reis, ao Ricardo W., ao Thales, à Ana Paula e à Andréia pela amizade, companheirismo, boa convivência e pelo intenso intercâmbio de reagentes!!!

À Angela e à Michele pelas nossas aventuras, desventuras e atividades extra-universidade. Para um bom divertimento nada melhor que essa dupla dinâmica!!!! Muito obrigado pela amizade e pela presença constante.

À Caxambu, cidade que nos acolheu muitas vezes e palco de muitas histórias que renderam muitas cervejas e muitas gargalhadas. Também a cidade natal do terrível ‘Dragon Mega II’, o bicho de nove cabeças.

À Andréia (de novo!!!), Rosane e Lauro pelas análises de GPC, GC e GC-MS, obrigado.

Aos demais colegas do departamento de Bioquímica que de uma forma ou de outra contribuíram nesta tese.

À D. Marilza, aos funcionários do departamento e as bibliotecárias, pela colaboração, obrigado.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	v
LISTA DE TABELAS.....	ix
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS.....	xii
RESUMO.....	xv
ABSTRACT.....	xvi
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. ALGAS: ASPECTOS GERAIS.....	1
1.2. CLASSIFICAÇÃO DAS ALGAS.....	2
1.2.1. A DIVISÃO RHODOPHYTA.....	2
1.3. A PAREDE CELULAR.....	4
1.4. AS GALACTANAS SULFATADAS.....	5
1.4.1. A CLASSIFICAÇÃO DAS CARRAGENANAS.....	7
1.4.2. A CLASSIFICAÇÃO DAS AGARANAS.....	11
1.5. XILANAS.....	14
1.6. MANANAS E XILOMANANAS.....	16
1.7. TRATAMENTO ALCALINO E REAÇÃO DE CICLIZAÇÃO.....	17
1.8. MECANISMO DE FORMAÇÃO DE GÉIS.....	22
1.9. OBTENÇÃO DE OLIGOSSACARÍDEOS ATRAVÉS DE HIDRÓLISE REDUTIVA PARCIAL.....	23
2. OBJETIVOS.....	27
2.1. OBJETIVOS GERAIS.....	27
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	27
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
3.1. MATERIAL.....	28
3.1.1. POSICIONAMENTO SISTEMÁTICO DAS ESPÉCIES ESTUDADAS.....	29
3.2. EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS.....	31
3.3. OBTENÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS NEUTROS E SULFATADOS (PRECIPITAÇÃO COM CETAVLON).....	31
3.4. PRECIPITAÇÃO COM KCL.....	32

3.5. MÉTODOS ANALÍTICOS GERAIS.....	
3.5.1. DOSAGEM DE AÇÚCAR TOTAL.....	32
3.5.2. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE GRUPOS SULFATO.....	32
3.5.3. DOSAGEM DE PROTEÍNAS.....	33
3.5.4. DOSAGEM DO TEOR DE 3,6-ANIDROGALACTOSE.....	33
3.5.5. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE CINZAS.....	33
3.5.6. DOSAGEM DE AÇÚCARES REDUTORES.....	34
3.5.7. POLARIMETRIA.....	34
3.6. MÉTODOS HIDROLÍTICOS.....	34
3.6.1. HIDRÓLISE ÁCIDA TOTAL.....	34
3.6.2. HIDRÓLISE ÁCIDA TOTAL DO TIPO HIDRÓLISE REDUTIVA.....	34
3.6.3. METANÓLISE.....	35
3.7. MODIFICAÇÃO QUÍMICA DOS POLISSACARÍDEOS.....	35
3.7.1. DESSULFATAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS.....	35
3.7.2. DEGRADAÇÃO CONTROLADA DE SMITH.....	36
3.7.3. TRATAMENTO ALCALINO.....	36
3.7.3.1. METODO PREPARATIVO.....	36
3.7.3.2. METODO ANALÍTICO.....	36
3.7.4. HIDRÓLISE REDUTIVA ÁCIDA PARCIAL – OBTENÇÃO DE OLIGOSSACARÍDEOS.....	37
3.8. ANÁLISE DE METILAÇÃO.....	37
3.9. MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS.....	38
3.9.1. CROMATOGRAFIA DE TROCA IONICA EM DEAE-SEPHACEL	38
3.9.2. CROMATOGRAFIA DE TROCA IONICA EM DEAE-SEPHAROSE CL-6B.....	38
3.9.3 CROMATOGRAFIA LÍQUIDO-GASOSA (CG).....	39
3.9.4. CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSA (CG-EM).....	39
3.9.5. CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO ESTÉRICA DE ALTA PRESSÃO (HPSEC) ACOPLADA A DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO DIFERENCIAL E ESPALHAMENTO DE LUZ EM MULTIÂNGULOS (MALLS).....	40

3.9.5.1. ANÁLISE DE HOMOGENEIDADE.....	40
3.10. MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS.....	40
3.10.1. ANÁLISES DE INFRAVERMELHO.....	40
3.10.2. RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR.....	41
3.10.2.1. RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE CARBONO-13 (RMN- ¹³ C).....	41
3.10.2.2. RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE PRÓTON (RMN – ¹ H).....	41
3.10.2.3. HMQC (HETERONUCLEAR MULTIPLE QUANTUM CORRELATION SPECTROSCOPY).....	41
3.11. ESTUDO CINÉTICO DA REAÇÃO DE CICLIZAÇÃO.....	42
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
4.1. CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DOS POLISSACARÍDEOS NEUTROS E SULFATADOS ISOLADOS DE ALGAS VERMELHAS.....	43
4.1.1. ESTRUTURA DAS XILANAS PRESENTES NAS FRAÇÕES SOLÚVEIS.....	49
4.1.2. ESTRUTURAS DAS XILOMANANAS SULFATADAS PRESENTES NAS FRAÇÕES PRECIPITADAS COM CETAVLON.....	66
4.2. CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E ESTUDO DA CINÉTICA QUÍMICA DA REAÇÃO DE CICLIZAÇÃO EM GALACTANAS SULFATADAS ISOLADAS DE ALGAS VERMELHAS.....	93
4.2.1. EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS SULFATADOS.....	94
4.2.1.1. DETERMINAÇÃO DA ESTRUTURA QUÍMICA DE ECW.....	97
4.2.1.2. DETERMINAÇÃO DA ESTRUTURA QUÍMICA DE F1 E F2.....	108
4.2.2. ESTUDO CINÉTICO DA REAÇÃO DE CICLIZAÇÃO NOS POLISSACARÍDEOS ECW E FS2.....	119
4.2.2.1. OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS OLIGISSACARÍDEOS DE F2S2.....	126
4.2.2.2. ESTUDO CINÉTICO DA REAÇÃO DE CICLIZAÇÃO NOS OLIGOSSACARÍDEOS F-C E F-D.....	136
5.0. CONCLUSÕES.....	141
6.0. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	143

ANEXOS..... 158

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - ESTRUTURA IDEAL REPETITIVA APRESENTADA PELAS CARRAGENANAS.....	8
FIGURA 2 - ESTRUTURA IDEAL REPETITIVA APRESENTADA PELAS AGARANAS.....	11
FIGURA 3 - ESTRUTURA QUÍMICA DA PORFIRANA.....	13
FIGURA 4 - ESTRUTURA DAS XILANAS ESTRUTURAIIS (A E B) E SOLÚVEIS (C) ISOLADAS DE ALGAS VERMELHAS.....	15
FIGURA 5 - ESTRUTURA DAS MANANAS, XILOMANANAS E GALACTOXILOMANANAS ISOLADAS DE ALGAS VERMELHAS.....	17
FIGURA 6 - REAÇÃO DE CICLIZAÇÃO EM AGARANAS (A) E CARRAGENANAS (B).....	18
FIGURA 7 - INTERAÇÃO ENTRE O GRUPO SULFATO EM C-2 DA β -D-GALACTOSE COM A HIDROXILA LIVRE EM C-3 DA α -L-GALACTOSE EM LAMBDA-CARRAGENANA (CIANCIA ET AL., 1993).....	20
FIGURA 8 - INTERAÇÃO ENTRE O GRUPO SULFATO EM C-4 DA β -D-GALACTOSE COM OS GRUPOS SULFATO EM C-2 (A) E C-6 (B) DA α -L-GALACTOSE EM MU/NU-CARRAGENANAS (NOSEDA; CEREZO, 1994).....	21
FIGURA 9 - PRODUTOS DE HIDRÓLISE REDUTIVA PARCIAL OBTIDOS A PARTIR DA AGAROSE (A) E DA KAPPA-CARRAGENANA (B) CONTENDO 3,6-ANIDROGALACTOSE (USOV, 1998).....	26
FIGURA 10 - ALGAS VERMELHAS <i>G. marginata</i> (A), <i>G. obtusata</i> (B), <i>T. cylindrica</i> (C), <i>T. fragilis</i> (D), <i>S. halliae</i> (E), <i>P. palmata</i> (F), <i>E. denticulatum</i> (G) E <i>F. lumbricalis</i> (H).....	30
FIGURA 11 - FLUXOGRAMA DE EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS DAS ALGAS <i>Galaxaura marginata</i> , <i>G. obtusata</i> , <i>Tricleocarpa cylindrica</i> , <i>T. fragilis</i> , <i>Scinaia halliae</i> E <i>Palmaria palmata</i>	44
FIGURA 12 - TEOR DE CINZAS DE FRAGMENTOS DA ALGA E DO RESÍDUO FINAL APÓS EXTRAÇÃO AQUOSA DA ALGA <i>Tricleocarpa fragilis</i>	46

FIGURA 13 - ESPECTROS DE RMN DE C¹³ DAS XILANAS CONSTITUINTES DAS FRAÇÕES SOLÚVEIS GMs (A), GOs (B), TCs (C), TFs (D), SHs (E) e PPs (F).....	51
FIGURA 14 – PADRÃO DE SUBSTITUIÇÃO DA XILANA GMs (A) E SEU ESPECTRO DE RMN DE C¹³ (B).	52
FIGURA 15 - ESPECTROS DE RMN DE H¹ DAS XILANAS CONSTITUINTES DAS FRAÇÕES SOLÚVEIS GMs (A), GOs (B), TCs (C), TFs (D), SHs (E) E PPs (F).....	55
FIGURA 16 – PADRÃO DE SUBSTITUIÇÃO DA XILANA GMs (A) E SEU ESPECTRO DE RMN DE H¹ (B).....	56
FIGURA 17 - ESPECTRO DE CORRELAÇÃO HMQC (C¹³/H¹) DA FRAÇÃO GOs.....	58
FIGURA 18 - ESPECTROS DE FT-IR DAS FRAÇÕES TFS E GOS ANTES (A) E APÓS METILAÇÃO (B).....	61
FIGURA 19 – UNIDADES PARCIALMENTE METILADAS OBTIDAS A PARTIR DAS XILANAS CONSTITUINTES DAS FRAÇÕES SOLÚVEIS.....	63
FIGURA 20 – CROMATOGRAMA DE HPSEC-MALLS DAS FRAÇÕES GMP (A) E TFP (B).....	67
FIGURA 21 – ESPECTROS DE RMN DE C^{13*} DAS XILOMANANAS CONSTITUINTES DAS FRAÇÕES GMp (A) e TFp (B).....	68
FIGURA 22 – CROMATOGRAMA DE HPSEC-MALLS DAS FRAÇÕES GMp-B (A), TFp-B (B) E TFp-C (C).....	72
FIGURA 23 - ESPECTROS DE RMN DE C¹³ DAS XILOMANANAS CONSTITUINTES DAS SUB-FRAÇÕES GMp-B (A), TFp-B (B) E TFp-C (C).....	74
FIGURA 24 - ESPECTROS DE RMN DE C¹³ DAS FRAÇÕES GMp-B (A), GMp-Bds (B), TFp-C (C) E TFp-Cds (D).....	78
FIGURA 25 - ESPECTROS DE RMN DE C¹³ DAS FRAÇÕES TFp-B (A) E TFp-BDS (B).....	79
FIGURA 26 - UNIDADES MONOSSACARÍDICAS PRESENTES NAS	

XILOMANANAS DAS FRAÇÕES GMp-B, TFp-B E TFp-C, NATIVAS E DESSULFATADAS E SEUS DERIVADOS PARCIALMENTE METILADOS.....	84
FIGURA 27 - ESPECTROS DE RMN DE C ^{13*} DAS XILOMANANAS CORRESPONDENTES AS FRAÇÕES TFp (A), TFp-S (B) E TFp-Sds (C).....	88
FIGURA 28 - ESPECTROS DE CORRELAÇÃO HMQC* DA FRAÇÃO TFp-Sds.....	89
FIGURA 29 - ESTRUTURA APRESENTADA PELA MANANA CONSTITUINTE DA FRAÇÃO TFp-S (A) E DA XILOMANANA CONSTITUINTE DAS FRAÇÕES GMp E TFp (B).....	92
FIGURA 30 - FLUXOGRAMA DE EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS DAS ALGAS <i>Eucheuma denticulatum</i> E <i>Furcellaria lumbricalis</i>	95
FIGURA 31 – ESTRUTURA QUÍMICA (A) E ESPECTROS DE RMN* DE H ¹ (B) E C ¹³ (C) DA CARRAGENANA CONSTITUINTE DA FRAÇÃO ECW.....	98
FIGURA 32 - ESTRUTURA QUÍMICA (A) E ESPECTROS DE RMN* DE H ¹ (B) E C ¹³ (C) DA CARRAGENANA CONSTITUINTE DA FRAÇÃO ECWTA.....	101
FIGURA 33 - PERFIL CROMATOGRÁFICO APRESENTADO PELAS FRAÇÕES ECW (A) E ECWTA (B) MEDIANTE ANÁLISE POR HPSEC-MALLS.....	102
FIGURA 34 – UNIDADES MONOSSACARÍDICAS PARCIALMENTE METILADAS OBTIDAS A PARTIR DAS FRAÇÕES ECW (NU/IOTA-CARRAGENANA) E ECWTA (IOTA-CARRAGENANA).....	105
FIGURA 35 - UNIDADES MONOSSACARÍDICAS NÃO USUAIS PRESENTES NOS POLISSACARÍDEOS DAS FRAÇÕES ECW (NU/IOTA-CARRAGENANA) E ECWTA (IOTA-CARRAGENANA).....	106
FIGURA 36 - ESPECTRO DE FT-IR DAS FRAÇÕES ECW E ECWTA.....	107
FIGURA 37 - ESPECTROS DE RMN DE C ^{13*} OBTIDOS A PARTIR DAS CARRAGENANAS CONSTITUINTE DAS FRAÇÕES F1 (1) E F2 (2).....	110
FIGURA 38 – CROMATOGRAMA DE HPSEC-MALLS APRESENTADO PELAS FRAÇÕES FS2 (A) E F2S2 (B).....	112

FIGURA 39 - ESPECTROS DE RMN DE C ^{13*} OBTIDOS A PARTIR DAS FRAÇÕES FS2 (1) E F2S2 (2).....	114
FIGURA 40 - ESTRUTURA APRESENTADA PELA MU/KAPPA- (A) E BETA/GAMMA-CARRAGENANA (B).....	115
FIGURA 41 - ESPECTROS DE RMN DE C ^{13*} OBTIDOS A PARTIR DAS FRAÇÕES FS2 (1) E FS2TA (2).	117
FIGURA 42 – TRATAMENTO ALCALINO DAS FRAÇÕES ESTUDADAS ECW (A) E FS2 (B).....	120
FIGURA 43 – DETERMINAÇÃO DA VELOCIDADE DA REAÇÃO DE CICLIZAÇÃO PARA A NU-CARRAGENANA (ECW) A DIFERENTES TEMPERATURAS.....	121
FIGURA 44 - DETERMINAÇÃO DA VELOCIDADE DA REAÇÃO DE CICLIZAÇÃO PARA A MU/GAMMA-CARRAGENANA (FS2) A DIFERENTES TEMPERATURAS.....	122
FIGURA 45 - ESPECTROS DE RMN DE C ¹³ DA FRAÇÃO F2S2HP.....	129
FIGURA 46 - ESPECTRO DE RMN DE C ¹³ DA FRAÇÃO FA.....	130
FIGURA 47 – ESPECTROS DE RMN DE C ¹³ DAS SUB-FRAÇÕES FB, FC, FD E F-E.....	133
FIGURA 48 – ESPECTROS DE RMN DE C ¹³ DAS SUB-FRAÇÕES FC-TA, FD-TA E FE-TA.....	135
FIGURA 49 – INTEGRAÇÃO DOS CARBONOS ANOMÉRICOS DAS UNIDADES DE 3,6-ANIDRO- α -D-GALACTOPIRANOSE PERTENCENTES A KAPPA- E A BETA-CARRAGENANA EM FC-TA (A), FD-TA (B) E FE-TA (C).....	136
FIGURA 50 – TRATAMENTO ALCALINO NAS CARRAGENANAS DAS FRAÇÕES FC E FD, SOB DIFERENTES TEMPERATURAS.....	137
FIGURA 51 - DETERMINAÇÃO DA VELOCIDADE DA REAÇÃO DE CICLIZAÇÃO NAS CARRAGENANAS DAS FRAÇÕES FS2, FC E FD A 70 °C.....	139

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – CLASSIFICAÇÃO DAS CARRAGENANAS DE ACORDO COM A DISTRIBUIÇÃO DOS GRUPOS SULFATO NA UNIDADE A (MODIFICADA DE KNUITSEN ET AL., 1994).....	10
TABELA 2 – CARACTERÍSTICAS DAS FRAÇÕES NEUTRAS (S) E SULFATADAS (P) OBTIDAS APÓS TRATAMENTO COM CETAVLON.....	45
TABELA 3 – COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES NEUTRAS (S) E SULFATADAS (P) OBTIDAS MEDIANTE TRATAMENTO COM CETAVLON.....	45
TABELA 4 – ASSINALAMENTOS QUÍMICOS ATRIBUÍDOS AOS CARBONOS DAS UNIDADES DE β -D-XILOPIRANOSE CONSTITUINTES DAS XILANAS MISTAS (FRAÇÕES SOLÚVEIS).....	53
TABELA 5 – ASSINALAMENTOS QUÍMICOS ATRIBUÍDOS AOS PRÓTONS DAS UNIDADES DE β -D-XILOPIRANOSE CONSTITUINTES DAS XILANAS MISTAS (FRAÇÕES SOLÚVEIS).....	59
TABELA 6 - ANÁLISE DE METILAÇÃO, RAZÃO ENTRE AS LIGAÇÕES, GRAU DE POLIMERIZAÇÃO (DP) E MASSA MOLECULAR DETERMINADA PARA AS FRAÇÕES SOLÚVEIS.....	62
TABELA 7 - COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES GMp E TFp.....	66
TABELA 8 – ASSINALAMENTOS QUÍMICOS DE RMN DE C^{13*} DAS FRAÇÕES NATIVAS GMp E TFp.....	70
TABELA 9 - RENDIMENTO, TEOR DE GRUPOS SULFATO E PROTEÍNAS DAS SUB-FRAÇÕES OBTIDAS A PARTIR DE TFp E GMp MEDIANTE CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA EM DEAE-SEPHACEL.....	70
TABELA 10 - COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS SUB-FRAÇÕES OBTIDAS A PARTIR DE TFp E GMp MEDIANTE CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA EM DEAE-SEPHACEL.....	71
TABELA 11 - ASSINALAMENTOS QUÍMICOS DE RMN DE C^{13*} DAS	

FRAÇÕES SUB-FRAÇÕES GMp-B, TFp-B E TFp-C.....	75
TABELA 12 - CARACTERÍSTICAS DAS SUB-FRAÇÕES GMp-B, TFp-B E TFp-C ANTES E APÓS DESSULFATAÇÃO SOLVOLÍTICA.....	76
TABELA 13 - ASSINALAMENTOS QUÍMICOS DE RMN DE C ^{13*} DAS FRAÇÕES DESSULFATADAS GMp-Bds, TFp-Bds E TFp-Cds.....	80
TABELA 14 - ANÁLISE DE METILAÇÃO DAS FRAÇÕES GMp-B, TFp-B E TFp-C.....	81
TABELA 15 - RENDIMENTO, TEOR DE SULFATO E COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES OBTIDAS A PARTIR DE TFP MEDIANTE DEGRADAÇÃO CONTROLADA DE SMITH (TFp-S) E DESSULFATAÇÃO SOLVOLÍTICA (TFp-Sds).....	85
TABELA 16 - ASSINALAMENTOS QUÍMICOS DE RMN DE C ^{13*} DAS FRAÇÕES TFp, TFp-S E TFp-Sds.....	87
TABELA 17 - ANÁLISE DE METILAÇÃO DAS FRAÇÕES TFp-S E TFp-Sds.....	90
TABELA 18 - RENDIMENTO, ANÁLISES E COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES ECW, F1 E F2.....	95
TABELA 19 - ASSINALAMENTOS QUÍMICOS DE RMN DE C ¹³ DAS FRAÇÕES ECW (NU/IOTA-CARRAGENANA) E ECWTA (IOTA-CARRAGENANA).....	99
TABELA 20 - RENDIMENTO, ANÁLISES E COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES ECW E ECWTA.....	100
TABELA 21 - ANÁLISE DE METILAÇÃO DAS FRAÇÕES NATIVA ECW E MODIFICADA ECWTA.....	103
TABELA 22 - PICOS DE ABSORÇÃO OBSERVADOS NOS ESPECTROS DE FT-IR DAS FRAÇÕES ECW E ECWTA E SEUS GRUPOS FUNCIONAIS CORRESPONDENTES.....	108
TABELA 23 - RENDIMENTO, TEOR DE SULFATO E COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS SUB-FRAÇÕES OBTIDAS A PARTIR DE F1 E F2 MEDIANTE TRATAMENTO COM KCL.....	109
TABELA 24 - ASSINALAMENTOS QUÍMICOS DE RMN DE C ¹³ DAS FRAÇÕES NATIVAS F1 E F2 E SOLÚVEIS EM KCL 2M FS2 E F2S2.....	113

TABELA 25 - ASSINALAMENTOS QUÍMICOS DE RMN DE C ¹³ DA FRAÇÃO NATIVA FS2 E QUIMICAMENTE MODIFICADA FS2TA.....	118
TABELA 26 - VELOCIDADE DE REAÇÃO (k) E TEMPO DE MEIA VIDA (T _{1/2}) PARA AS CARRAGENANAS CONSTITUINTES DAS FRAÇÕES ECW E FS2 EM 1M DE NAOH, SOB DIFERENTES TEMPERATURAS, COMPARADAS COM OUTRAS GALACTANAS SULFATADAS, PREVIAMENTE ESTUDADAS.....	123
TABELA 27 - RENDIMENTO E COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS SUB-FRAÇÕES OBTIDAS A PARTIR DE F2S2.....	128
TABELA 28 - ASSINALAMENTOS QUÍMICOS DE RMN DE C ¹³ DAS SUB-FRAÇÕES OBTIDAS A PARTIR DE F2S2 POR CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA.....	128
TABELA 29 - ASSINALAMENTOS QUÍMICOS* DE RMN DE C ¹³ DAS UNIDADES DE α-D-GLUCOPIRANOSE (AMIDO DAS FLORÍDEAS) NA SUB-FRAÇÃO FA.....	130
TABELA 30 - ASSINALAMENTOS QUÍMICOS DE RMN DE C ¹³ DAS SUB-FRAÇÕES FC-TA, FD-TA E FE-TA.....	134
TABELA 31 - VELOCIDADE DE REAÇÃO (k) E TEMPO DE MEIA VIDA (T _{1/2}) PARA OS OLIGOSSACARÍDEOS CONSTITUINTES DAS FRAÇÕES FC E FD EM 1M DE NAOH, SOB DIFERENTES TEMPERATURAS, COMPARADOS A OUTRAS GALACTANAS SULFATADAS.....	140

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

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

^{13}C - carbono 13

^1H - próton

4-MMB – complexo 4-metil morfolina borano

A_∞ - absorvância a tempo infinito

A_0 - absorvância a tempo inicial (zero minuto)

A_t - absorvância a tempo t

BaCl₂ – cloreto de bário

cetavlon - cetyltrimethylammonium bromide

CLG – cromatografia líquido-gasosa

CG-EM – cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa

CHCl₃ – clorofórmio

D₂O – água deuterada

DEAE - dietilaminoetil

DMSO – dimetil sulfóxido

FT-IR – infravermelho – transformada de Fourier

H₂SO₄ – ácido sulfúrico

HCl – ácido clorídrico

HMQC - heteronuclear multiple quantum correlation spectroscopy

HPLC – cromatografia líquida de alta performance

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

Hz - hertz

ICH₃ – iodo metano

k - velocidade da reação

KBr – brometo de potássio

KCl – cloreto de potássio

MeOH – metanol

MHz – mega hertz
NaBD₄ – borohidreto de sódio deuterado
NaBH₄ – borohidreto de sódio
NaCl – cloreto de sódio
NaHCO₃ – bicarbonato de sódio
NaIO₄ – metaperiodato de sódio
NaNO₃ – nitrito de sódio
NaOH – hidróxido de sódio
p/v – peso/volume
ppm - partes por milhão
RMN – ressonância magnética nuclear
t_{1/2} - tempo de meia-vida
TFA – ácido trifluoracético
Vt – volume total

ECW - extrato polissacarídico obtido por extração aquosa da alga *E. denticulatum*
ECWTA – fração ECW após tratamento alcalino
F1 - extrato polissacarídico obtido a partir da primeira extração aquosa da alga *F. fastigiata*
F1TA - fração F1 após tratamento alcalino
F2 - extrato polissacarídico obtido a partir da segunda extração aquosa da alga *F. fastigiata*
F2S2 - fração solúvel em 2 M obtida a partir de F2 mediante tratamento com KCl
F2S2hp – fração obtida após hidrólise redutiva parcial de F2S2
F2TA - fração F2 após tratamento alcalino
F-A – fração oligossacarídica obtida após cromatografia em DEAE-Sephadex A-25 da fração F2S2hp (eluente: água)
F-B - fração oligossacarídica obtida após cromatografia em DEAE-Sephadex A-25 da fração F2S2hp (eluente: NaCl 0,1 M)
F-C - fração oligossacarídica obtida após cromatografia em DEAE-Sephadex A-25 da fração F2S2hp (eluente: NaCl 0,25 M)
F-D - fração oligossacarídica obtida após cromatografia em DEAE-Sephadex A-25 da fração F2S2hp (eluente: NaCl 0,5 M)

F-E - fração oligossacarídica obtida após cromatografia em DEAE-Sephadex A-25 da fração F2S2hp (eluente: NaCl 1,0 M)

FS2 – fração solúvel em 2 M obtida a partir de F1 mediante tratamento com KCl

FS2TA - fração FS2 após tratamento alcalino

GM - extrato polissacarídico obtido por extração aquosa da alga *G. marginata*

GMp - fração precipitada obtida a partir de GM mediante tratamento com cetavlon

GMp-B – fração eluída com NaCl 0,5 M mediante cromatografia em DEAE-Sephacel da fração GMp

GMp-Bds – fração obtida após dessulfatação de GMp-B

GMs - fração solúvel obtida a partir de GM mediante tratamento com cetavlon

GO - extrato polissacarídico obtido por extração aquosa da alga *G. obtusata*

GOp - fração precipitada obtida a partir de GO mediante tratamento com cetavlon

GOs - fração solúvel obtida a partir de GO mediante tratamento com cetavlon

PP - extrato polissacarídico obtido por extração aquosa da alga *P. palmata*

PPp - fração precipitada obtida a partir de PP mediante tratamento com cetavlon

PPs - fração solúvel obtida a partir de PP mediante tratamento com cetavlon

SH - extrato polissacarídico obtido por extração aquosa da alga *S. halliae*

SHp - fração precipitada obtida a partir de SH mediante tratamento com cetavlon

SHs - fração solúvel obtida a partir de SH mediante tratamento com cetavlon

TC - extrato polissacarídico obtido por extração aquosa da alga *T. cylindrica*

TCp - fração precipitada obtida a partir de TC mediante tratamento com cetavlon

TCs - fração solúvel obtida a partir de TC mediante tratamento com cetavlon

TF - extrato polissacarídico obtido por extração aquosa da alga *T. fragilis*

TFp - fração precipitada obtida a partir de TF mediante tratamento com cetavlon

TFp-B - fração eluída com NaCl 0,5 M mediante cromatografia em DEAE-Sephacel da fração TFp

TFp-Bds - fração obtida após dessulfatação de TFp-B

TFp-C - fração eluída com NaCl 1,0 M mediante cromatografia em DEAE-Sephacel da fração TFp

TFp-Cds - fração obtida após dessulfatação de TFp-C

TFp-S – fração obtida após degradação controlada de Smith a partir de TFp

TFp-Sds – fração obtida após dessulfatação de TFp-S

TFs - fração solúvel obtida a partir de TF mediante tratamento com cetavlon

RESUMO

O componente amorfo constituinte da parede celular da maior parte das algas vermelhas é freqüentemente composto por galactanas sulfatadas, porém xilanas, mananas sulfatadas e xilomananas sulfatadas também têm sido encontradas nas ordens Nemaliales e Palmariales. Neste trabalho estudou-se os polissacarídeos solúveis em água isolados das algas vermelhas *Galaxaura marginata*, *G. obtusata*, *Tricleocarpa cylindrica*, *T. fragilis*, *Scinaia halliae* (Nemaliales) e *Palmaria palmata* (Palmariales). Mediante extração aquosa a 80 °C, seguida por tratamento com Cetavlon e precipitação com etanol, foram obtidos dois grupos de polissacarídeos: um neutro (frações GMs, GOs, TCs, TFs, SHs e PPs) e outro sulfatado (frações Gmp, GOp, TCp, TFp, SHp e Ppp). Os polissacarídeos neutros apresentaram atividade óptica negativa e se mostraram ricos em unidades de xilose. Análises de RMN de ¹H, ¹³C e HMQC revelaram tratar-se de β-D-xilanas lineares glicosiladas em C-3 e C-4 na proporção de 1:5 (para Nemaliales) e 1:2 (para Palmariales), como verificado por análises de metilação e integração dos prótons anoméricos. Os polissacarídeos presentes nas frações sulfatadas apresentaram atividade óptica positiva e elevados teores de manose, xilose e 4-O-metil xilose. As xilomananas sulfatadas Gmp e TFp renderam após fracionamento as sub-frações homogêneas Gmp-B, TFp-B e TFp-C, cujas análises de metilação e RMN de ¹³C, de suas formas nativas e modificadas, evidenciaram como cadeia principal uma α-D-manana 3-glicosilada, sulfatada em C-2 e/ou C-4 e glicosilada em C-4. Estes resultados mostram que as algas vermelhas estudadas biossintetizam dois polímeros distintos como polissacarídeos solúveis. A reação de ciclização, formação de unidades de 3,6-anidrogactose a partir de unidades precursoras de galactose 6-sulfato ou 2,6-dissulfato, tem sido estudada em diferentes tipos de galactanas sulfatadas e neste trabalho nas carragenanas isoladas das algas *Eucheuma denticulatum* e *Furcellaria lumbricalis*, mediante extração aquosa a temperatura ambiente, contidas nas frações ECW, F1 e F2. Análises de metilação, FT-IR e RMN de ¹³C e ¹H revelaram que a galactana homogênea ECW era uma parcialmente ciclizada nu-carragenana. As galactanas homogêneas FS2 e F2S2, obtidas após purificação de F1 e F2, foram caracterizadas por metilação e RMN de ¹³C como uma mu/gamma-carragenana. A nu/iota-carragenana ECW, quando submetida a tratamento alcalino, apresentou uma velocidade de ciclização, a 60 e 70 °C, cerca de 7 e 13 vezes mais rápida do que a obtida para a mu/gamma-carragenana FS2. A fração F2S2, após hidrólise reductiva parcial, originou os oligossacarídeos FC (de elevado caráter gamma-) e FD (de elevado caráter mu-). Quando comparadas a 70 e 80 °C, a velocidade de reação em FC se mostrou cerca de 4,0 e 3,3 vezes mais lenta do que em FD. A velocidade em FD se mostrou 1,4 vezes superior a determinada para FS2 e 9,7 vezes inferior a determinada para ECW, a 70 °C, enquanto que FC, se mostrou 3,8 vezes mais lenta que FS2, sob a mesma temperatura. As diferenças observadas entre as velocidades nas diferentes frações relacionam-se ao padrão de sulfatação presente em cada galactana estudada. O fato da velocidade em FS2 ser intermediária as de FC e FD, sugere que o caráter híbrido do polissacarídeo lhe confere uma cinética dupla, onde cada padrão estrutural (mu- e gamma-carragenana) apresenta uma cinética própria que em conjunto, resulta noutra intermediária.

ABSTRACT

The cell-wall in the division Rhodophyta is frequently constituted by sulfated galactans, however neutral xylans, sulfated mannans and sulfated xylomannans have been extracted from red algae belonging to the order Nemaliales and Palmariales. Here were studied the water soluble polysaccharides from the seaweeds *Galaxaura marginata*, *G. obtusata*, *Tricleocarpa cylindrica*, *T. fragilis*, *Scinaia halliae* (Nemaliales) e *Palmaria palmata* (Palmariales). By extraction with water at 80 °C, followed by Cetavlon treatment and ethanol precipitation, were obtained two kinds of polysaccharides: one neutral (GMs, GOs, TCs, TFs, SHs and PPs fractions) and other sulfated (GMP, GOP, TCp, TFp, SHp and Pp fractions). The first ones polysaccharides showed negative optical rotation and xylose as majority residue. The ¹H, ¹³C and HMQC NMR analyses showed that these polysaccharides were a linear (1→3)- and (1→4)-linked β-D-xylan on the ratio 1:5 (to Nemaliales) and 1:2 (to Palmariales), as confirmed by methylation and integration analysis. The last ones polysaccharides showed positive optical rotation and mannose, xylose and 4-O-methyl xylose as majority residues. The homogeneous sulfated xylomannans GMP-B, TFp-B e TFp-C, obtained after GMs and TFs fractionation, had a 3-linked α-D-mannan as main chain, sulfated at C-2 and/or C-4 and xylosilated at C-4, as showed the ¹³C NMR and methylation analysis of its native and modified forms. These results shows that the studied red seaweeds produce two different polymers as soluble polysaccharides. The cyclization reaction, formation of the 3,6-anhydrogalactose units from precursor units (galactose 6 or 2,6 sulfated), has been studied in different seaweed polysaccharides and in these work in the carrageenans isolated from *Eucheuma denticulatum* and *Furcellaria lumbricalis* by extraction with water at room temperature, contained in the fractions ECW, F1 and F2. Methylation, FT-IR, ¹H and ¹³C-NMR analysis showed that the homogeneous galactan from ECW was a partially cyclized nu-carrageenan. The homogeneous galactans FS2 and F2S2, obtained after F1 and F2 purification, was characterized by methylation and ¹³C-NMR analysis as a mu/gamma-carrageenan. The nu/iota carrageenan ECW showed, at 60 and 70 °C, a rate constant 7 and 13 times faster than the mu/gamma-carrageenan FS2. The fraction F2S2 yielded, after reductive partial hydrolysis, the oligosaccharides FC (major gamma- character) and FD (major mu-character). When analyzed at 70 and 80 °C, the rate constant of FC was 4 and 3,3 times lower than FD. The rate constant of FD was 1,4 times faster than FS2 and 9,7 times lower than ECW, at 70 °C, while FC was 3,8 times lower than FS2, at the same temperature. The viewed differences between the rate constants were related to the sulfatation pattern of the each carrageenan. And the fact of rate constant in FS2 to be between FC e FD, suggest that the hybrid character of these polysaccharide produce a double kinetic, where each structural pattern (mu- and gamma-carrageenan) show a own kinetic, that in joint result in a intermediary other one.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. ALGAS: ASPECTOS GERAIS

As algas compreendem um grupo muito diverso de organismos, fotossintetizadores, não vasculares, dotados de estruturas reprodutivas desprotegidas (Cryptogâmia), produtoras de esporos e desprovidas de sementes e flores (SOUTH; WHITTICK, 1987).

São denominadas de talófitas, ou plantas inferiores, por não apresentarem uma estrutura vegetal diferenciada em raiz, caule e folhas (VAN DEN HOEK et al., 1989).

Este grupo inclui desde organismos procarióticos à eucarióticos e unicelulares à pluricelulares (agregados, filamentos ou talos parenquimatosos), apresentando assim uma variação morfológica extremamente diversa (VAN DEN HOEK et al., 1989). Tanta diversidade também é observada nas formas de reprodução adotadas, processos vegetativos, assexuais e sexuais estão envolvidos e em muitas formas pode ocorrer alternância de gerações, ao ponto da reprodução sexual na divisão Rhodophyta ser considerada como a mais complexa do reino vegetal (SOUTH; WHITTICK, 1987).

Bioquímica e fisiologicamente as algas são similares em muitos aspectos às outras plantas, possuindo as mesmas vias bioquímicas básicas, possuem clorofila *a* como principal pigmento fotossintético e carotenóides (β -caroteno e fucoxantina), ficocianina e ficoeritrina como pigmentos acessórios (SOUTH; WHITTICK, 1987). Ainda seus polissacarídeos e proteínas biossintetizados são comparáveis àqueles das plantas superiores (SOUTH; WHITTICK, 1987).

As algas ocorrem em praticamente todas as condições ambientais na Terra, porém se mostram mais abundantes nos ambientes aquáticos, onde representam os maiores produtores de compostos orgânicos e desempenham papel central na base da cadeia alimentar e liberam o oxigênio necessário para o metabolismo dos consumidores (LEE, 1989).

Algumas algas são utilizadas como fonte de alimento humano ou de extratos químicos que são amplamente utilizados na manufatura de alimentos e muitos

outros produtos (SOUTH; WHITTICK, 1987). Apesar de seus carboidratos não serem digeridos pelo homem, as algas representam excelentes fontes de vitaminas C (equivalente aos frutos cítricos), A, D, B₁, B₁₂ e E e ainda fornecem aminoácidos livres, carotenóides e diversos elementos traços requeridos para a nutrição humana (SOUTH; WHITTICK, 1987; GRAHAM; WILCOX, 2000).

1.2. CLASSIFICAÇÃO DAS ALGAS

As algas constituem um grupo polifilético de organismos que apresentam um histórico evolutivo muito diverso, englobando representantes de diferentes reinos como Eubacteria, Protista e Plantae (LOBBAN; HARRISON, 1994; GRAHAM; WILCOX, 2000).

Atualmente são reconhecidas nove divisões de algas: Cyanobacteria, Glaucophyta, Euglenophyta, Cryptophyta, Haptophyta, Dinophyta (dinoflagelados), Ochrophyta (englobando as diatomáceas, algas pardas e outras), Rhodophyta (algas vermelhas) e Chlorophyta (algas verdes), as quais são classificadas utilizando-se critérios como estrutura celular, bioquímica, biologia molecular, pigmentos fotossintéticos, natureza química dos produtos de reserva e composição da parede celular, morfologia e ciclo de vida (GRAHAM; WILCOX, 2000).

1.2.1. A DIVISÃO RHODOPHYTA

A divisão Rhodophyta provavelmente representa um dos mais antigos grupos de algas eucarióticas, possui apenas uma única classe, a Rhodophyceae, que se divide em duas sub-classes: Bangioideae e Florideae. Englobam cerca de 5500 espécies, distribuídas em aproximadamente 600 gêneros, destes, 20 compreendem representantes de água doce e 10 contêm plantas unicelulares. Os demais gêneros contêm unicamente organismos pluricelulares de ambiente marinho (LEE, 1989; VAN DEN HOEK et al., 1989).

A maioria das algas marinhas é vermelha e existem mais rodofitas do que todos os outros maiores grupos de algas marinhas combinados, mesmo assim se trata de uma divisão pequena, uma vez que, Compositae, por exemplo, uma mera

família de dicotiledôneas, contém cerca de 900 gêneros e 20.000 espécies (RAVEN et al., 1996; VAN DEN HOEK et al., 1989, COLE; SHEATH, 1990).

As algas vivem presas a rochas, substratos calcários, paredes oceânicas ou ainda sobre conchas de moluscos ou sobre outras algas (RAVEN et al., 1996; VAN DEN HOEK et al., 1989). São mais abundantemente encontradas em regiões quentes próximas ao equador onde apresentam tamanho reduzido, porém podem ser encontradas também em regiões de águas frias, atingindo nestas localidades maiores proporções (VAN DEN HOEK et al., 1989; LEE, 1989). Poucas espécies de algas vermelhas são encontradas em regiões polares e sub-polares, onde as algas pardas e verdes são mais abundantes (VAN DEN HOEK et al., 1989; LEE, 1989).

Apesar de apresentarem com freqüência coloração avermelhada, devido a presença do pigmento fotossintético acessório ficoeritrina no interior dos cloroplastos, também podem apresentar coloração violeta, marrom, preta ou azul, variações atribuídas a presença dos pigmentos ficocianina e aloficocianina (VAN DEN HOEK et al., 1989; SOTH; WHITTICK, 1987). Caso cresçam em regiões com incidência direta de luz podem ainda apresentar coloração amarelo-marrom ou até mesmo verde, pois a clorofila *a* e os carotenóides (α -caroteno, β -caroteno, luteína e zeaxantina) mascaram as ficobiliproteínas (nome atribuído aos pigmentos acessórios ficocianina e aloficocianina quando associados a proteínas). Quando morrem, tendem a tornarem-se verdes, pois as ficobiliproteínas, ao contrário da clorofila, são solúveis em água (VAN DEN HOEK et al., , 1989).

Algumas ordens de algas vermelhas apresentam ainda calcificação da parede celular, processo este, relacionado com as vias de fixação do carbono, onde íons carbonato (CO_3^{2-}) se combinam com íons cálcio (Ca^{2+}) resultando no depósito de carbonato de cálcio (CaCO_3) nos espaços intercelulares na forma de calcita, como em Corallinales, ou aragonita, como em algumas espécies de Nemaliales (SOTH; WHITTICK, 1987; COLE; SHEATH, 1990; GRAHAM; WILCOX, 2000).

Uma estrutura celular especializada, denominada de conexões pit ("pit plugs"), cuja função parece relacionar-se com o transporte intercelular, é uma das características exclusivas desta divisão e se mostra ausente apenas em poucas ordens de Bangioideae (SOTH; WHITTICK, 1987).

A maioria das algas vermelhas apresenta uma estrutura filamentosa, que cresce a partir de uma única célula apical se dividindo seqüencialmente em

segmentos originando um eixo, que por sua vez, forma verticilos de ramos laterais. Poucos gêneros, como *Porphyra*, possuem células justapostas formando lâminas de apenas uma ou duas camadas (RAVEN et al., 1996).

As algas vermelhas têm importante papel econômico em países como Japão, China e Filipinas, entre outros, onde muitas espécies de algas vermelhas como *Porphyra*, *Euचेuma* e *Gracilaria* são coletadas diretamente de fontes naturais ou de áreas de cultivo para uso alimentar ou extração de seus ficocolóides (RAVEN et al., 1996; VAN DEN HOEK et al., 1989; GRAHAM; WILCOX, 2000).

Ficocolóide é o nome genérico dado aos polissacarídeos solúveis extraídos de algas, sendo as carragenanas e as agaranas os principais obtidos a partir de rodofitas. Apresentam elevado interesse comercial devido a suas propriedades geleificantes e viscosantes, sendo assim amplamente utilizados em diversas áreas da indústria, principalmente alimentícia, têxtil, petroquímica e farmacêutica (DE RUITER, RUDOLPH, 1997; USOV, 1998).

Outros ficocolóides não apresentam propriedades geleificantes ou viscosantes, mas se mostram muito promissores na área biomédica, atuando como compostos biologicamente ativos, já sendo descrito para estes polímeros propriedades antiviral, antiangiogênica e anticoagulante (CARLUCCI et al., 1997).

1.3. A PAREDE CELULAR

A parede celular das algas eucarióticas é composta por dois componentes principais, um denominado fibrilar, o qual forma o esqueleto da parede e outro denominado amorfo, o qual forma uma matriz na qual o fibrilar se encontra embebido (KLOAREG; QUATRANO, 1988).

O componente fibrilar representa cerca de 9% da parede celular, conferindo rigidez e é comumente formado por fibras de celulose (COLE; SHEATH, 1990). Em Rhodophyta, porém, este componente pode apresentar uma composição química diferenciada, podendo ser composto por unidades de D-xilose ou D-manose (COLE; SHEATH, 1990). Em Bangiophycidae, os gêneros *Porphyra* e *Bangia*, na fase macroscópica ou gametofítica, apresentam o componente fibrilar formado por uma trama de $\beta(1\rightarrow3)$ -xilanas ou $\beta(1\rightarrow3)$ -mananas, estando a celulose, nestes dois

gêneros, restrita unicamente a fase microscópica ou conchoceles (KLOAREG; QUATRANO, 1988; GRETZ et al., 1980; BALDAN et al., 1995).

O componente amorfo é sintetizado no complexo de Golgi, pode compreender até 70% do peso seco da parede celular, possuir composição química variada e conferir flexibilidade e resistência à estrutura vegetal (KLOAREG; QUATRANO, 1988; RAVEN et al., 1996; VAN DEN HOEK et al., 1989; SOTH; WHITTICK, 1987; LEE, 1989; McCANDLESS; CRAIGIE, 1979).

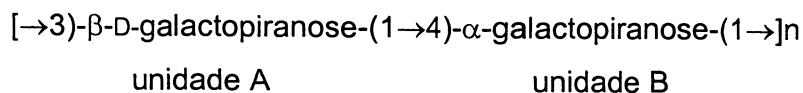
Na divisão Rhodophyta, o componente amorfo é mais freqüentemente composto por unidades de D-xilose, D-manose, D- e L-galactose (COLE; SHEATH, 1990; USOV, 1984). O mais comum e abundante polímero encontrado nesta divisão é a galactana sulfatada (agaranas e carragenanas – USOV, 1980, 1984, 1998), porém mananas, xilomananas e galactoxilomananas, também sulfatadas, têm sido observadas em representantes das ordens Nemaliales (COLE; SHEATH, 1990; USOV, 1984; KOLENDER et al., 1997), bem como frações solúveis de xilanas lineares em representantes da ordem Palmariales (COLE; SHEATH, 1990; USOV, 1984, LAHAYE, et al., 2003). É possível encontrar um ou mais destes polissacarídeos sendo sintetizados por uma mesma espécie de alga vermelha. Por exemplo, frações de xilanas solúveis, mananas sulfatadas, xilomananas e xilogalactanas sulfatadas já foram obtidas a partir de *Nothogenia fastigiata*, pertencente a ordem Nemaliales e anteriormente denominada de *Chaetangium fastigiatum* (MATULEWICZ; CEREZO, 1987^{1,2}; MATULEWICZ et al., 1994; HAINES et al., 1990).

Uma descrição mais detalhada destes diferentes polissacarídeos será dada nos itens que se seguem.

1.4. AS GALACTANAS SULFATADAS

Na maior parte dos gêneros pertencentes à divisão Rhodophyta, o componente amorfo da parede celular é um polissacarídeo de alta massa molecular, rico em galactose denominado de galactana sulfatada. Este polímero apresenta como característica única, uma estrutura linear formada por unidades de β -D-galactopiranosose substituídas glicosidicamente no carbono 3 (unidade A) e de α -

galactopirranose substituídas no carbono 4 (unidade B), mostrando um arranjo dissacarídico alternante repetitivo:



Enquanto a unidade A sempre se apresenta na configuração enantiomérica D, a unidade B pode se apresentar sob ambas as configurações D- ou L-. Baseando-se na estereoquímica da unidade B estas galactanas podem ser classificadas como carragenana, quando esta unidade pertencer a série D-, ou agarana, quando pertencer a série L- (McCANDLESS; CRAIGIE, 1979; PAINTER, 1983; USOV, 1984, 1998; STORTZ; CERZO, 2000).

A unidade dissacarídica repetitiva apresentada por estas galactanas pode ainda apresentar variado padrão e grau de substituição por grupos éster sulfato, metil éter e acetal de ácido pirúvico, o que lhes confere uma ampla variabilidade estrutural. Diferentes padrões de glicosilação e a substituição da α -galactose por seu derivado ciclizado 3,6-anidrogactose também se somam aos fatores que aumentam a complexidade estrutural destes polissacarídeos (PAINTER, 1983; USOV, 1984, 1998; STORTZ; CERZO, 2000; ERREA; MATULEWICZ, 2003; CHIOVITTI et al., 2004).

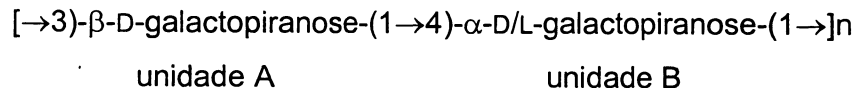
Classicamente considera-se que o mais abundante grupo substituínte encontrado nas carragenanas é o éster sulfato, grupos metil éter e acetal ácido pirúvico também podem ser encontrados, porém em baixos níveis (CHIOVITTI et al., 1997; STORTZ; CERZO, 2000; ERREA; MATULEWICZ, 2003). Em contrapartida, as agaranas podem apresentar elevados níveis de substituição por sulfato, metil, acetal de ácido pirúvico e glicosilação (PAINTER, 1983; ERREA; MATULEWICZ, 2003).

Porém relatos mais recentes mostram que nem sempre este padrão de substituição é verdadeiro, uma vez que carragenanas ricas em grupos acetal de ácido pirúvico (CHIOVITTI et al., 1997; FALSHAW et al., 2003) e em metil éter (CHIOVITTI et al., 2004) já foram isoladas e descritas na literatura.

A descoberta destes novos padrões de substituição em carragenanas foram atribuídos ao desenvolvimento e a sofisticação das técnicas de análise empregadas

na pesquisa da química de carboidratos (STORTZ; CEREZO, 2000; CHIOVITTI, et al., 2004). A estes mesmos fatores também se deve a identificação do terceiro grupo de galactanas sulfatadas, os D/L-híbridos, ou carrágar (STORTZ; CEREZO, 2000; CHOPIN et al., 1999).

Neste tipo estrutural, uma mesma molécula pode apresentar a unidade B tanto numa configuração D- como L-:



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

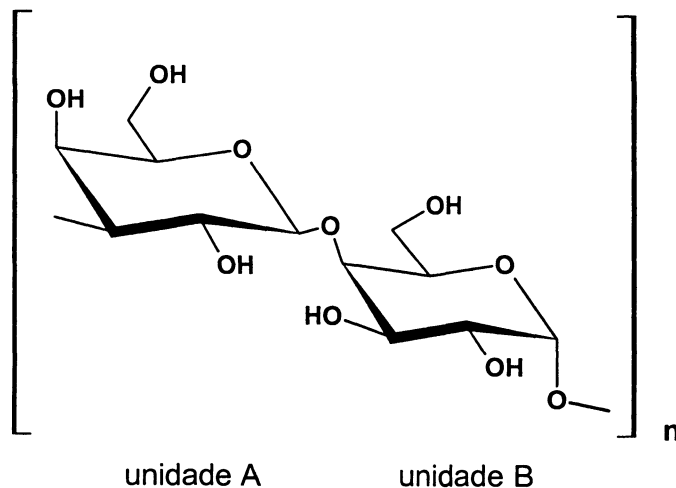
Nestes polímeros, as unidades monossacarídicas provavelmente estariam dispostas em blocos de agarana e blocos de carragenana, uma vez que nenhum oligossacarídeo D/L-híbrido foi encontrado (STORTZ; CEREZO, 2000).

A ordem Halymeniales é uma reconhecida produtora de híbridos D-/L- (KNUTSEN et al., 1994; ZIBETTI, 2001), porém algumas espécies pertencentes a outras ordens como Plocamiales (FALSHAW et al., 1999), Gigartinales (CIANCIA et al., 1993; ESTEZEZ et al., 2000, 2001; CHOPIN et al., 1999; FARIA, 2002), Rhodymeniales (TAKANO et al., 1994; MILLER et al., 1996) e Ceramiales (TAKANO et al., 1999 e 2003), também têm se mostrado produtoras deste tipo de polissacarídeo.

1.4.1. A CLASSIFICAÇÃO DAS CARRAGENANAS

Como já mencionado, as carragenanas apresentam uma estrutura dissacarídica básica repetitiva, dita ideal, formada por unidades de β -D-galactopiranos (unidade A) e α -D-galactopiranos (unidade B), como mostrado na FIGURA 1.

FIGURA 1 - ESTRUTURA IDEAL REPETITIVA APRESENTADA PELAS CARRAGENANAS.



A classificação das carragenanas é feita de acordo com o padrão de sulfatação e com a presença ou ausência do anel anidro na unidade B.

Baseando-se no padrão de sulfatação da unidade A, apresentado pelas diferentes estruturas de carragenanas descritas, as mesmas podem ser agrupadas em quatro famílias distintas: Kappa, Lambda, Beta e Omega, como estabelecido por MOLLION et al. (1986).

À família Kappa pertencem todas as carragenanas cuja unidade A se mostra 4-O-sulfatada (TABELA 1), podendo a unidade B ser 3,6-anidro- α -D-galactose (kappa-carragenana), 3,6-anidro- α -D-galactose 2-sulfato (iota-carragenana), α -D-galactose 6-sulfato (mu-carragenana) ou galactose 2,6-dissulfato (nu-carragenana).

À família Lambda pertencem todas aquelas cuja unidade A se mostra 2-O-sulfatada (TABELA 1) podendo a unidade B ser α -D-galactose 2,6-dissulfato (lambda-carragenana), α -D-galactose 2-sulfato (xi-carragenana) ou 3,6-anidro- α -D-galactose 2-sulfato (theta-carragenana), a pi-carragenana [\rightarrow 3)-4,6-O-(1-carboxietilideno)- β -D-galactose-2-sulfato-(1 \rightarrow 4)- α -D-galactose 2-sulfato-(1 \rightarrow)] também pertence a este grupo.

A família Beta caracteriza-se por englobar carragenanas desprovidas de grupo sulfato na unidade A (TABELA 1) sendo a B 3,6-anidro- α -D-galactose (beta-

carragenana), 3,6-anidro α -D-galactose 2-sulfato (alfa-carragenana), α -D-galactose 6-sulfato (gamma-carragenana) ou α -D-galactose 2,6-dissulfato (delta-carragenana).

Por último, a família Omega inclui aquelas carragenanas que possuem a unidade A sulfatada em carbono 6 (TABELA 1) e a unidade B também sulfatada neste mesmo carbono (α -D-galactose 6-sulfato), esta denominada psi-carragenana ou substituída por 3,6-anidro- α -D-galactose, denominada omega-carragenana.

Esta classificação porém, baseia-se em unidades dissacarídicas denominadas "ideais", as quais nem sempre representam a real estrutura observada para as carragenanas estudadas, que podem apresentar uma certa percentagem de unidades distintas das propostas no dissacarídeo ideal, unidades estas denominadas de "mascaradas".

As carragenanas são abundantemente extraídas a partir de algas pertencentes aos gêneros *Gigartina*, *Eucheuma* e *Hypnea*, entre outros, as quais recebem, por este motivo a denominação carragenófitas (LEE, 1989).

Carragenanas pertencentes a diferentes famílias podem ser extraídas a partir de uma mesma espécie de alga vermelha, dependendo da fase do ciclo de vida estudado. Por exemplo, na ordem Gigartinales, a fase tetraesporofítica é caracterizada por sintetizar λ -carragenana, enquanto que a gametofítica por sintetizar κ -carragenana, este fenômeno porém não é característico de todas as famílias desta ordem (NOSEDA, 1994).

TABELA 1 - CLASSIFICAÇÃO DAS CARRAGENANAS DE ACORDO COM A DISTRIBUIÇÃO DOS GRUPOS SULFATO NA UNIDADE A (MODIFICADA DE KNUTSEN ET AL., 1994).

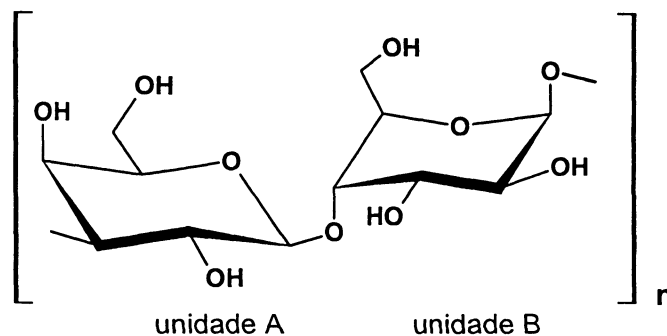
GRUPO	3-O-β-D-galactose UNIDADE A	4-O-α-D-galactose UNIDADE B
KAPPA		
κ (kappa) ¹	4-sulfato	3,6-anidrogalactose
ι (iota) ²	4-sulfato	3,6-anidrogalactose 2-sulfato
μ (mu) ³	4-sulfato	6-sulfato
ν (nu) ⁴	4-sulfato	2,6-dissulfato
LAMBDA		
λ (lambda) ⁵	2-sulfato	2,6-dissulfato
π (pi) ⁶	2-sulfato; 4,6-(1-carboxietilideno)	2-sulfato
ξ (xi) ⁷	2-sulfato	2-sulfato
θ (theta) ⁸	2-sulfato	3,6-anidrogalactose
BETA		
β (beta) ⁹	-	3,6-anidrogalactose
α (alfa) ¹⁰	-	3,6-anidrogalactose 2-sulfato
γ (gamma) ⁹	-	6-sulfato
δ (delta) ¹⁰	-	2,6-dissulfato
OMEGA		
ω (omega) ¹¹	6-sulfato	3,6-anidrogalactose
ψ (psi) ¹²	6-sulfato	6-sulfato

estruturas primeiramente denominadas por: ¹ O'NEILL, 1955; ² ANDERSON et al., 1973; ³ ANDERSON et al., 1968; ⁴ STANCIOFF; STANLEY, 1969; ⁵ DOLAN; RESS, 1965; ⁶ DININNO et al., 1979; ⁷ PENNAN; REES, 1973; ⁸ ANONYMOUS, 1977; ⁹ GREER; YAPHE, 1984; ¹⁰ ZABLACKIS; SANTOS, 1986; ¹¹ MOLLION et al., 1986; ¹² CRAIGIE 1990.

1.4.2. A CLASSIFICAÇÃO DAS AGARANAS

As agaranas apresentam uma estrutura dissacarídica básica repetitiva de unidades de β -D-galactopirranose (unidade A) e α -L-galactopirranose (unidade B), como mostrado na FIGURA 2.

FIGURA 2 - ESTRUTURA IDEAL REPETITIVA APRESENTADA PELAS AGARANAS.



A última classificação para agaranas publicada na literatura foi feita por DUCKWORTH e YAPHE (1971), baseando-se nas 3 estruturas obtidas, obtidas por eles, a partir do fracionamento de uma amostra bruta de ágar:

- agarose neutra, constituída por unidades alternantes de (1→3) β -D-galactose (unidade A) e (1→4) 3,6-anidro- α -L-galactose (unidade B);
- agarpectina, que contém, em adição aos resíduos presentes na agarose, grupos acetal de ácido pirúvico e éster sulfato, distinguindo-se dois tipos:
 - agarana piruvatada, altamente piruvatada e rica em unidades de 3,6-anidrogactose;
 - galactana sulfatada, altamente sulfatada e pobre em unidades de 3,6-anidrogactose.

Porém esta classificação não reflete a complexidade estrutural encontrada pelas galactanas relatadas na literatura.

Desta maneira, talvez seja mais conveniente classificar estes polissacarídeos como: agarose, agares e agaroides, terminologias dependentes do padrão de

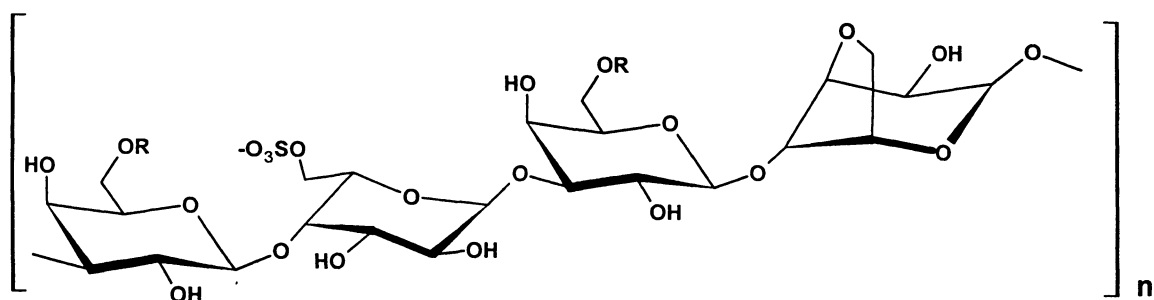
substituição apresentado e da força do gel formado pelo polissacarídeo (MILLER, 1997).

Assim a agarose mantém a definição mencionada acima e gera, quando em solução aquosa um gel de força elevada. Como agares, se consideram aqueles polímeros que possuem baixa substituição por éster sulfato ou acetal de ácido pirúvico, teores elevados de metil éter e presença de 3,6-anidrogactose, como consequência destas substituições, o gel formado possui força reduzida. Já como agaróides, se considera aqueles polímeros de maior complexidade estrutural, que podem apresentar substituição simultânea por grupos éster sulfato, acetal de ácido pirúvico e metil éter, ainda glicosilação, presença do açúcar 3,6-anidrogactose e que não formam géis, ou caso formem, estes são fracos (MILLER, 1997).

Agaranas são abundantemente obtidas a partir de espécies pertencentes aos gêneros *Porphyra*, *Gelidium*, *Pterocladia* e *Gracilaria*, entre outros, as quais recebem, por este motivo a denominação agarófitas (LEE, 1989).

As agaranas biossintetizadas por algas pertencentes aos gêneros *Porphyra* e *Bangia* são genericamente denominadas de Porfiranas (ANDERSON; REES, 1965; ASPINALL, 1970). Estruturalmente, estes polissacarídeos se assemelham a agarose, porém se mostram pouco mais complexos, como mostrado na FIGURA 3, devido à ocorrência natural de radicais metil, eterificando o carbono 6 de algumas unidades de β -D-galactose e de grupos sulfato, também esterificando o carbono 6 de unidades de α -L-galactose em substituição à algumas unidades de 3,6-anidro- α -L-galactose (BRASCH, et al., 1981; VILLARROEL; ZANLUNGO, 1981; NOSEDA et al., 2000). A partir da alga *Porphyra columbina*. Porém foi isolada uma porfirana dotada de uma estrutura não usual, onde algumas unidades de β -D-galactose apresentaram glicosilação por unidades de 6-O-metil β -D-galactose 4-sulfato, localizadas como terminais não redutores (VIANA, 2001).

FIGURA 3 - ESTRUTURA QUÍMICA DA PORFIRANA.



R= H ou CH₃

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

As xilogalactanas se caracterizaram por apresentarem uma estrutura central baseada nas agaranas, porém com um complexo padrão de substituição (FURNEAUX; STEVENSON, 1990; MATULEWICZ et al., 1994; USOV et al., 1997). Nestes polímeros as unidades de D-galactose podem estar totalmente ou parcialmente metiladas em carbono 6, sulfatados em carbono 2, 4 e/ou 6 e glicosiladas em carbono 4 ou 6 por unidades de β -D-xilose, α -L-galactose ou 4-O-metil- α -L-galactose, enquanto que as unidades de L-galactose, por sua vez, podem estar presentes como 3,6-anidrogalactose, ou como seu precursor α -galactose 6-sulfato, o qual pode estar parcialmente metilado em carbono 2 e/ou substituídas em carbono 3 (FURNEAUX; STEVENSON, 1990; MATULEWICZ et al., 1994; USOV et al., 1997).

1.5. XILANAS

Como já mencionado anteriormente, dois tipos distintos de xilanas tem sido descritos em algas vermelhas: as estruturais, constituintes do componente fibrilar da parede celular e as solúveis, constituintes do componente amorfo (USOV, 1984; KLOAREG; QUATRANO, 1988; COLE; SHEATH, 1990).

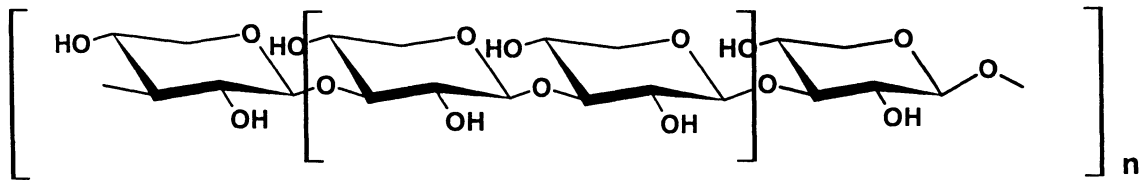
As xilanas isoladas de algas vermelhas apresentam uma estrutura linear, neutra e constituída unicamente por unidades de β -D-xilose (CEREZO, 1972; NUNN et al., 1973; USOV, 1984; MATULEWICZ; CEREZO, 1987¹; JEREZ et al., 1997).

As xilanas estruturais são insolúveis e apresentam uma cadeia polissacarídica inteiramente formada por ligações β -(1 \rightarrow 3) ou β -(1 \rightarrow 4) (MILLER, 1997), como mostrado nas FIGURAS 4A e 4B, respectivamente, tendo sido isoladas a partir de gêneros como *Porphyra* (MUKAI et al., 1981; BALDAN et al., 1995) e *Palmaria* (TURVEY e WILLIAMS, 1970), respectivamente.

As xilanas solúveis, por sua vez, apresentam ambos os tipos de ligações (FIGURA 4C), em diferentes proporções, geralmente na relação 1 (1 \rightarrow 3) : 4 (1 \rightarrow 4), tendo sido isoladas a partir dos gêneros *Palmaria* (KOVAC et al., 1980; TURVEY e WILLIAMS, 1970; LAHAYE et al., 1993; LAHAYE et al., 2003; JEREZ et al., 1997), *Nemalion* (USOV ET AL., 1973 ; KOVAC et al., 1980), *Nothogenia* (CEREZO et al., 1971; CEREZO, 1972; MATULEWICZ et al., 1992; NUNN et al., 1973) e *Galaxaura* (USOV et al., 1981).

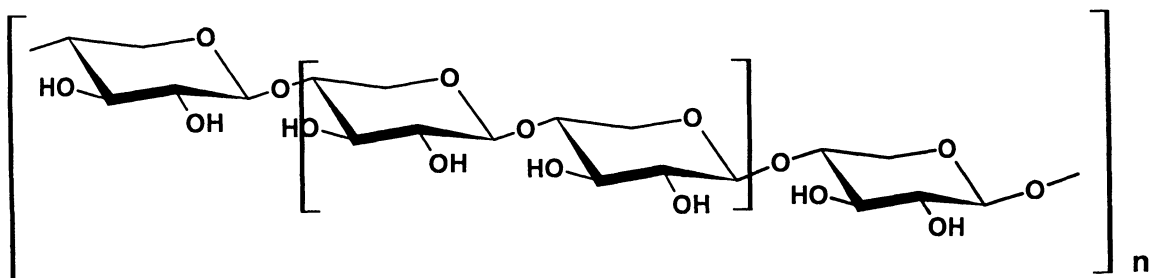
FIGURA 4 - ESTRUTURA DAS XILANAS ESTRUTURAIS (A E B) E SOLÚVEIS (C) ISOLADAS DE ALGAS VERMELHAS.

A)



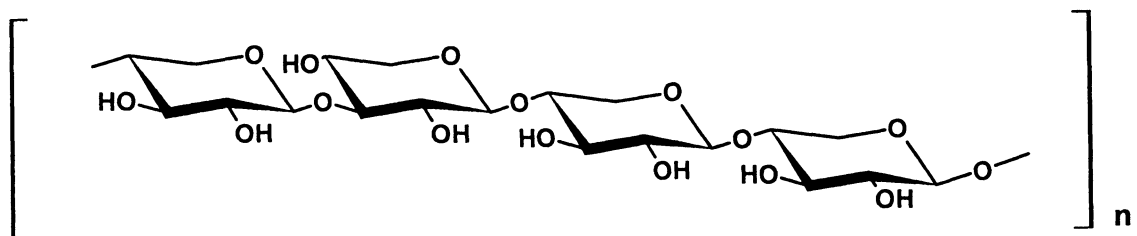
xilana β -(1 \rightarrow 3)

B)



xilana β -(1 \rightarrow 4)

C)



xilana β -(1 \rightarrow 3),-(1 \rightarrow 4)

1.6. MANANAS E XILOMANANAS

As mananas solúveis (FIGURA 5) isoladas de algas vermelhas caracterizam-se por apresentarem uma estrutura formada por unidades de α -D-manopiranosose 3-O-substituída, sulfatadas em carbono 2 e/ou 6 (KOLENDER et al., 1995; 1997).

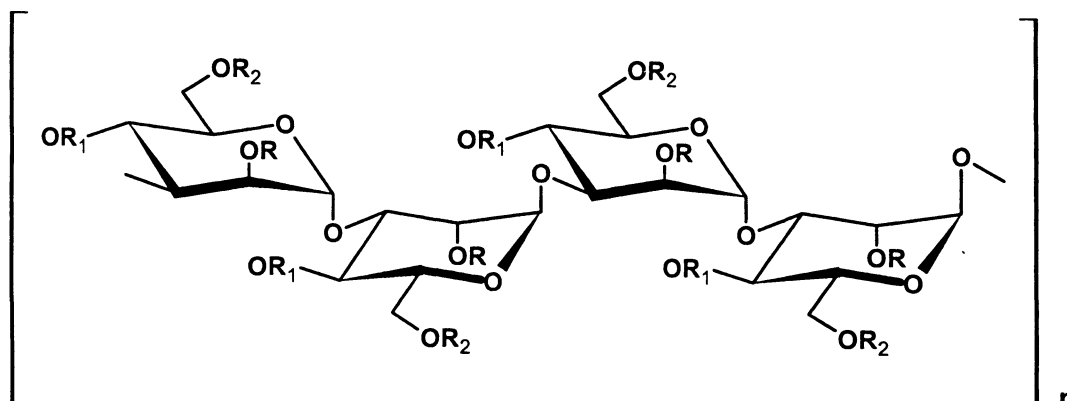
As xilomananas caracterizam-se por apresentarem um padrão estrutural semelhante as mananas porém apresentam substituição por grupos sulfato em carbonos 2, 4 e/ou 6 e glicosilação em carbono 2 por unidades de β -D-xilose (MATULEWICZ; CEREZO, 1987² – FIGURA 5).

Mananas e xilomananas sulfatadas têm sido obtidas a partir de gêneros como *Nothogenia* (MATULEWICZ; CEREZO, 1987²; KOLENDER et al., 1995; 1997) e *Nemalion* (USOV ET AL., 1973).

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

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

FIGURA 5 - ESTRUTURA DAS MANANAS, XILOMANANAS E GALACTOXILOMANANAS ISOLADAS DE ALGAS VERMELHAS.



manana: R= H, SO₃⁻; R₁= H; R₂= H, SO₃⁻.

xilomanana: R= H, SO₃⁻, xilose; R₁= H, SO₃⁻; R₂= H, SO₃⁻.

galactoxilomanana: R= H; R₁= H, SO₃⁻, xilose, galactose; R₂= H.

1.7. TRATAMENTO ALCALINO E REAÇÃO DE CICLIZAÇÃO

Como já mencionado anteriormente, as galactanas sulfatadas apresentam elevado interesse comercial e industrial devido as propriedades físico-químicas apresentadas por estes polímeros (DE RUITER; RUDOLPH, 1997). A habilidade destes polissacarídeos em formar géis e soluções viscosas está diretamente relacionada com a sua conformação estrutural, enquanto que esta tem uma relação direta com a presença de unidades de 3,6-anidrogactose (USOV, 1984).

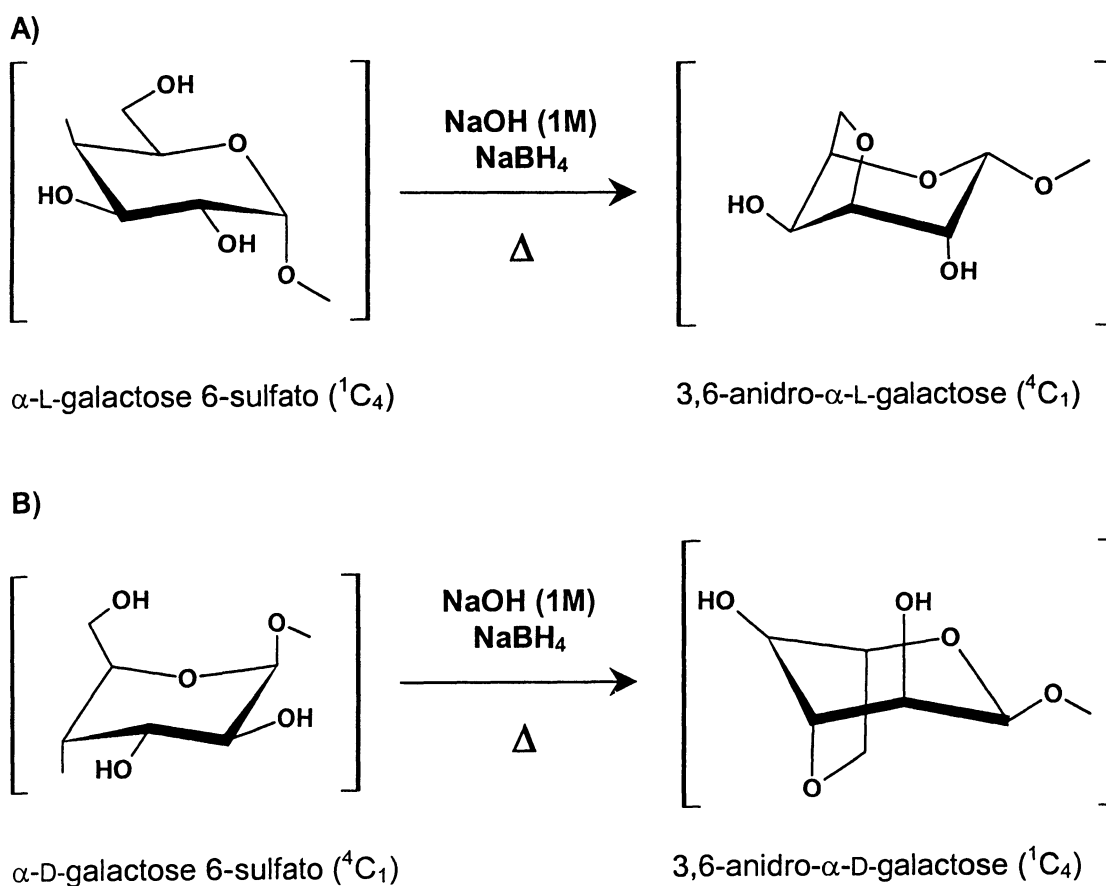
Este monossacarídeo, a 3,6-anidrogactose, é mais comumente encontrado em carboidratos de algas vermelhas, distinguindo-os dos demais polissacarídeos biossintetizados por outros grupos vegetais (USOV, 1984; GRAHAM; WILCOX, 2000; COLE; SHEATH, 1990) e é formado naturalmente na alga através da atividade da enzima sulfidrolase, a partir de unidades precursoras de galactose 6-sulfato (LAWSON; REES, 1970; WONG; CRAIGIE, 1978; MCCANDLESS; CRAIGIE, 1979; ZINOUN et al., 1997).

Quimicamente as unidades de 3,6-anidrogactose também podem ser obtidas a partir das mesmas unidades precursoras, através de uma técnica denominada tratamento alcalino, onde sob catálise básica o grupo sulfato é liberado

num processo de eliminação, seguido pela formação do anel 3,6-anidro, mediante perda de uma molécula de água, caracteristicamente numa reação de substituição nucleofílica bimolecular (Sn2), denominada reação de ciclização (CIANCIA, 1994).

Esta reação se processa sob temperatura variável, em meio alcalino (NaOH 1M – FIGURA 6), por esta razão denominada de tratamento alcalino, e na presença do agente redutor, estável em meio básico, borohidreto de sódio (NaBH₄), o qual é adicionado ao meio reacional antes e após adição da base, visando impedir a degradação do polissacarídeo através da redução de sua extremidade redutora (CIANCIA, 1994).

FIGURA 6 - REAÇÃO DE CICLIZAÇÃO EM AGARANAS (A) E CARRAGENANAS (B).



O processo de eliminação do grupo sulfato durante a reação de ciclização é acompanhado pela inversão da configuração do átomo de carbono ao qual estava unido, ou seja, como resultado desta reação as unidades de α -galactose passam de uma conformação 1C_4 para 4C_1 em agaranas (L-galactose) e de 4C_1 para 1C_4 em carragenanas (D-galactose - CIANCIA, 1994), como mostrado na FIGURA 5. A mudança de conformação facilita a ciclização por aproximar o oxigênio em C-3 e o sulfato em C-6, que passam a se encontrar em posições cis diaxiais favorecendo o ataque nucleofílico.

A reação de ciclização somente se processara com as unidades de α -galactose que possuírem sulfato no carbono 6 e hidroxila livre em carbono 3, estando a velocidade desta reação sob controle da temperatura, concentração de alcali, do tempo de reação e da distribuição dos grupos sulfato pela unidade A (β -D-galactose - CIANCIA, 1993; NOSEDA et al., 2000).

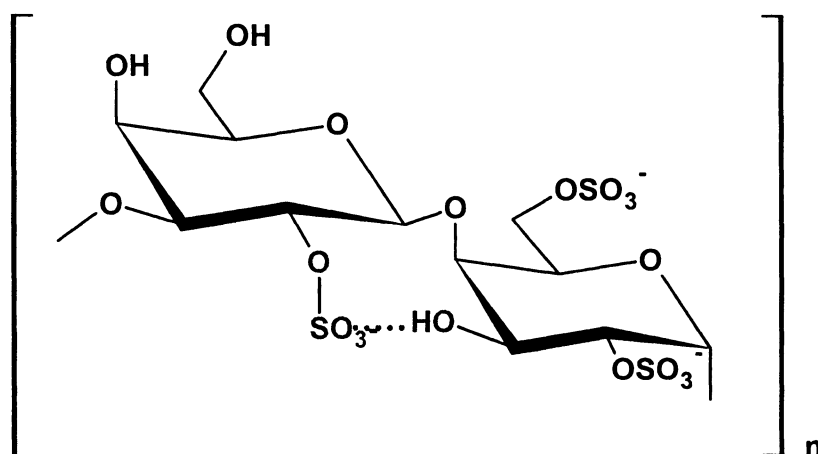
O tratamento alcalino pode ser utilizado em laboratório, para se determinar quantitativamente as unidades de α -galactose 6-sulfato presentes em uma dada amostra polissacarídica através das diferenças nas percentagens de sulfato ou de 3,6-anidrogactose presente na amostra antes e após o tratamento.

O método fotocolorimétrico utilizado laboratorialmente para se quantificar o teor de 3,6-anidrogactose presente numa amostra polissacarídica é o método do resorcinol (YAPHE; ARSENAULT, 1965). Esta metodologia utiliza-se da propriedade apresentada pelos monossacarídeos de formarem 5-hidroximetil-2-furfural (HMF) em meio fortemente ácido, após hidrólise. O HMF interage com diferentes reagentes fenólicos em reações que promovem coloração passível de ser dosada fotocolorimetricamente, sob diferentes comprimentos de onda. O resorcinol (1,3-dihidroxibenzeno) é um destes reagentes utilizados para quantificar 3,6-anidrogactose na forma de HMF.

A reação de ciclização obedece a uma cinética de pseudo-primeira ordem. Estudos realizados por CIANCIA et al., (1993) com carragenanas pertencentes a família Lambda mostraram que a velocidade de reação para estes polissacarídeos é mais lenta do que para carragenanas da família Kappa, devido a diferenças apresentadas no padrão de sulfatação entre as duas famílias.

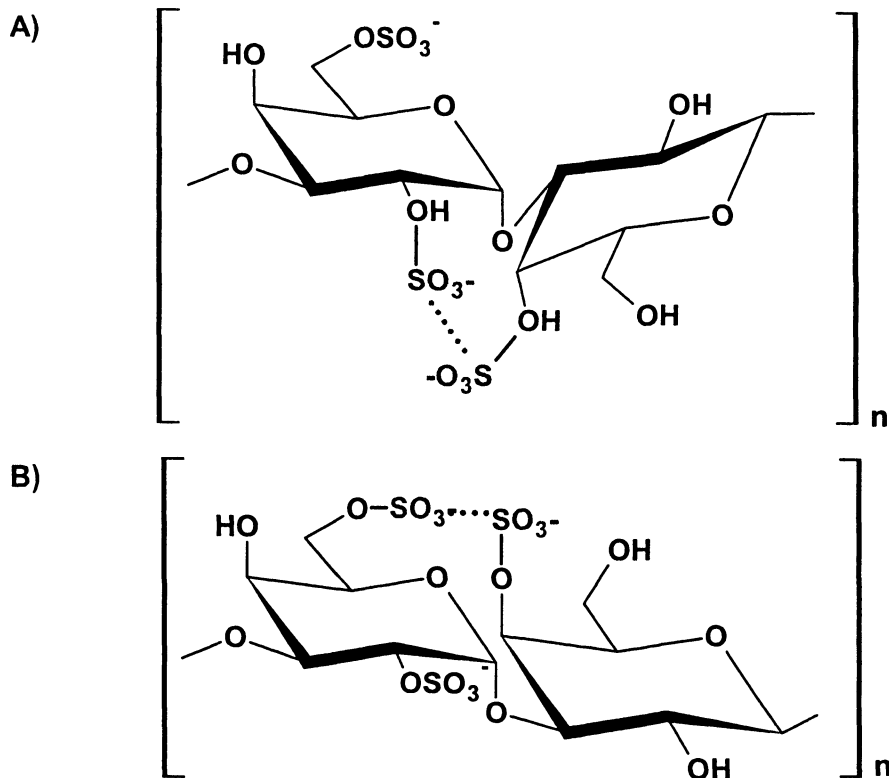
Mais detalhadamente, a lambda-carragenana apresenta grupos sulfato ao redor da hidroxila livre em carbono 3 da α -D-galactose. Tais grupos esterificam os carbonos 2 das unidades A e B (TABELA 1) e protegem a hidroxila em carbono 3 da ionização, o que dificulta o processo de ciclização, uma vez que é esta a força que dirige a reação de ciclização (CIANCIA et al., 1993). Contribui principalmente para este efeito a formação de uma ponte de hidrogênio entre o grupo sulfato em C-2 da unidade A e a hidroxila em C-3 da unidade B (FIGURA 7). Tais grupos sulfato não são encontrados na família Kappa (TABELA 1).

FIGURA 7 - INTERAÇÃO ENTRE O GRUPO SULFATO EM C-2 DA β -D-GALACTOSE COM A HIDROXILA LIVRE EM C-3 DA α -L-GALACTOSE EM LAMBDA-CARRAGENANA (CIANCIA ET AL., 1993).



O padrão de sulfatação observado nas mu/nu-carragenanas promovem um efeito contrário ao observado nas lambda-carragenanas. Em mu/nu-carragenanas os grupos sulfato encontrados esterificando os carbonos 4 das unidades A, podem interagir com os grupos sulfatos que esterificam os carbonos 2 e 6 presentes na unidade B (FIGURA 8), a repulsão gerada entre estes grupos favorecem a alteração conformacional da unidade B (${}^1\text{C}_4$ para ${}^4\text{C}_1$) e, conseqüentemente, a ciclização (NOSEDA; CEREZO, 1995).

FIGURA 8 - INTERAÇÃO ENTRE O GRUPO SULFATO EM C-4 DA β -D-GALACTOSE COM OS GRUPOS SULFATO EM C-2 (A) E C-6 (B) DA α -L-GALACTOSE EM MU/NU-CARRAGENANA (NOSEDA; CEREZO, 1994).



Ainda, NOSEDA et al., (2000) estudaram a reação de ciclização em porfiranas, as quais não sofreram influência de outros grupos sulfato substituintes, uma vez que tais polissacarídeos apresentam exclusivamente grupos sulfato em C-6 da unidade B (FIGURA 3), e obtiveram uma velocidade de reação intermediária àquelas apresentadas pelas lambda- e mu/nu-carragenanas. Estes resultados mostraram que a velocidade da reação de ciclização não é dependente da enantiomericidade do resíduo de α -galactose, mas sim da posição e distribuição dos grupos sulfato substituintes (NOSEDA et al., 2000).

O estudo da cinética química da reação de ciclização visa buscar melhores condições para obtenção de ficolóides com maior poder geleificante através de

tratamento alcalino, mediante o estudo do comportamento desta reação em polissacarídeos modelos, tais como kappa-, nu- e lambda-carragenana e porfirana.

1.8. MECANISMO DE FORMAÇÃO DE GÉIS

A habilidade de formar géis e soluções viscosas é uma importante característica observada somente em algumas estruturas de carragenanas e agaranas e apresenta extremo interesse comercial e industrial (RAVEN et al., 1996; VAN DEN HOEK et al., 1989; GRAHAM; WILCOX, 2000; USOV, 1984, 1998).

O processo de geleificação em galactanas sulfatadas é uma propriedade termo-reversível, uma vez que o resfriamento faz com que as moléculas adquiram uma conformação orientada em hélice e se agreguem formando o gel, enquanto que o aquecimento torna o gel desordenado, fazendo com que as moléculas se dispersem e adquiram uma conformação em "random coil" (COLE; SHEATH, 1990).

A formação do gel se deve a uma associação entre diversas cadeias polissacarídicas paralelamente arranjadas em hélice, formando uma rede tridimensional totalmente estabilizada por pontes de hidrogênio inter-cadeias, que se formam entre as hidroxilas livres presentes (REES, 1965; USOV, 1984; COLE; SHEATH, 1990). As associações ocorrem entre longas seções regulares ou repetitivas das cadeias polissacarídicas paralelas e se interrompem nas regiões onde esta regularidade não está presente, denominadas de zonas de união, o que permite a associação com outras cadeias (REES, 1965; USOV, 1984; COLE; SHEATH, 1990).

A estrutura secundária apresentada por estes polissacarídeos se deve a presença das unidades de 3,6-anidrogactose, pois sua conformação 1C_4 , no caso das carragenanas, ou 4C_1 no caso das agaranas com ligações glicosídicas equatoriais, difere das demais unidades presentes no polímero e causa um desvio na direção da cadeia polissacarídica, permitindo-lhe adquirir uma conformação helicoidal, orientada a direita nas carragenanas e a esquerda nas agaranas (REES, 1965, COLE, SHEATH, 1990; VAN DE VELDE et al., 2002).

O processo de geleificação em carragenanas ainda necessita da presença de cátions específicos (cálcio e potássio) para neutralizar a carga dos grupos sulfato, projetados para fora a partir do eixo principal da hélice, facilitando assim a agregação lado-a-lado das hélices (COLE; SHEATH, 1990).

Portanto, a geleificação se deve à formação de uma rede tridimensional, onde as diferenças observadas nas propriedades dos diferentes géis se devem a capacidade de associação entre as várias cadeias polissacarídicas (USOV, 1984).

1.9. OBTENÇÃO DE OLIGOSSACARÍDEOS ATRAVÉS DE HIDRÓLISE REDUTIVA PARCIAL

Oligossacarídeos são naturalmente encontrados em vegetais como produtos de seu metabolismo normal e podem exercer diversas funções, desde estruturais até reserva e osmorregulação (CROWE et al., 1987; KANDLER; HOPF, 1980).

Os oligossacarídeos podem ser biossintetizados naturalmente no vegetal a partir de monossacarídeos ou oligossacarídeos precursores ou de um doador glicídico pela ação de enzimas específicas denominadas de glicosiltransferases e recebem a denominação de oligossacarídeos primários, por serem sintetizados *in vivo* (KANDLER; HOPF, 1980).

Oligossacarídeos secundários, por sua vez, são aqueles que têm a sua origem atribuída à hidrólise parcial de outros açúcares, como oligossacarídeos maiores, polissacarídeos, glicoproteínas ou glicolipídeos, por ação enzimática, tanto *in vivo* como *in vitro* (glicosidases e hidrolases) ou por catálise ácida *in vitro* (KANDLER; HOPF, 1980).

A caracterização de oligossacarídeos obtidos *in vitro*, tanto por hidrólise ácida parcial como enzimática, é um método muito útil e amplamente utilizado para auxiliar na determinação estrutural de polissacarídeos a eles relacionados, pois fornece informações importantes como seqüência e configuração anomérica de suas unidades monossacarídicas constituintes e tipos de ligações glicosídicas presentes (ASPINALL, 1970, 1983).

Hidrólises enzimáticas são mais vantajosas que as ácidas por serem altamente específicas, uma vez que tanto hidrolases como glicosidases se apresentam altamente específicas por determinadas unidades monossacarídicas e por suas configurações anoméricas (ASPINALL, 1983).

MORRICE et al., (1983) e USOV e IVANOVA (1987) utilizaram uma β -agarase de origem bacteriana para obter oligossacarídeos por meio de hidrólise enzimática, com a finalidade de elucidar a estrutura química das agaranas isoladas de *Porphyra umbilicalis* e de *Plysiphonia morrowii*. Esta enzima cliva especificamente as ligações β -D-galactopiranosídicas da agarose, liberando assim neoagarbiose (3,6-anidro- α -L-galactopiranosose-(1 \rightarrow 3)-D-galactopiranosose) ou oligossacarídeos maiores (ASPINALL, 1983).

A hidrólise ácida parcial é processada de forma similar a uma hidrólise convencional, amenizando-se apenas algumas de suas condições, tais como temperatura, tempo ou concentração ácida; por este método, polissacarídeos que apresentem um único padrão de ligação glicosídica ou vários, porém com uma mesma susceptibilidade à clivagem, darão origem a uma seleção representativa de todos os oligossacarídeos possíveis. Na prática, contudo, verifica-se que a taxa de hidrólise de diferentes ligações glicosídicas são, com freqüência, suficientemente diferentes para que nem todos os possíveis oligossacarídeos possam ser isolados a partir de um único método de despolimerização, rendendo assim misturas de açúcares de relativa baixa massa molecular junto com, em alguns casos fragmentos de alta massa molecular (ASPINALL, 1983).

Os produtos da hidrólise ácida parcial (mono, di e oligossacarídeos) antes de serem caracterizados, devem ser primeiramente fracionados, para tanto, uma variedade de procedimentos cromatográficos podem ser utilizados, incluindo cromatografia de partição em celulose, cromatografia de adsorção em carvão (onde os oligossacarídeos são progressivamente separados com água contendo proporções crescentes de etanol – WHISTLER; DURSO, 1950), cromatografia de troca iônica ou gel filtração (ASPINALL, 1983).

USOV e ELASHVILI (1991) e STEVENSON e FURNEAUX (1991) têm introduzido nas análises estruturais de galactanas de algas vermelhas uma variação da hidrólise reductiva convencional, para a obtenção de oligossacarídeos. Eles mostraram que durante uma hidrólise total, polissacarídeos contendo unidades de

3,6-anidrogactose, encontrada unicamente em polissacarídeos de algas vermelhas, sofrem uma redução quantitativa destes monossacarídeos, pouco resistentes ao meio ácido quando submetidos a condições padrões de hidrólise (ácido trifluoracético, 100 °C, 5 horas), enquanto que os demais monossacarídeos permanecem quantitativamente inalterados, por esse motivo tornou-se necessário a utilização de um método hidrolítico mais ameno para evitar a degradação dessas unidades.

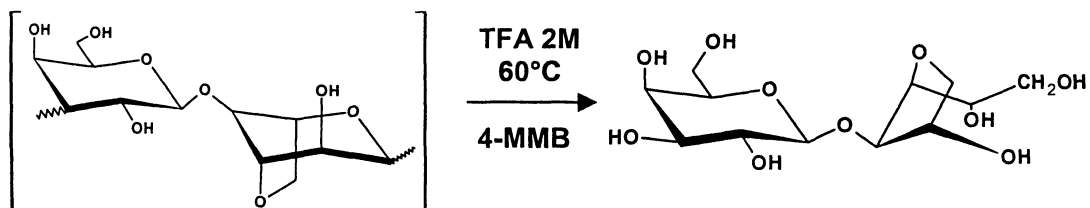
STEVENSON e FURNEAUX (1991) desenvolveram um método denominado hidrólise redutiva, onde juntamente ao ácido trifluoracético é acrescentado um agente redutor estável em meio ácido, o complexo de 4-metil morfolina borano (4-MMB), o qual garante que as unidades de 3,6-anidrogactose se mantenham intactas durante o processo hidrolítico. Isto é possível uma vez que durante um processo de pré-hidrólise, que ocorre em condições brandas (80°C durante 15 minutos), somente as ligações 3,6-anidrogactosídicas são hidrolisadas, por serem mais lábeis, e estas unidades monossacarídicas livres são imediatamente reduzidas a 3,6-anidrogactitol no meio reacional, adquirindo desta maneira estabilidade. Em seguida, processa-se a hidrólise das demais unidades constituintes do polissacarídeo, à 120°C durante 1 hora e meia, e a redução das mesmas, sendo assim possível quantificar ao mesmo tempo todos os açúcares (na forma de acetatos de alditol) presentes em uma amostra utilizando cromatografia líquido-gasosa (CG).

Baseado neste método hidrolítico, porém em condições diferenciadas, USOV e ELASHVILI (1991) desenvolveram a hidrólise redutiva parcial para obtenção de oligossacarídeos contendo, unicamente, 3,6-anidrogactitol como unidade terminal (FIGURA 9). Assim, por exemplo, a hidrólise parcial da agarose resulta unicamente no dissacarídeo agarobiitol, enquanto que de carragenanas contendo 3,6-anidrogactose resulta carrabiitol e/ou seus mono e dissulfato (USOV, 1998).

Tais oligossacarídeos reduzidos se mostram estáveis e mais convenientes para separação por cromatografia do que os produtos de hidrólise ácida ou metanólise (este último processo permite a proteção da ponta redutora com um grupo metil, os quais poderiam ser rapidamente degradados a hidroximetilfurfural nas condições de hidrólise), sendo que suas estruturas e posição de grupos sulfato podem ser esclarecidas usando RMN (USOV; ELASHVILI, 1991).

FIGURA 9 - PRODUTOS DE HIDRÓLISE REDUTIVA PARCIAL OBTIDOS A PARTIR DA AGAROSE (A) E DA KAPPA-CARRAGENANA (B) CONTENDO 3,6-ANIDROGALACTOSE (USOV, 1998).

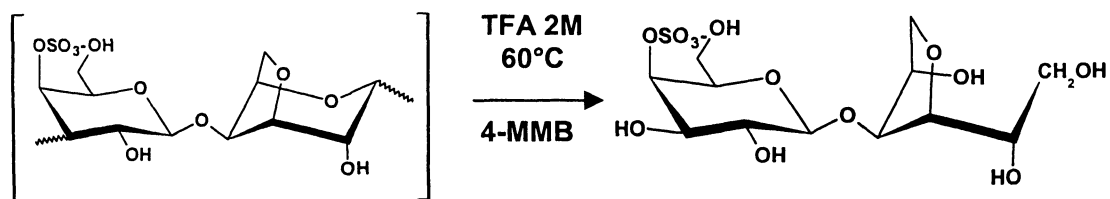
A)



agarose

agarobiitol

B)



kappa-carragenana

carrabiitol 4-sulfato

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVOS GERAIS:

Caracterizar a estrutura química fina dos polissacarídeos neutros e sulfatados obtidos mediante extração aquosa a partir de algas vermelhas pertencentes às ordens Nemaliales e Palmariales.

Caracterizar a estrutura química fina dos polissacarídeos sulfatados obtidos mediante extração aquosa a partir de algas vermelhas pertencentes às famílias Solieriaceae e Furcellariaceae (Gigartinales) e utiliza-los como modelos para o estudo cinético da reação de ciclização.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- 1 - Obter polissacarídeos neutros por extração aquosa a quente (80°C) a partir das algas vermelhas *Galaxaura marginata*, *G. obtusata*, *Tricleocarpa cylindrica*, *T. fragilis*, *Scinaia halliae* (Ordem Nemaliales) e *Palmaria palmata* (Ordem Palmariales);
- 2 - Obter e purificar polissacarídeos sulfatados por extração aquosa a quente (80 °C) a partir das algas vermelhas *Tricleocarpa fragilis* e *Galaxaura marginata*;
- 3 - Obter e purificar polissacarídeos sulfatados por extração aquosa a frio (25 °C) a partir das algas vermelhas *Eucheuma denticulatum* (Solieriaceae) e *Furcellaria lumbricalis* (Furcellariaceae);
- 4 - Determinar a estrutura química fina destes polissacarídeos por métodos químicos e espectroscópicos;
- 5 - Utilizar as carragenanas isoladas a partir das algas *E. denticulatum* e *F. lumbricalis* como modelos no estudo da cinética química da reação de ciclização.

MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. MATERIAL

Nesta pesquisa foram estudados polissacarídeos sulfatados isolados da fase gametofítica das algas vermelhas *Galaxaura marginata* (J. Ellis & Sol.) J. V. Lamour., coletada nas praias Enseada das Garças e Mar Azul, município do Fundão (ES - Brasil), em julho de 2003 (por: N.S. Yokoya e S.M.P.B. Guimarães) e *Tricleocarpa fragilis* (L.) Huisman & R. A. Towns, coletada na praia do Ribeiro, município de Bombinhas (SC - Brasil), em março de 2000 (por: M.D. Nosedá e M.E.R. Duarte).

Também foram estudados os polissacarídeos neutros isolados das algas vermelhas *Galaxaura obtusata* (J. Ellis & Sol.) J. V. Lamour., coletada no município de Morro de São Paulo (BA - Brasil), em julho de 2001 (por: M.D. Nosedá e M.E.R. Duarte), *G. marginata* (J. Ellis & Sol.) J. V. Lamour., *Tricleocarpa fragilis* (L.) Huisman & R. A. Towns, *Tricleocarpa cylindrica* (J. Ellis & Sol.) Huisman & Borow., coletada nas praias Enseada das Garças e Mar Azul, município do Fundão (ES), em julho de 2003 (por: N.S. Yokoya e S.M.P.B. Guimarães), *Sciniaia halliae* (Setch.) Huisman, coletada na praia Enseada das Garças, município do Fundão (ES), em julho de 2003 (por: N.S. Yokoya e S.M.P.B. Guimarães) e *Palmaria palmata* (L.) O. Kuntze, adquirida de fonte comercial (DULSE – Atlantic Mariculture Limited, Grand Manan, New Brunswick - Canadá).

Para o estudo de cinética química foram utilizados os polissacarídeos sulfatados isolados das algas vermelhas *Eucheuma denticulatum* (N.L. Burman) F.S. Collins & Hervy, adquirida de fonte comercial (Gelymar S.A., Puerto Montt - Chile) e *Furcellaria lumbricalis* (Hudson) J. V. Lamour., coletada em Prince Edward Island (Canadá), em agosto de 2003 (por: M. D. Nosedá).

Depois de retiradas do mar, os exemplares de *G. obtusata*, *G. marginata*, *T. fragilis*, *T. cylindrica*, *S. halliae* e *F. lumbricalis* foram lavados em água corrente, desidratados à sombra e submetido à moagem em moinho de faca.

3.1.1. POSICIONAMENTO SISTEMÁTICO DAS ESPÉCIES ESTUDADAS

Divisão: Rhodophyta

Classe: Rhodophyceae

Ordem: Nematiales

Família: Galaxauraceae

Gênero: *Galaxaura*

Espécie: *G. obtusata* (J. Ellis & Sol.) J. V. Lamour.

Espécie: *G. marginata* (J. Ellis & Sol.) J. V. Lamour.

Gênero: *Tricleocarpa*

Espécie: *T. fragilis* (L.) Huisman & R. A. Towns

Espécie: *T. cylindrica* (J. Ellis & Sol.) Huisman & Borow.

Gênero: *Scinaia*

Espécie: *S. halliae* (Setch.) Huisman

Ordem: Palmariales

Família: Palmariaceae

Gênero: *Palmaria*

Espécie: *P. palmata* (L.) O. Kuntze

Ordem: Gigartinales

Família: Solieriaceae

Gênero: *Eucheuma*

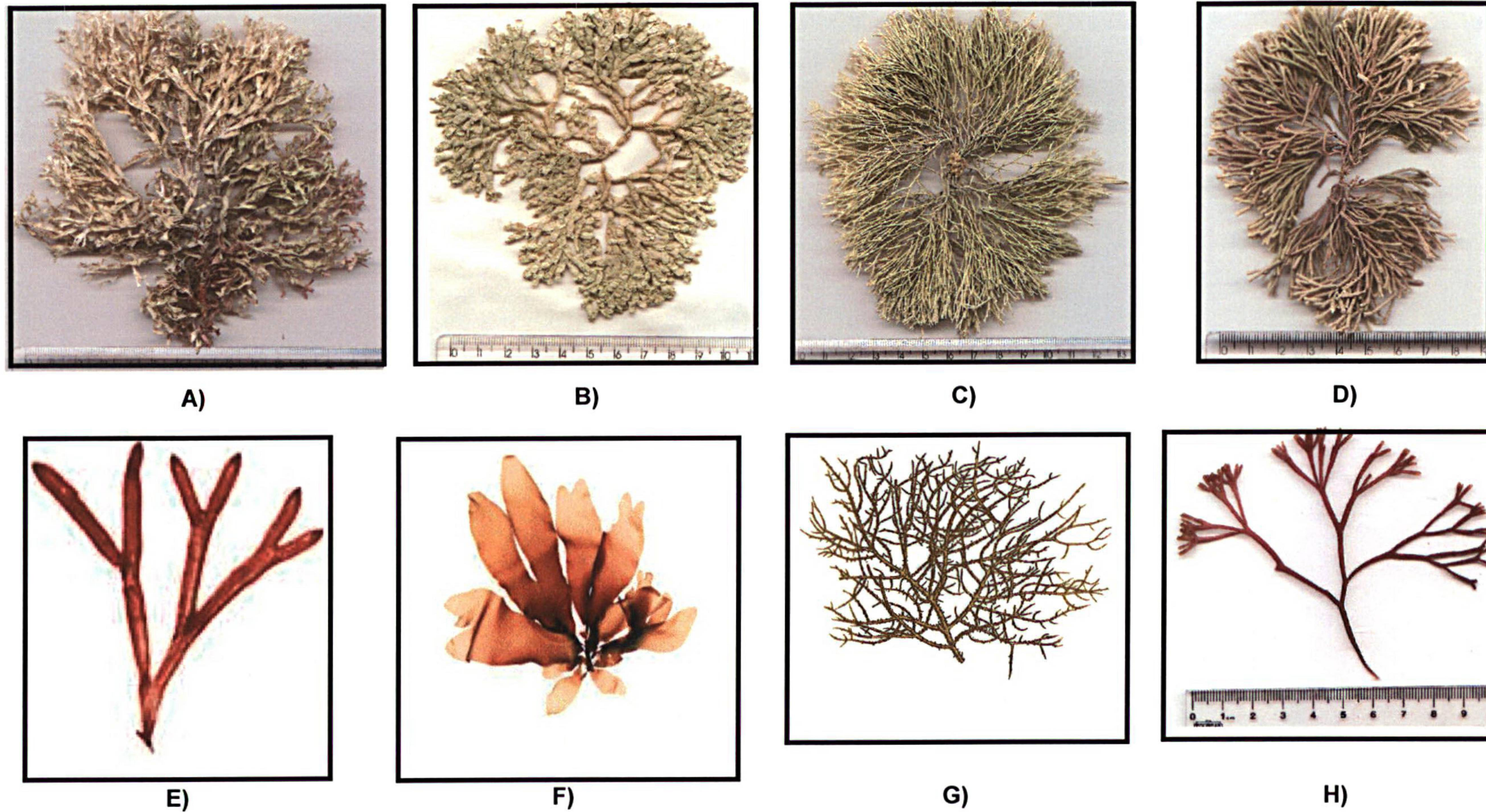
Espécie: *E. denticulatum* (N.L. Burman) F.S. Collins & Hervy

Família: Furcellariaceae

Gênero: *Furcellaria*

Espécie: *F. lumbricalis* (Hudson) J. V. Lamour.

FIGURA 10: Algas vermelhas *G. marginata* (A), *G. obtusata* (B), *T. cylindrica* (C), *T. fragilis* (D), *S. halliae* (E), *P. palmata* (F), *E. denticulatum* (G) e *F. lumbricalis* (H).



fonte: material *in natura* fotografado em laboratório (A, B, C, D e H); sites na internet: www.ne.jp/asalri/marine/algal/Scinaia.html (E), www.surialink.com/abc_eucheuma/1/46.html (F), www.surialink.com/.../reds/Palmaria/Palmaria.html.

3.2. EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS

As algas *Galaxaura marginata* (4,2 g), *G. obtusata* (58,0 g), *Tricleocarpa cylindrica* (9,4 g), *T. fragilis* (70,0 g), *Scinaia halliae* (5,6 g) e *Palmaria palmata* (68,0 g) foram utilizadas como fonte para obtenção dos polissacarídeos caracterizados nesta tese. Para isso todas as algas foram submetidas, separadamente, ao mesmo procedimento de extração descrito a seguir.

O material algal foi submetido a extração aquosa (5 g% p/v) a quente (80 °C) durante 4 horas sob agitação mecânica seguida por centrifugação (10.000 rpm durante 25 minutos). Posteriormente, a fração sobrenadante foi submetida à precipitação com 3 volumes de etanol, onde, após nova centrifugação (12.000 rpm durante 15 minutos), os polissacarídeos precipitados foram ressolubilizados em água, centrifugados, nas mesmas condições já descritas, dialisados contra água destilada, concentrados em rotaevaporador sob pressão reduzida e liofilizados, para obtenção de cada fração polissacarídica, as quais foram denominadas utilizando-se as iniciais de cada espécie: GM, GO, TC, TF, SH e PP.

Para as algas *Eucheuma denticulatum* e *Furcellaria lumbricalis*, as quais foram utilizadas como fontes biológicas para obtenção dos polissacarídeos caracterizados e utilizados para os estudos de cinética química, realizou-se uma extração aquosa (5 g% p/v) a temperatura ambiente (25 °C) durante 14 horas, após esta etapa seguiu-se a mesma metodologia descrita para as demais algas, obtendo-se desta maneira as frações denominadas ECW (a partir da primeira alga), F1 e F2 (a partir da segunda alga).

3.3. OBTENÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS NEUTROS E SULFATADOS (PRECIPITAÇÃO COM CETAVLON)

Para promover a separação dos polissacarídeos neutros e sulfatados presentes nas frações GM, GO, TC, TF, SH e PP, as mesmas foram redissolvidas em água (0,25 g%) e a elas adicionou-se uma solução de Cetavlon (*cetyltrimethylammonium bromide*) 10%. As soluções foram mantidas sob agitação constante durante 12h e após centrifugação (7.000 rpm durante 20 minutos) o material precipitado (complexo polissacarídeo ácido - Cetavlon) foi descomplexado

por meio de tratamento com NaCl 4M, durante uma noite e posteriormente precipitado com etanol (3 volumes), enquanto que a fração sobrenadante (contendo o material neutro solúvel) foi diretamente precipitada com etanol (3 volumes). As frações polissacarídicas GMp (3,17 %), GOp (nd), TCp (0,77 %), TFp (1,73 %), SHp (5,10 %) e Pp (3,25 %), proveniente dos materiais precipitados e GMs (0,51 %), GOs (18,0 %), TCs (0,24 %), TFs (0,30 %), SHs (0,38 %) e PPs (15,0 %), provenientes dos materiais solúveis, foram obtidas após diálise contra água destilada, concentração em rotaevaporador sob pressão reduzida e liofilização.

3.4. PRECIPITAÇÃO COM KCl

A fração polissacarídica de interesse (F1 e F2) foi primeiramente dissolvida em água (0,25 % p/v) à temperatura ambiente e soluções de concentrações crescentes de cloreto de potássio (0,25; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 M) foram adicionadas gradativamente. A cada adição do sal a solução foi mantida sob agitação mecânica por aproximadamente 2 horas e deixada em repouso 14 horas à 4 °C, seguida por centrifugação (12.000 rpm durante 15 minutos). Assim o material precipitado foi submetido a diálise e liofilização, enquanto o sobrenadante foi submetido a um novo tratamento com uma concentração maior de sal.

3.5. MÉTODOS ANALÍTICOS GERAIS

3.5.1. DOSAGEM DE AÇÚCAR TOTAL

As dosagens dos carboidratos totais presentes nas frações polissacarídicas foram realizadas de acordo com o método do fenol-ácido sulfúrico descrito por DUBOIS et al. (1956), utilizando-se galactose, manose e xilose como padrões (faixa de sensibilidade 10 – 70 µg/ml).

3.5.2. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE GRUPOS SULFATO

A determinação do teor de grupos sulfato das frações polissacarídicas foi realizada através do método turbidimétrico da gelatina-BaCl₂, após hidrólise das

amostras (HCl 1 M, 5 horas, 105 °C) de acordo com DODGSON e PRICE (1962), utilizando-se sulfato de sódio como padrão (faixa de sensibilidade 20 – 200 µg/ml).

3.5.3. DOSAGEM DE PROTEÍNAS

A detecção e dosagem do teor de proteína nas amostras foi realizada de acordo com o método de LOWRY et al. (1951), utilizando-se soro albumina bovina como padrão (faixa de sensibilidade 20 – 100 µg/ml).

3.5.4. DOSAGEM DO TEOR DE 3,6-ANIDROGALACTOSE

A dosagem do teor de 3,6-anidrogalactose foi realizada utilizando-se o método do resorcinol (YAPHE, 1960; YAPHE; ARSENAULT, 1965). Alíquotas das amostras (0,05 ml) obtidas em diferentes intervalos de tempo por tratamento alcalino (método analítico, como descrito no item 3.7.3.2.) foram acrescidas de 0,75 ml de água e 4 ml do reativo de resorcinol, preparado com 9 ml de solução de resorcinol (15 mg de resorcinol em 10 ml de água), 1 ml de acetal (1 ml de acetal em 24 ml de água) e 100 ml de ácido clorídrico fumegante. Paralelamente foi preparado o branco com água destilada. Os tubos foram então vedados e submetidos a temperatura de 80°C em banho termostaticado por 10 minutos. Após resfriamento em banho de gelo a dosagem do teor do anidro-açúcar foi realizada pela leitura da absorbância à 555 nm.

3.5.5. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE CINZAS

A determinação do teor de cinzas da fração de interesse foi realizada no Departamento de Química da UFPR. Inicialmente, o material seco em estufa a 30 °C foi calcinado no interior de cadinhos (previamente mantidos a 900 °C por 30 minutos) em chama até completa incineração. Posteriormente o material foi mantido em mufla a 900°C por 1 hora.

3.5.6. DOSAGEM DE AÇÚCARES REDUTORES

A massa molecular das frações de interesse foi estimada a partir de seus poderes redutores de acordo com o método de PARK e JOHNSON (1949), utilizando-se xilose como padrão (faixa de sensibilidade 1 – 10 µg/ml), aplicados a fórmula $Mm = 150xp/r$, onde p corresponde ao peso da amostra e r a extremidade redutora.

3.5.7. POLARIMETRIA

A determinação da rotação óptica específica (α_D^{25}) 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.

3.6. MÉTODOS HIDROLÍTICOS

3.6.1. HIDRÓLISE ÁCIDA TOTAL

As frações polissacarídicas contendo xilanas ou xilomananas sulfatadas, em suas formas nativas ou metiladas, foram submetidas a hidrólise ácida total (ácido trifluoracético 2 M, 121 °C, 1,5 h) seguida por redução com NaBH₄ ou NaBD₄ por 14 horas, acetilação (anidrido acético, 120 °C, 1,5 h) e lavagem com água/CHCl₃/NaHCO₃, para posterior análise por cromatografia líquido gasosa (CLG) e cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-EM).

3.6.2. HIDRÓLISE ÁCIDA TOTAL DO TIPO HIDRÓLISE REDUTIVA

As frações polissacarídicas contendo galactanas sulfatadas, em suas formas nativas ou metiladas, foram submetidas a hidrólise ácida total do tipo hidrólise reductiva de acordo com o método de STEVENSON e FURNEAUX (1991), modificada por FALSHAW e FURNEAUX (1994) a qual se processa em duas etapas. Na primeira etapa, onde ocorre a liberação e a concomitante redução das unidades

de 3,6-anidrogactose, o polissacarídeo foi hidrolisado à 80 °C por 15 minutos na presença de TFA 3 M e do complexo 4-metil morfolina borano (agente redutor estável em meio ácido). Na segunda etapa, onde ocorre a liberação e a redução das demais unidades monossacarídicas, o material pré-hidrolisado foi mantido a 120 °C por 90 minutos na presença de TFA, na concentração final de 2 M e de 4-metil morfolina borane. Os alditóis assim obtidos foram acetiladas com anidrido acético (0,5 ml)/ TFA concentrado (0,5 ml) durante 15 minutos a 50 °C. Na forma de acetato de alditol, foram analisados por cromatografia líquido gasosa (CLG) e cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-EM).

3.6.3. METANÓLISE

Somente frações metiladas foram submetidas a metanólise (MeOH/HCl 3%, 70°C, 3h) seguida por hidrólise como descrito no item 3.6.1 e redução com NaBH₄ ou NaBD₄ por 14 horas, acetilação (1 ml anidrido acético, 120°C, 1,5h) e lavagem com água/CHCl₃/NaHCO₃, para posterior análise por cromatografia líquido gasosa (CLG) e cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-EM).

3.7. MODIFICAÇÃO QUÍMICA DOS POLISSACARÍDEOS

3.7.1. DESSULFATAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS

O processo de dessulfatação foi realizado utilizando-se o método solvolítico, com as frações de interesse na forma de sal de piridônio. Para obtenção deste sal, os polissacarídeos foram solubilizados em água e a elas adicionado resina catiônica Dowex 50x8 (forma de H⁺) sob agitação magnética à temperatura ambiente por 30 minutos, até o pH do meio ficar entre 1,0-2,0. O material foi filtrado (sob pressão reduzida), neutralizado com piridina até pH 7,0 e liofilizado.

Uma vez na forma de sal de piridônio, os polissacarídeos foram ressolubilizados em mistura de dimetilsulfóxido:metanol:piridina (89:10:1), respeitando-se a relação de 10mg de polissacarídeo para 3 ml de solvente (NAGASAWA et al., 1979) e mantida a 100°C durante 6 horas. Após o resfriamento, a fração solvolizada foi dialisada contra água destilada e liofilizada. As frações

quimicamente modificadas assim obtidas foram identificadas pela adição das letras ds (dessulfatado) ao nome das frações originais.

3.7.2. DEGRADAÇÃO CONTROLADA DE SMITH

Para a realização da degradação controlada de Smith, a fração polissacarídica de interesse foi solubilizada em água destilada (21 mg/ 6 ml) contendo metaperiodato de sódio (NaIO_4 - 130 mg) e mantida em ambiente escuro a temperatura ambiente durante 48 horas. Após este período a solução foi tratada com etilenoglicol visando consumir o excesso de NaIO_4 , reduzida com boroidreto de sódio (NaBH_4 - 10%) durante 20h, neutralizada com ácido acético, dialisada e liofilizada (FURNEAUX; STEVENSON, 1990). O polissacarídeo assim modificado foi submetido à hidrólise branda com TFA 1M durante 20 horas a temperatura ambiente. A fração quimicamente modificada assim obtida foi identificada pela adição da letra S (Smith) ao nome da fração original.

3.7.3. TRATAMENTO ALCALINO

3.7.3.1. METODO PREPARATIVO

As frações polissacarídicas foram solubilizadas em água destilada (0,2 g%) e reduzidas com boroidreto de sódio (NaBH_4 - 10% em massa do polissacarídeo) por 16 h. Adicionou-se então hidróxido de sódio 3M, para a concentração final 1M e novamente adicionou-se NaBH_4 (5% em massa). As soluções foram então mantidas a temperatura de 80°C em banho termostaticado por 2 horas (NOSEDA; CEREZO, 1995), sendo em seguida neutralizadas com ácido clorídrico fumegante, dializadas e liofilizadas. As frações quimicamente modificadas assim obtidas foram identificadas pela adição das letras TA (tratamento alcalino) ao nome das frações originais.

3.7.3.2. METODO ANALÍTICO

A amostra polissacarídica foi solubilizada em água destilada (0,2 g%) e reduzidas com NaBH_4 (10% em massa) por 14 horas, alíquotas de 0,5 ml destas

soluções foram separadas em *viais* e a cada uma delas foi adicionado 0,25 ml de hidróxido de sódio 3M (10 ml com 5% de NaBH₄). Os *viais* foram mantidos sob diferentes temperaturas (50, 60, 70 e 80°C) em banho termostaticado e retirados um a um em intervalos regulares sendo então neutralizados com HCl diluído (5:1) como descrito por CIANCIA et al. (1993). Para cada uma destas soluções foi determinado o teor de 3,6-anidrogactose formado utilizando o método do resorcinol (como descrito no item 3.5.4).

3.7.4. HIDRÓLISE REDUTIVA ÁCIDA PARCIAL – OBTENÇÃO DE OLIGOSSACARÍDEOS

Para obtenção de oligossacarídeos, a fração polissacarídica foi submetida à hidrólise reductiva ácida parcial de acordo com USOV e ELASHVILI (1991). O polissacarídeo foi inicialmente dissolvido em água (1,3 g%) e a solução aquecida à 60°C para a completa solubilização. O complexo 4-metil morfolina borano foi acrescentado (9 g%) seguido por TFA 2M e a mistura foi mantida à 65°C por 8 horas. Após resfriamento a solução foi dialisada contra água destilada e liofilizada. A fração oligossacarídica assim obtida foi identificada pela adição da sigla HP (hidrólise parcial) ao nome da fração original.

3.8. ANÁLISE DE METILAÇÃO

As amostras contendo polissacarídeos sulfatados a serem metiladas foram inicialmente reduzidas com boridreto de sódio (NaBH₄) e dialisadas contra solução de trietilamina 5% (10ml), visando-se obter após liofilização, polissacarídeos sulfatados, na forma de sal de trietilamônio, solúveis no solvente aprótico dimetil sulfóxido (STEVENSON e FURNEAUX, 1991).

Os polissacarídeos sulfatados na forma de sal de trietilamônio foram metilados de acordo com o método de CIUCANU e KEREK (1984), utilizando-se iodeto de metila (ICH₃) e hidróxido de sódio pulverizado. O material metilado foi então neutralizado, dialisado, liofilizado, hidrolisado e analisado por CLG e CG-EM na forma de alditóis acetilados.

As frações contendo polissacarídeos neutros foram metiladas de acordo com o método descrito por HAWORTH (1915). Para tanto o material foi previamente reduzido com NaBH_4 por aproximadamente 14 horas, dialisado contra água destilada e liofilizado. O material reduzido foi então dissolvido em hidróxido de sódio 33 % e mantido sob agitação constante a temperatura ambiente. A cada 30 minutos adicionou-se o agente metilante $(\text{CH}_3)_2\text{SO}_4$ e a cada 1 hora mais NaOH 33%, até completar-se 4 horas. O processo foi então interrompido por adição de água destilada e neutralizado com ácido acético (45 %). A solução neutralizada foi então dialisada e liofilizada antes de sofrer um novo processo de metilação, agora porém, de acordo com o método de CIUCANU; KEREK (1984). O material parcialmente metilado foi redissolvido em DMSO (1 %pv), NaOH seco e ICH_3 foram adicionados e a solução mantida sob forte agitação durante 30 minutos. A reação foi então interrompida com adição de água, neutralizada com ácido acético, dialisada e liofilizada.

3.9. MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

3.9.1. CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA EM DEAE-SEPHACEL

Para fracionamento dos polissacarídeos sulfatados de interesse, as frações foram submetidas a cromatografia de troca-iônica em coluna de DEAE-SEPHACEL (32x10 cm, $V_t = 500$ ml) utilizando-se água destilada como eluente e concentrações crescentes de cloreto de sódio (NaCl 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e 4,0M). A eluição foi monitorada pelo método do fenol-ácido sulfúrico descrito no item 3.5.1 (DUBOIS et al., 1956). As sub-frações polissacarídicas assim obtidas foram identificadas pela adição da concentração de NaCl , na qual eluiu, ao nome da fração original.

3.9.2. CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA EM DEAE-SEPHAROSE CL-6B

A mistura de oligossacarídeos obtida como produto de hidrólise reductiva ácida parcial foi fracionada por cromatografia de troca-iônica em coluna de DEAE-SEPHAROSE CL-6B (12x3 cm, $V_t = 100$ ml) utilizando-se água destilada como eluente e concentrações crescentes de cloreto de sódio (NaCl 0,1; 0,25; 0,5; 1,0 e

2,0 M). A eluição foi monitorada pelo método do fenol-ácido sulfúrico descrito no item 3.5.1 (DUBOIS et al., 1956). As sub-frações oligossacarídicas assim obtidas foram identificadas pela adição da concentração de NaCl, na qual eluiu, ao nome da fração original.

3.9.3 CROMATOGRAFIA LÍQUIDO-GASOSA (CLG)

As análises por cromatografia líquido-gasosa (CLG) foram realizadas em Cromatógrafo Hewlett Packard 5890, com detector de ionização de chama (300°C) e injetor (250°C), utilizando nitrogênio como gás de arraste e coluna capilar de sílica fundida (30 m x 0,25 mm de d. i.), revestida com DB-225 (0,25 µm) em diferentes temperaturas: as análises cromatográficas para acetatos de alditol foram realizadas à 220°C e para acetatos de alditol parcialmente metilados à 210°C.

3.9.4. CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSA (CG-EM)

As análises de CG-EM foram realizadas em cromatógrafo a gás "Varian", modelo 3.300, equipado com coluna capilar de sílica fundida (30 m x 0,25 mm d.i.) e fase estacionária DB-225. acoplado a espectrômetro de massa da marca Finnigan Mat, modelo ITD 800. As injeções no cromatógrafo foram feitas mantendo-se a temperatura inicial em 50°C, seguido de aumento de acordo com a programação de temperatura em um gradiente de 40°C min⁻¹ até 230°C, mantendo-se constante a partir deste valor, utilizando-se o gás hélio como gás de arraste, com fluxo de 1 ml.min⁻¹. As áreas dos picos de interesse foram determinadas por integração em *software* do equipamento. Os espectros de massa foram obtidos por impacto de elétrons a 70 meV, repetidamente a cada 1/8 de segundo, de m/e 90 a 220. Este método foi utilizado para a identificação dos acetatos de alditol e acetatos de alditol parcialmente metilados por meio dos seus tempos de retenção e perfis característicos de fragmentação por impacto de elétrons (JANSSON et al., 1976).

3.9.5. CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO ESTÉRICA DE ALTA PRESSÃO (HPSEC) ACOPLADA A DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO DIFERENCIAL E ESPALHAMENTO DE LUZ EM MULTIÂNGULOS (MALLS)

Estas análises foram realizadas em cromatógrafo de exclusão estérica de alta pressão (HPSEC) WATERS, equipado com detector de índice de refração diferencial WATERS modelo 2410 e com detector de espalhamento de luz em multiângulos (MALLS) WAYTT TECHNOLOGY modelo DAWN DSP com 18 detectores dispostos ao redor da fotocélula em diferentes ângulos. Foram utilizadas 4 colunas de gel permeação WATERS, com limites de exclusão de 1.10^6 , 4.10^5 , 8.10^4 e 5.10^3 , em série. O eluente utilizado foi uma solução de NaNO_3 $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ contendo azida de sódio 200 ppm, pressão de 920 psi a 20°C .

3.9.5.1. ANÁLISE DE HOMOGENEIDADE

Para a análise de homogeneidade foram preparadas soluções de 2 mg das amostras de interesse, em 1 ml de nitrito de sódio (NaNO_3 0,1M) e azida de sódio (200 ppm) dissolvidas em água MQ e filtradas em membranas millipore (acetato de celulose) de 0,45 e 0,22 μm . As análises foram realizadas utilizando-se 500 μl de solução em HPLC acoplado a espalhamento de luz, com fluxo de 0,6 ml/min.

3.10. MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS

3.10.1. ANÁLISES DE INFRAVERMELHO

As análises de infravermelho foram realizadas em espectrômetro Perkin-Elmer Series 2000, incorporando a transformada de Fourier. As amostras foram homogeneizadas com brometo de potássio (2 mg de polissacarídeo / 100 mg de KBr) e prensadas para serem alisadas na forma de pastilhas. Estas análises foram realizadas no Departamento de Química da UFPR.

3.10.2. RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

As análises de ressonância magnética nuclear (RMN) foram realizadas em espectroscópio da marca BRUKER, modelo DRX 400, série Avance, em probe de diâmetro externo de 5 mm ou 10 mm, com as amostras dissolvidas em água deuterada (D₂O), a temperatura de 30, 50 ou 80 °C. Os deslocamentos químicos, expressos em ppm, foram determinados utilizando acetona como padrão interno tanto para as análises de ¹³C (30,20 ppm) como para ¹H (2,224 ppm).

3.10.2.1. RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE CARBONO-13 (RMN - ¹³C)

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

3.10.2.2. 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 completa das moléculas de água presentes, através da dissolução das frações em D₂O, congelamento e liofilização (este processo foi repetido no mínimo por 3 vezes), com a finalidade de diminuir a intensidade do sinal relativo ao hidrogênio ligado à oxigênio, o qual prejudica a qualidade do espectro obtido.

3.10.2.3. HMQC (HETERONUCLEAR MULTIPLE QUANTUM CORRELATION SPECTROSCOPY)

Esta técnica heteronuclear, permite determinar quais átomos de hidrogênio (¹H) estão ligados a quais átomos de carbono (¹³C) através de suas correlações obtidas no espectro, a partir de sinais de ¹³C conhecidos ou de ¹H já conhecidos.

3.11. ESTUDO CINÉTICO DA REAÇÃO DE CICLIZAÇÃO

Com os valores de absorvância obtidos a partir do acompanhamento do tratamento alcalino - método analítico pela dosagem do teor de 3,6-anidrogactose, aplicados a fórmula:

$$\ln(A_0 - A_\infty / A_t - A_\infty)$$

onde a diferença entre a absorvância inicial (A_0 - zero minuto) e a absorvância a tempo infinito (A_∞) indica a concentração inicial de unidades reacionantes (unidades precursoras de galactose 6-sulfato) e a diferença entre a absorvância a tempo t (A_t) e a absorvância a tempo infinito indica a concentração de unidades que a tempo t ainda não reacionaram, foi possível calcular a constante de velocidade da reação (k). Esta constante é representada pela pendente da reta obtida através da plotagem dos valores obtidos pela equação (eixo Y) em função do tempo (eixo X). A partir desta constante foi possível determinar o tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) através da equação $t_{1/2} = \ln 2 / k$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DOS POLISSACARÍDEOS NEUTROS E SULFATADOS ISOLADOS DE ALGAS VERMELHAS

As algas vermelhas *Galaxaura marginata*, *G. obtusata*, *Tricleocarpa cylindrica*, *T. fragilis*, *Scinaia halliae* e *Palmaria palmata* foram submetidas ao mesmo procedimento de extração. O material seco e moído foi submetido à extração aquosa (5g% p/v) a quente (80°C, 4 horas). Após centrifugação, o sobrenadante foi tratado com etanol absoluto (3 volumes) precipitando os polissacarídeos presentes. A partir deste procedimento, extratos polissacarídicos brutos foram obtidos sendo denominados de GM, GO, TC, TF, SH e PP, fazendo-se referencia ao nome da alga a partir da qual foram obtidos (*G. marginata*, *G. obtusata*, *T. cylindrica*, *T. fragilis*, *S. halliae* e *Palmaria palmata*, respectivamente).

Como é descrito na literatura, as algas vermelhas pertencentes às ordens Nemaliales e Palmariales caracterizam-se por biossintetizarem polissacarídeos quimicamente distintos daqueles sintetizados pela maior parte das ordens de Rhodophyta (USOV, 1984; COLE; SHEATH, 1990; MILLER 1997; CHOPIN et al., 1999). Nestas ordens, polímeros estruturalmente diferentes, como xilanas neutras, mananas, xilomananas e xilogalactanas sulfatadas podem ocorrer simultaneamente numa mesma espécie de alga (HAINES et al., 1990; MATULEWICZ et al., 1994; KOLENDER et al., 1997; MILLER 1997; CHOPIN et al., 1999).

Assim, visando promover a separação entre polissacarídeos neutros e sulfatados que poderiam estar presentes conjuntamente nos extratos GM, GO, TC, TF, SH e PP, os mesmos foram tratadas com Cetavlon, uma base de amônio quaternário capaz de se complexar com polímeros dotados de carga negativa, promovendo a precipitação destes sem afetar a solubilidade de polímeros neutros que possam ocorrer simultaneamente numa mesma fração.

A formação de material precipitado (complexo polissacarídeo sulfatado - cetavlon) foi observado em todas as seis frações e após tratamento com NaCl 4M (para descomplexação) e precipitação com etanol absoluto, foram obtidas as frações polissacarídicas GMp (3,17 %), GOp (nd), TCp (0,77 %), TFp (1,73 %), SHp (5,10 %) e Ppp (3,25 %), como mostrado na FIGURA 11. Outras seis frações denominadas

GMs (0,51 %), GOs (18,0 %), TCs (0,24 %), TFs (0,30 %), SHs (0,38 %) e PPs (15,0 %), foram obtidas a partir do sobrenadante resultante do tratamento com cetavlon após precipitação com etanol 3 volumes (FIGURA 11).

As características gerais das 12 frações obtidas após esta metodologia, bem como suas composições monossacarídicas podem ser observadas nas TABELAS 2 e 3.

FIGURA 11 - EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS DAS ALGAS *G. marginata*, *G. obtusata*, *T. cylindrica*, *T. fragilis*, *S. halliae* e *P. palmata*.

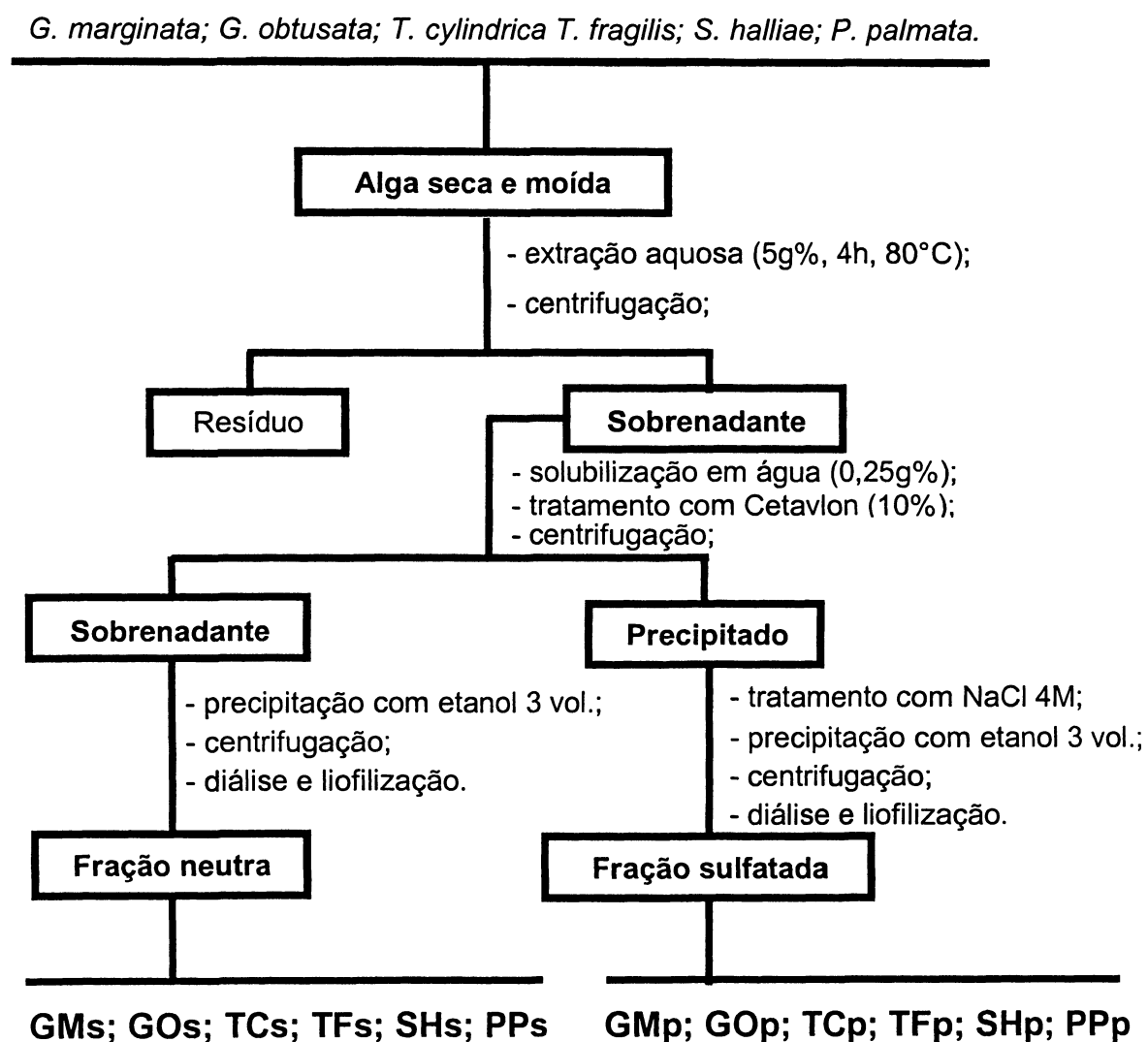


TABELA 2 - CARACTERÍSTICAS DAS FRAÇÕES NEUTRAS (S) E SULFATADAS (P) OBTIDAS APÓS TRATAMENTO COM CETAVLON.

ALGA	FRAÇÃO	RENDIMENTO (%) ^A	AÇÚCAR TOTAL (%) ^B	SULFATO (%) ^C	PROTEÍNA (%) ^D	[α_D^{25}] (°) ^E
<i>G. marginata</i>	GMs	0,51	51,6	2,8	9,0	-51,5
	GMp	3,17	54,0	10,5	2,3	+19,5
<i>G. obtusata</i>	GOs	18,0	72,7	5,0	14,0	-58,6
	GOp	- ^f	54,9	8,8	2,5	+16,5
<i>T. cylindrica</i>	TCs	0,24	67,4	2,5	3,9	-61,0
	TCp	0,77	36,3	30,3	4,3	+22,5
<i>T. fragilis</i>	TFs	0,30	53,9	2,5	22,0	-20,5
	TFp	1,73	40,5	25,0	7,0	+29,0
<i>S. halliae</i>	SHs	0,38	-	10,4	-	-
	SHp	5,10	57,0	19,7	3,2	+30,0
<i>P. palmata</i>	PPs	15,0	80,6	1,6	2,3	-44,0
	PPp	3,25	49,5	3,2	7,7	-47,5

^a em relação à massa submetida à extração aquosa (*G. marginata* - 58,0g; *G. obtusata* - 4,2g; *T. cylindrica* - 9,4g; *T. fragilis* - 70,0g; *S. halliae* - 5,6g; *P. palmata* - 68,0g); ^b segundo DUBOIS et al. (1956) utilizando manose e xilose como padrões; ^c segundo DODGSON; PRICE (1961), expresso como NaSO₃; ^d segundo LOWRY et al. (1951), utilizando BSA como padrão; ^e rotação óptica específica dos polissacarídeos dissolvidos em água (0,2g%); ^f não determinado.

TABELA 3 - COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES NEUTRAS (S) E SULFATADAS (P) OBTIDAS MEDIANTE TRATAMENTO COM CETAVLON.

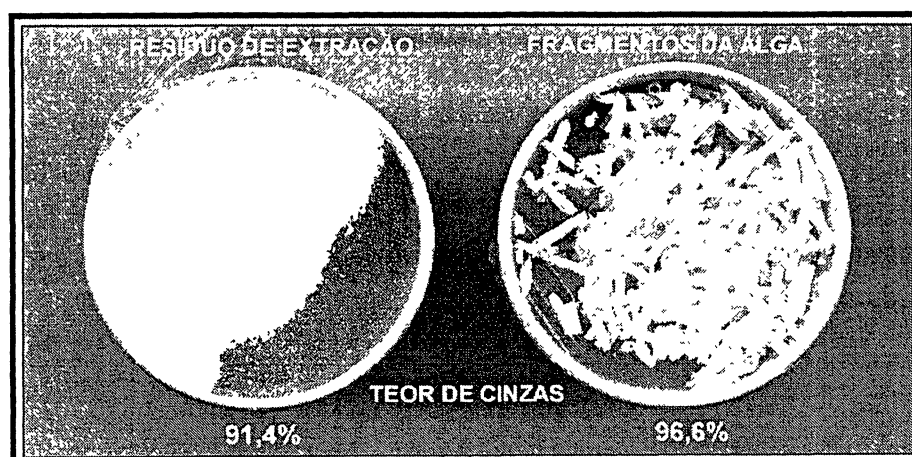
FRAÇÃO	COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA (mol%)*				
	4-O-metil xilose	xilose	manose	galactose	glucose
GMs	0,9	89,9	4,2	2,0	3,0
GMp	0,0	36,2	53,3	9,0	1,5
GOs	1,5	92,0	1,6	4,0	0,9
GOp	6,4	38,2	42,7	9,9	2,8
TCs	1,2	92,9	2,0	1,6	2,3
TCp	2,3	25,6	65,6	2,9	3,6
TFs	0,6	77,6	4,5	3,3	14,0
TFp	15,8	21,1	54,8	6,5	1,8
SHs	2,4	84,0	6,7	2,3	4,6
SHp	2,5	19,6	53,1	16,5	8,2
PPs	- ^a	83,6	-	-	16,4
PPp	-	53,7	-	35,2	11,1

* determinada mediante hidrólise ácida total (TFA 2M, 121°C, 90'), na forma de alditóis acetatos, por CLG e CG-EM; ^a não detectado.

Como mostrado na TABELA 2, todas as algas pertencentes à ordem Nemaliales, exceto *G. obtusata*, renderam frações que apresentaram baixos rendimentos (0,24 – 3,17 %). Estes baixos valores obtidos podem ser atribuídos a uma característica desta ordem, a impregnação do tecido vegetal por carbonato de cálcio (MU; RIDING, 1999; COLE; SHEATH, 1990). O grau de calcificação pode variar de espécie para espécie e tem o espaço intercelular como principal sítio de deposição (MU; RIDING, 1999; OKAZAKI et al., 1982). Para a alga *T. fragilis*, por exemplo, o material inorgânico (na forma de carbonato de cálcio) representou 96,6 % do peso seco, como determinado por dosagem do teor de cinzas, a partir de fragmentos da alga e do resíduo final de extração (FIGURA 12).

A TABELA 2 mostra também que todas as frações obtidas por precipitação com cetavlon são ricas em grupos sulfato (8,8 – 30,3%), exceto PPp (3,2 %). As frações solúveis em Cetavlon, apresentaram baixas percentagens de grupos sulfato (1,6 – 5,0%), exceto a fração TFs (10,4%). A mesma TABELA ainda mostra a presença de proteínas nas 11 frações dosadas (2,3 – 9,0%), atingindo valores de maior relevância para as frações GOs e TFs (14,0 e 22,0%, respectivamente).

FIGURA 12 - TEOR DE CINZAS DE FRAGMENTOS DA ALGA E DO RESÍDUO FINAL APÓS EXTRAÇÃO AQUOSA DA ALGA *Tricleocarpa fragilis*.



Para a determinação da composição monossacarídica, as frações foram submetidas à hidrólise ácida total utilizando TFA 2M (121°C, 90'). A análise dos hidrolisados na forma de alditóis acetatos por cromatografia líquido-gasosa (CLG) e cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-MS), revelou que todas as 12 frações eram constituídas pelas mesmas unidades monossacarídicas: 4-O-metil xilose (identificada mediante redução com NaBD₄), xilose, manose, galactose e glucose.

Para as frações precipitadas com Cetavlon foram observados altos teores das seguintes unidades monossacarídicas: manose (42,7 – 65,6 mol%) e xilose (21,1 – 53,7 mol%), como pode ser observado na TABELA 3. Porém, a fração TFp ainda apresentou teores relevantes de 4-O-metil xilose (15,8 mol%), enquanto que a fração Pp apresentou de galactose (35,2 mol%). Os monossacarídeos xilose, manose e galactose são comumente encontrados em frações contendo polissacarídeos sulfatados isoladas de algas vermelhas, ao contrario do monossacarídeo 4-O-metil xilose.

Esta pentose mono metilada não foi anteriormente observada entre os produtos de hidrólise das frações isoladas de algas das ordens Nemaliales (USOV, 1981; MATULEWICZ; CERESO, 1987¹; HAINES et al., 1990; MATULEWICZ et al., 1994; KOLENDER et al., 1995; 1997) ou Palmariales (LAHAYE et al., 1993; DENIAUD et al., 2003; LAHAYE et al., 2003), mas já foi encontrada em espécies do gênero *Curdiea* (Gracilariales – FALSHAW et al., 1998), porém nunca em teor tão elevado como o relatado na fração TFp.

A identificação da galactose como o segundo monossacarídeo majoritário da fração Pp esta de acordo com o esperado para representantes da ordem Palmariales, os quais caracterizam-se por biossintetizarem principalmente xilanas neutras mas também xilogalactanas como componentes minoritários (MILLER, 1997; CHOPIN et al., 1999).

As frações solúveis em Cetavlon, por sua vez, se mostraram majoritariamente compostas por unidades de xilose (77,6 a 92,9 mol%).

Glucose se mostrou como o segundo monossacarídeo de maior percentagem para as frações TFs e PPs, 14,0 e 16,4 mol% respectivamente (TABELA 3). A presença de glucose entre os produtos de hidrólise de frações polissacarídicas obtidas a partir de algas vermelhas é comum e pode ser atribuída a presença de

amido das florídeas, o polissacarídeo de reserva das algas vermelhas (MILLER, 1997; KNUTSEN; GRASDALEN, 1987). Por ser neutro, este polissacarídeo pode ter permanecido no sobrenadante durante o processo de precipitação das frações com Cetavlon. Os demais monossacarídeos presentes nestas frações se encontram em baixas percentagens (TABELA 3) e provavelmente provêm de contaminação pelos polissacarídeos sulfatados.

A TABELA 2 mostra que valores positivos de polarimetria foram observados para as frações precipitadas (+16,5° até +30,0°), enquanto que para as solúveis observou-se valores negativos (-20,5° até -58,6°). Tais valores sugerem que as unidades de manose, predominantes nas frações precipitadas, apresentam configuração α , enquanto que as unidades de xilose, predominantes nas frações solúveis, apresentam configuração β .

Desta maneira, pode-se sugerir que as frações solúveis em Cetavlon (GMs, GOs, TCs, TFs, SHs e PPs) são constituídas por xilanas neutras enquanto que as cinco frações precipitadas com Cetavlon (GMp, GOp, TCp, TFp e SHp) são constituídas por xilomananas sulfatadas e a fração PPs por uma galactoxilana ou por uma mistura de uma xilana e uma xilomanana .

4.1.1. ESTRUTURA DAS XILANAS PRESENTES NAS FRAÇÕES SOLÚVEIS

Visando elucidar a estrutura química fina das xilanas constituintes das frações solúveis isoladas das algas *Galaxaura marginata*, *G. obtusata*, *Tricleocarpa cylindrica*, *T. fragilis*, *Scinaia halliae* e *Palmaria palmata* foram realizadas análises de ressonância magnética nuclear de C^{13} e H^1 .

Os espectros de C^{13} obtidos para todas as seis frações se mostraram extremamente similares, cada um contendo um total de onze sinais, destes, cinco de maior intensidade e seis de menor intensidade (FIGURA 13).

Na região anomérica dos espectros, foram observados dois sinais, um apresentado baixa intensidade, em 103,1 - 103,2 ppm, e o outro apresentando maior intensidade, em 101,6 ppm (TABELA 4). Estes sinais foram, respectivamente, atribuídos aos carbonos anoméricos (C-1) de unidades de β -D-xilopiranosose-(1 \rightarrow 3) e -(1 \rightarrow 4) ligadas (USOV et al., 1981; MATULEWICZ et al., 1992; LAHAYE, et al., 1993; DENIAUD, et al., 2003).

De maneira mais detalhada, o sinal de menor intensidade (103,1 ppm) refere-se ao C-1 das unidades de xilopiranosose glicosiladas em C-4, que na cadeia polissacarídica, substituem outra unidade de xilopiranosose em carbono 3 (TABELA 4 e FIGURA 14). O sinal de maior intensidade (101,6 ppm), por sua vez, é simultaneamente referente ao C-1 das unidades de xilopiranosose que se encontrem glicosiladas em C-3 ou em C-4 mas que na cadeia polissacarídica estejam substituindo o carbono 4 de outra unidade de xilopiranosose (TABELA 4). Na FIGURA 11 o espectro obtido para a xilana constituinte da fração GMs é utilizado para exemplificar os assinalamentos acima descritos.

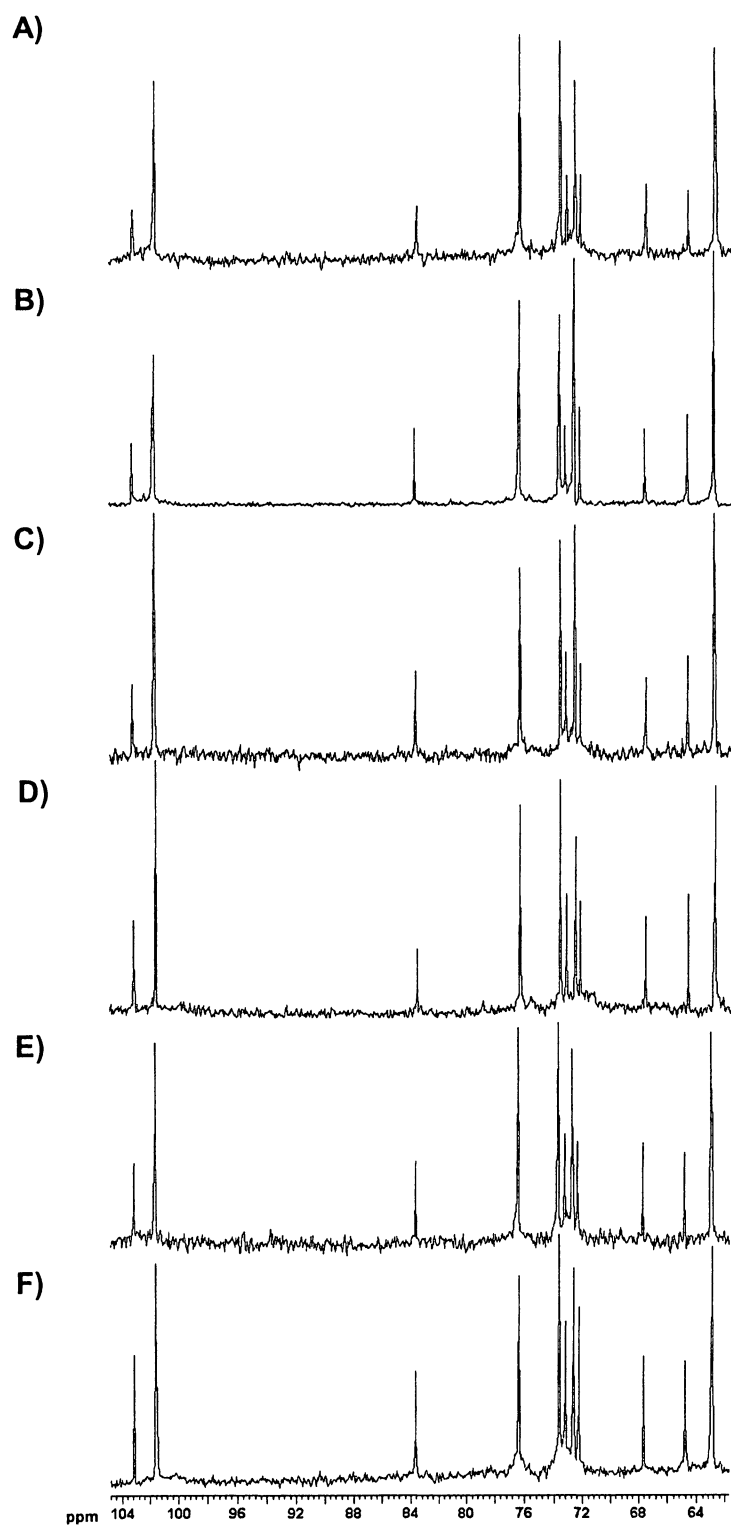
Como mencionado anteriormente, dois tipos distintos de xilanas podem ser isolados a partir de algas vermelhas: as que apresentam apenas um tipo de ligação glicosídica na cadeia polissacarídica (β -(1 \rightarrow 3) ou β -(1 \rightarrow 4)), e aquelas com ambas as ligações, sendo estas denominada mistas (FIGURA 4 - KLOAREG; QUATRANO, 1988; MATULEWICZ et al., 1992; BALDAN et al., 1995; LAHAYE et al., 2003). Desta maneira, a ocorrência dos dois sinais anoméricos nos espectros das seis frações solúveis, evidenciou que seus polissacarídeos constituintes eram xilanas do tipo mista.

Outros dois sinais, localizados entre 83,6 e 83,8, e 73,7 e 73,7 ppm observados nestes espectros (TABELA 4), foram atribuídos aos carbonos 3 e 4 glicosilados das unidades de β -D-xilopiranosose, respectivamente (USOV et al., 1981; MATULEWICZ et al., 1992; LAHAYE, et al., 1993; DENIAUD, et al., 2003) e confirmaram o caráter misto destas xilanas (FIGURA 14).

Ainda, como consequência deste padrão de substituição, três sinais variando entre 73,2 a 73,3, 72,3 a 72,4 e 72,6 a 72,7 ppm (TABELA 4), foram identificados nos espectros das frações e se mostraram referentes ao carbono 2 das unidades de β -D-xilopiranosose quando glicosilada em C-4 e glicosilando outra unidade em C-3, quando glicosilada em C-3 e glicosilando em C-4 e quando glicosilada e glicosilando em C-4, respectivamente (MATULEWICZ et al., 1992; LAHAYE, et al., 1993; DENIAUD, et al., 2003).

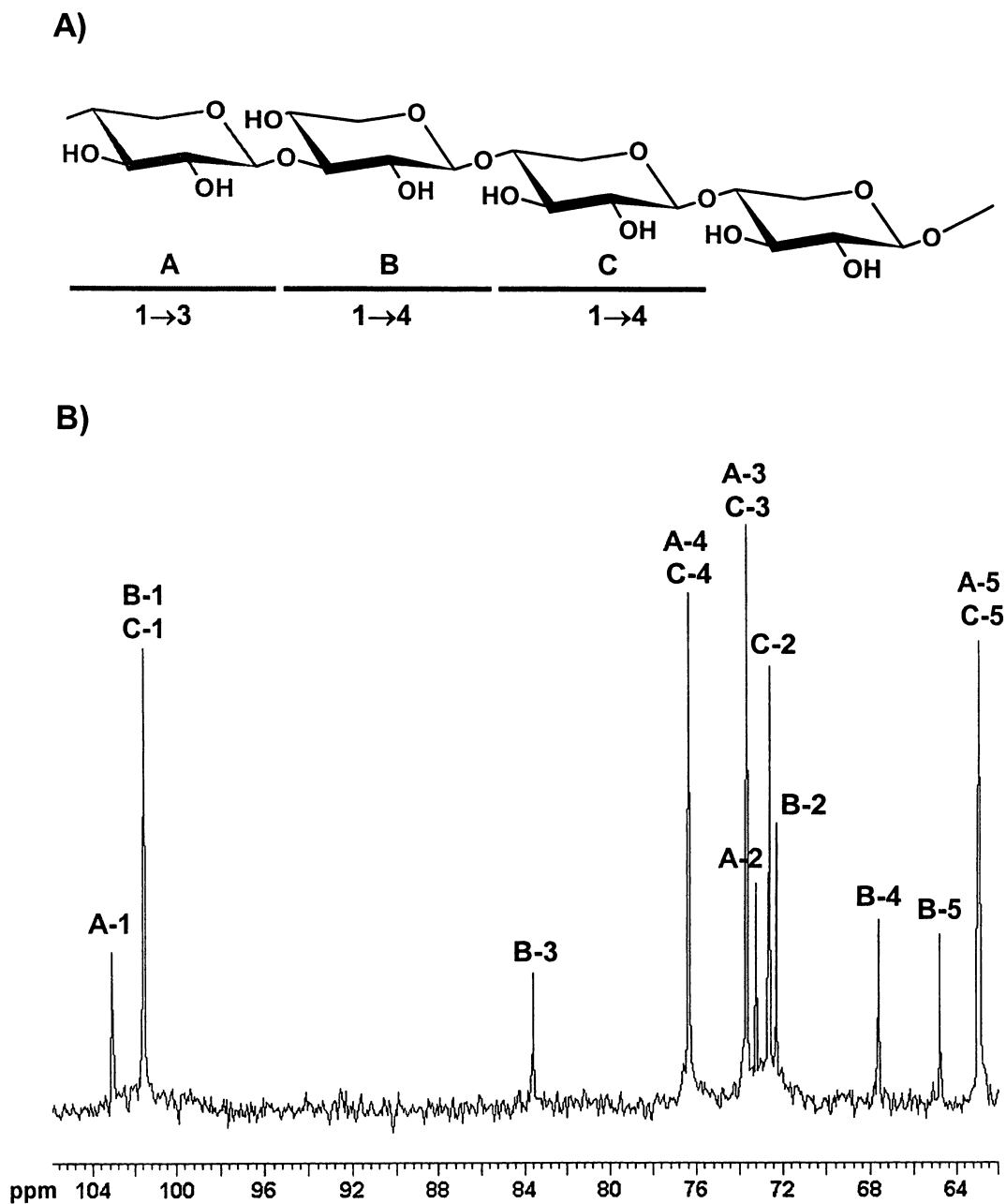
Os assinalamentos completos das unidades de β -D-xilopiranosose, sob cada padrão de substituição são dados na TABELA 2 e mostraram sofrer influência somente da glicosilação da unidade de xilose analisada (FIGURA 14).

FIGURA 13 - ESPECTROS DE RMN DE C^{13} * DAS XILANAS CONSTITUINTES DAS FRAÇÕES SOLÚVEIS GMs (A), GOs (B), TCs (C), TFs (D), SHs (E) e PPs (F).



* experimento realizado à 50 °C, com os polissacarídeos dissolvidos em D_2O .

FIGURA 14 – PADRÃO DE SUBSTITUIÇÃO APRESENTADO PELA XILANA GMs (A) E SEU ESPECTRO DE RMN DE C¹³ (B).



as letras correspondem as unidades: $\rightarrow 4$)- β -D-xilopiranosse-(1 \rightarrow 3)- (A), $\rightarrow 3$)- β -D-xilopiranosse-(1 \rightarrow 4)- (B) e $\rightarrow 4$)- β -D-xilopiranosse-(1 \rightarrow 4)- (C); os números são referentes aos carbonos identificados.

TABELA 4 - ASSINALAMENTOS QUÍMICOS ATRIBUÍDOS AOS CARBONOS DAS UNIDADES DE β -D-XILOPIRANOSE CONSTITUINTES DAS XILANAS MISTAS (FRAÇÕES SOLÚVEIS).

FRAÇÃO*	UNIDADE	DESLOCAMENTO QUÍMICO (ppm)**				
		C-1	C-2	C-3	C-4	C-5
GMs	$\rightarrow 4$)- β -Xilp-(1 \rightarrow 3)- ¹	103,1	73,3	73,7	76,4	63,0
	$\rightarrow 3$)- β -Xilp-(1 \rightarrow 4)- ²	101,6	72,4	83,7	67,7	64,8
	$\rightarrow 4$)- β -Xilp-(1 \rightarrow 4)- ³	101,6	72,7	73,7	76,4	63,0
GOs	$\rightarrow 4$)- β -Xilp-(1 \rightarrow 3)-	103,1	73,3	73,7	76,4	63,0
	$\rightarrow 3$)- β -Xilp-(1 \rightarrow 4)-	101,6	72,3	83,7	67,7	64,8
	$\rightarrow 4$)- β -Xilp-(1 \rightarrow 4)-	101,6	72,7	73,7	76,4	63,0
TCs	$\rightarrow 4$)- β -Xilp-(1 \rightarrow 3)-	103,2	73,3	73,7	76,4	62,9
	$\rightarrow 3$)- β -Xilp-(1 \rightarrow 4)-	101,6	72,4	83,6	67,7	64,8
	$\rightarrow 4$)- β -Xilp-(1 \rightarrow 4)-	101,6	72,7	73,7	76,4	62,9
TFs	$\rightarrow 4$)- β -Xilp-(1 \rightarrow 3)-	103,1	73,2	73,7	76,4	63,0
	$\rightarrow 3$)- β -Xilp-(1 \rightarrow 4)-	101,6	72,3	83,7	67,7	64,8
	$\rightarrow 4$)- β -Xilp-(1 \rightarrow 4)-	101,6	72,6	73,7	76,4	63,0
SHs	$\rightarrow 4$)- β -Xilp-(1 \rightarrow 3)-	103,2	73,3	73,7	76,4	63,0
	$\rightarrow 3$)- β -Xilp-(1 \rightarrow 4)-	101,6	72,4	83,6	67,7	64,8
	$\rightarrow 4$)- β -Xilp-(1 \rightarrow 4)-	101,6	72,7	73,7	76,4	63,0
PPs	$\rightarrow 4$)- β -Xilp-(1 \rightarrow 3)-	103,2	73,3	73,7	76,4	63,0
	$\rightarrow 3$)- β -Xilp-(1 \rightarrow 4)-	101,6	72,3	83,8	67,7	64,8
	$\rightarrow 4$)- β -Xilp-(1 \rightarrow 4)-	101,6	72,7	73,7	76,4	63,0

* frações solúveis em cetavlon isoladas das algas *G. marginata* (GMs), *G. obtusata* (GOs), *T. cylindrica* (TCs), *T. fragilis* (TFs), *S. halliae* (SHs) e *P. palmata* (PPs); ¹ $\rightarrow 4$)- β -D-xilopiranoose-(1 \rightarrow 3)-, ⁰ $\rightarrow 3$)- β -D-xilopiranoose-(1 \rightarrow 4)-, ³ $\rightarrow 4$)- β -D-xilopiranoose-(1 \rightarrow 4)-; ** δ referente ao padrão interno acetona em 32,20 ppm para C¹³, de acordo com USOV et al. (1981); MATULEWICZ et al. (1992); LAHAYE et al. (1993) e DENIAUD et al. (2003).

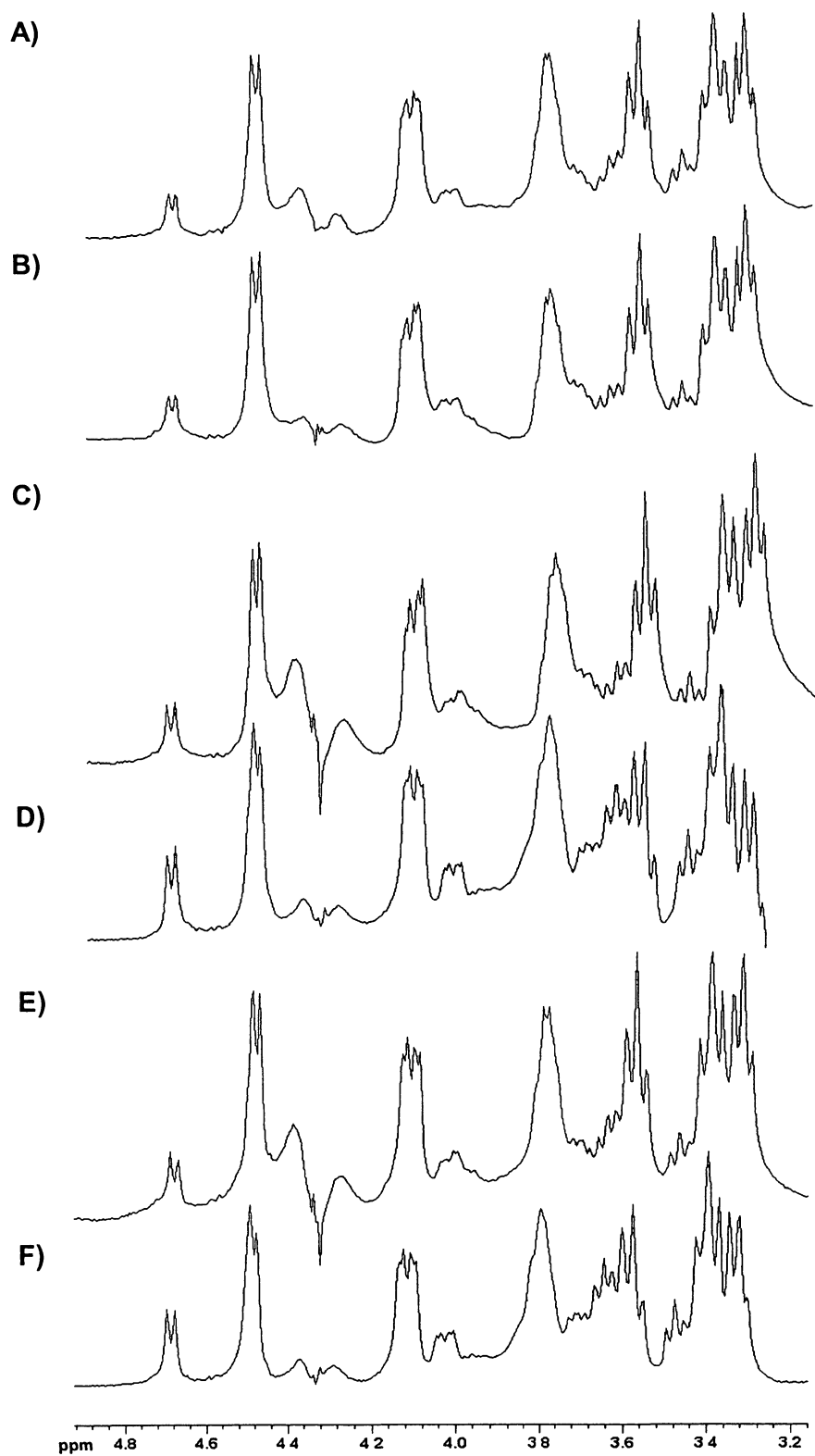
Análises de RMN de H^1 também foram realizadas e os espectros obtidos para as frações solúveis, da mesma forma que observado para os de C^{13} , se mostraram muito similares (FIGURA 15).

Na região anomérica destes espectros, foram observados dois sinais, um de baixa intensidade, em 4,68 - 4,69 ppm, e outro de maior intensidade em 4,48 ppm, para todas as frações (TABELA 5).

Estes sinais foram atribuídos aos prótons anoméricos (H-1) de unidades de β -D-xilopiranosose-(1 \rightarrow 3) e -(1 \rightarrow 4) ligadas, respectivamente (LAHAYE, et al., 1993; DENIAUD, et al., 2003 – FIGURA 16) e se apresentaram como dupletes, o que permitiu determinar o valor da constante de acoplamento para o H-1 das unidades de xilopiranosose -(1 \rightarrow 3) e -(1 \rightarrow 4) ligadas (TABELA 5). Estes valores permaneceram entre 7,4 – 7,6 e 6,8 – 7,5 Hz, respectivamente, confirmando que as unidades de xilopiranosose constituintes destes polissacarídeos se encontravam como seus anômeros β , uma vez que a configuração α apresenta uma constante em torno de 3,6 Hz (NERINCKX et al., 2004).

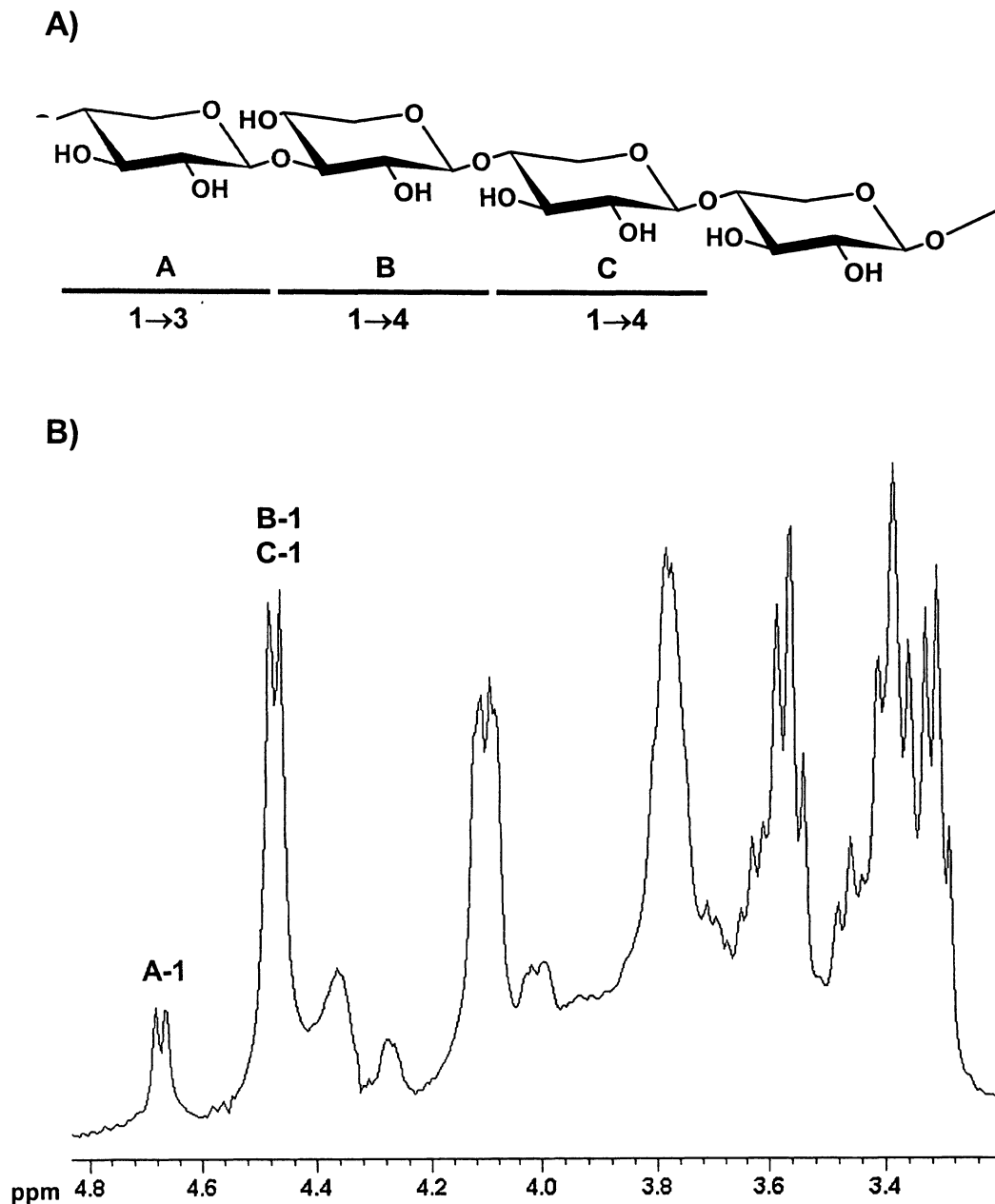
A integração destes sinais permitiu estabelecer uma razão entre as unidades com ligações 1 \rightarrow 3 e 1 \rightarrow 4 (TABELA 5), mostrando que em todas as frações existem no mínimo três unidades de xilose com ligação 1 \rightarrow 4 para cada unidade com ligação 1 \rightarrow 3.

FIGURA 15 - ESPECTROS DE RMN DE H¹* DAS XILANAS CONSTITUINTES DAS FRAÇÕES SOLÚVEIS GMs (A), GOs (B), TCs (C), TFs (D), SHs (E) e PPs (F).



experimento realizado à 50 °C, com os polissacarídeos dissolvidos em D₂O.

FIGURA 16 – PADRÃO DE SUBSTITUIÇÃO DA XILANA GMs (A) E SEU ESPECTRO DE RMN DE H^1 (B).



as letras correspondem as unidades: \rightarrow 4)- β -D-xilopiranosse-(1 \rightarrow 3)- (A), \rightarrow 3)- β -D-xilopiranosse-(1 \rightarrow 4)- (B) e \rightarrow 4)- β -D-xilopiranosse-(1 \rightarrow 4)- (C); os números são referentes aos prótons identificados.

Uma vez identificados os prótons anoméricos de cada unidade constituinte das xilanas, a fração, de maior rendimento, GOs foi submetida à análise bidimensional de RMN HMQC, visando por este método identificar os sinais referentes aos demais prótons de cada unidade monossacarídica.

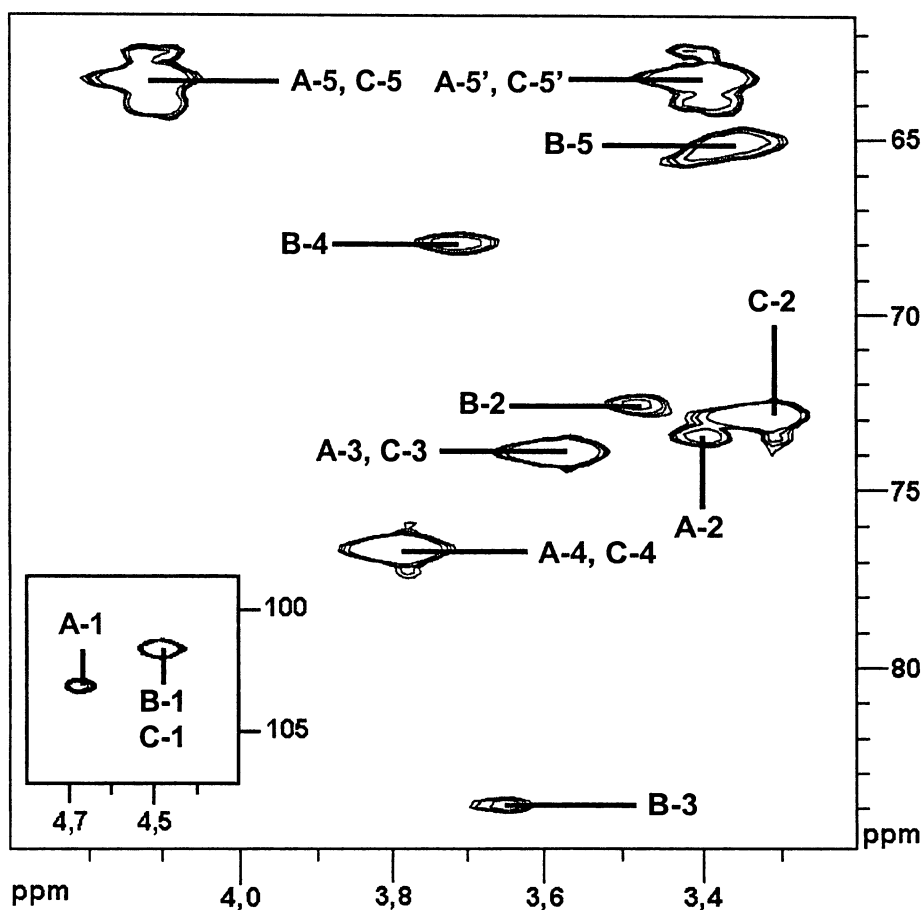
No espectro obtido para a fração GOs então, foram observadas 12 correlações C^{13}/H^1 e a partir dos deslocamentos, já conhecidos, de cada diferente carbono constituinte de cada monossacarídeo foi possível identificar o seu próton correspondente (H-2, H-3, H-4, H-5 e H-5' - FIGURA 15).

Como esperado, os sinais anoméricos de C^{13} , localizados em 103,14 e 101,62 ppm, apresentaram perfeita correlação com os sinais anoméricos de H^1 , localizados em 4,68 e 4,48 ppm, respectivamente (FIGURA 15).

Os sinais em 73,27, 72,32 e 72,68 ppm, por sua vez correlacionaram-se com os sinais em 3,42, 3,30 e 3,47 ppm (FIGURA 15), mostrando que estes sinais eram referentes aos H-2 das unidades de β -D-xilopiranosose glicosiladas em C-4 e glicosilando a próxima unidade em C-3, glicosiladas em C-3 e glicosilando em C-4 e glicosiladas e glicosilando em C-4, respectivamente (TABELA 3).

Os sinais em 73,72 e 76,40 ppm correlacionaram-se com os sinais em 3,64 e 3,79 ppm (FIGURA 15), permitindo assim assinalar estes sinais de H^1 como referentes aos H-3 e H-4 das unidades de β -D-xilopiranosose glicosiladas em C-4 e glicosilando a próxima unidade em C-3, bem como das unidades glicosiladas e glicosilando em C-4 (TABELA 3), enquanto que os sinais em 83,72 e 67,71 ppm, correlacionaram-se com os sinais em 3,58 e 3,78 ppm, os quais foram atribuídos aos H-3 e H-4 das unidades de β -D-xilopiranosose glicosiladas em C-3 e glicosilando em C-4 (TABELA 3).

Por fim, o sinal em 62,98 ppm correlacionou-se com sinais em 3,37 e 4,10 ppm e o sinal em 64,82 ppm com os sinais em 4,12 e 3,39 ppm (FIGURA 15), respectivamente atribuídos aos H-5 e H-5' das unidades de β -D-xilopiranosose glicosiladas em C-4 e glicosilando a próxima unidade em C-3 ou C-4 e aos H5 e H-5' das unidades de β -D-xilopiranosose glicosiladas em C-3 e glicosilando a próxima unidade em C-4 (TABELA 3).

FIGURA 17 - ESPECTRO DE CORRELAÇÃO HMQC (C^{13}/H^1)* DA FRAÇÃO GOS.

as letras correspondem as correlações C^{13}/H^1 das unidades: $\rightarrow 4$ - β -D-xilopiranosose-(1 \rightarrow 3)- (A), $\rightarrow 3$ - β -D-xilopiranosose-(1 \rightarrow 4)- (B) e $\rightarrow 4$ - β -D-xilopiranosose-(1 \rightarrow 4)- (C); os números correspondem aos carbonos e prótons identificados; no inserto são mostradas as correlações anoméricas; * experimento realizado à 50 °C, com os polissacarídeos dissolvidos em D_2O .

Desta maneira estabeleceu-se o completo assinalamento completo de próton para a fração GOs, a qual foi utilizada como modelo para o completo assinalamento das demais frações solúveis GMs, TCs, TFs, SHs e PPs (TABELA 5).

TABELA 5 - ASSINALAMENTOS QUÍMICOS ATRIBUÍDOS AOS PRÓTONS DAS UNIDADES DE β -D-XILOPIRANOSE CONSTITUINTES DAS XILANAS MISTAS (FRAÇÕES SOLÚVEIS).

FRAÇÃO*	UNIDADE**	DESLOCAMENTO QUÍMICO (ppm)***					RAZÃO ^b (1→3):(1→4)
		H-1	H-2	H-3	H-4	H-5;5'	
GMs	→4)- β -Xilp-(1→3)-	4,69 (7,5) ^a	3,42	3,64	3,79	4,10; 3,37	1,0:3,9
	→3)- β -Xilp-(1→4)-	4,48 (7,2)	3,30	3,57	3,78	4,12; 3,39	
	→4)- β -Xilp-(1→4)-	4,48 (7,2)	3,47	3,64	3,79	4,10; 3,37	
GOs	→4)- β -Xilp-(1→3)-	4,68 (7,5)	3,42	3,64	3,79	4,10; 3,37	1,0:2,7
	→3)- β -Xilp-(1→4)-	4,48 (7,4)	3,30	3,58	3,78	4,12; 3,39	
	→4)- β -Xilp-(1→4)-	4,48 (7,4)	3,47	3,64	3,79	4,10; 3,37	
TCs	→4)- β -Xilp-(1→3)-	4,69 (7,5)	3,42	3,64	3,79	4,11; 3,37	1,0:3,5
	→3)- β -Xilp-(1→4)-	4,48 (7,3)	3,30	3,57	3,78	4,12; 3,39	
	→4)- β -Xilp-(1→4)-	4,48 (7,3)	3,47	3,64	3,79	4,11; 3,37	
TFs	→4)- β -Xilp-(1→3)-	4,69 (7,6)	3,43	3,64	3,80	4,11; 3,37	1,0:5,6
	→3)- β -Xilp-(1→4)-	4,48 (7,5)	3,30	3,58	3,79	4,13; 3,40	
	→4)- β -Xilp-(1→4)-	4,48 (7,5)	3,47	3,64	3,80	4,11; 3,37	
SHs	→4)- β -Xilp-(1→3)-	4,69 (7,5)	3,42	3,64	3,79	4,11; 3,37	1,0:3,1
	→3)- β -Xilp-(1→4)-	4,48 (7,3)	3,30	3,58	3,78	4,12; 3,39	
	→4)- β -Xilp-(1→4)-	4,48 (7,3)	3,47	3,64	3,79	4,11; 3,37	
PPs	→4)- β -Xilp-(1→3)-	4,69 (7,4)	3,42	3,64	3,79	4,11; 3,37	1,0:3,0
	→3)- β -Xilp-(1→4)-	4,48 (6,8)	3,30	3,58	3,78	4,12; 3,39	
	→4)- β -Xilp-(1→4)-	4,48 (6,8)	3,47	3,64	3,79	4,11; 3,37	

* frações solúveis em cetavlon isoladas das algas *G. marginata* (GMs), *G. obtusata* (GOs), *T. cylindrica* (TCs), *T. fragilis* (TFs), *S. halliae* (SHs) e *P. palmata* (PPs); ** unidades: →4)- β -D-xilopiranoose-(1→3)-, →3)- β -D-xilopiranoose-(1→4)- e →4)- β -D-xilopiranoose-(1→4)-; *** δ referente ao padrão interno acetona em 2,225 ppm para H¹. Assinalamentos anoméricos de acordo com USOV et al. (1981); LAHAYE et al. (1993) e DENIAUD et al. (2003); ^a constante de acoplamento dos prótons anoméricos (J_{1,2}, Hz); ^b obtido mediante integração dos prótons anoméricos.

Como mencionado anteriormente, a análise de composição monossacarídica das frações solúveis GMs, GOs, TCs, TFs, SHs e PPs, revelou a presença, juntamente com seu componente majoritário (xilose), de baixos teores de outros monossacarídeos, como manose, galactose e glucose (TABELA 3), os quais podem ter sua origem atribuída a contaminações provenientes dos polissacarídeos sulfatados, também biossintetizados por estas algas e que se concentraram nas frações precipitadas (GMp, GOp, TCp, TFp, SHp e PPs), não pertencendo a estrutura destas xilanas. Como as análises de RMN de C^{13} não mostraram nenhum sinal passível de atribuição a qualquer um destes monossacarídeos, pode-se considerar estes polissacarídeos como homopolímeros de xilose.

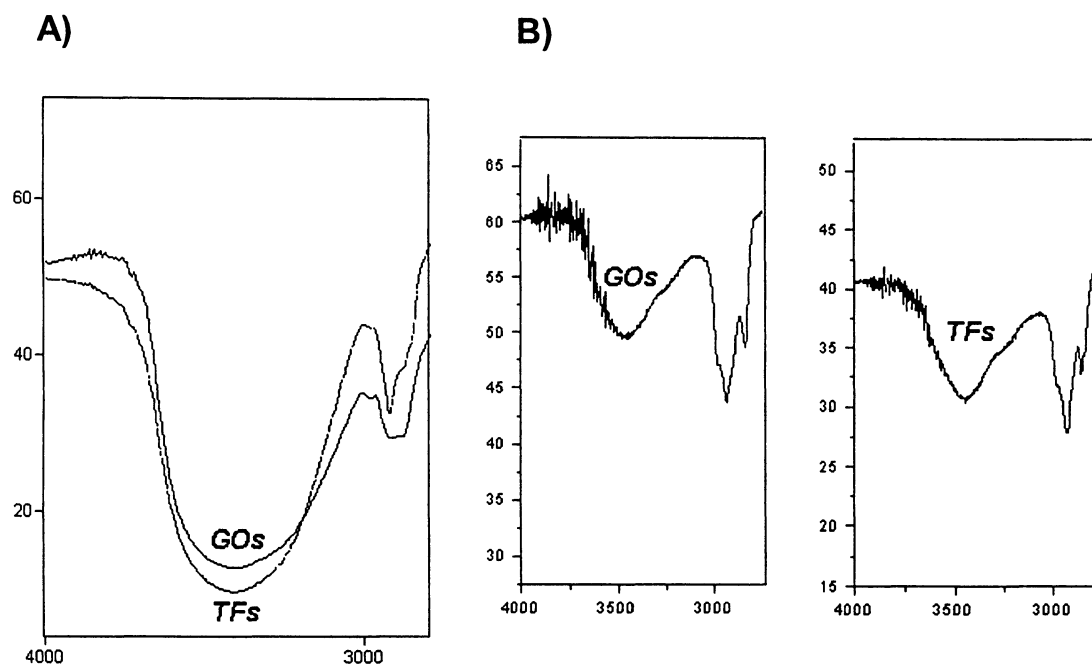
Grupos sulfato e proteínas também foram encontrados nestas frações, atingindo valores elevados nas frações GOs (14,0 % de proteína), TFs (22,0 % de proteína) e SHs (10,4 % de sulfato), como mostrado na TABELA 2. Estes valores identificados podem ainda ser atribuídos, da mesma forma, à contaminações com os polissacarídeos sulfatados.

Contudo, estudos recentes tem revelado que as xilanas solúveis, constituintes do componente amorfo da parede celular da alga *Palmaria palmata*, são parcialmente ácidas, devido à ocorrência de baixos teores de grupos sulfato e fosfato em sua estrutura (LAHAYE et al., 2003; DENIAUD et al., 2003), o que pode sugerir que, ao menos parte dos grupos sulfato em SHs possa fazer parte da estrutura da xilana isolada.

Para confirmar a estrutura proposta para as xilanas, mediante as análises de ressonância magnética nuclear, as frações GMs, GOs, TCs, TFs, SHs e PPs foram submetidas ao processo de metilação, utilizando-se a metodologia descrita por HAWORTH (1915), seguida pela descrita por CIUCANU e KEREK (1984).

Este processo de metilação foi necessário uma vez que as xilanas se mostraram insolúveis em DMSO, sendo assim necessário realizar inicialmente uma metilação parcial da molécula utilizando uma metodologia com solvente aquoso e na seqüência uma metodologia com DMSO para completar a metilação dos polissacarídeos. A completa metilação destes polissacarídeos foi observada mediante análises de infravermelho (realizadas para as frações GOs e TFs), através da extrema redução da banda em 3500 cm^{-1} , a qual é referente a hidroxilas livres presentes no polissacarídeo nativo e ausentes nos metilados (FIGURA 18).

FIGURA 18 - ESPECTROS DE FT-IR DAS FRAÇÕES TFs E GOs ANTES (A) E APÓS METILAÇÃO (B).



Os polissacarídeos metilados foram então submetidos a hidrólise ácida total (TFA 2M, 121 °C, 90') e metanólise (MeOH/HCl 3%, 70°C, 3h) seguidas por análise de cromatografia líquido-gasosa (CLG) e cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-EM), visando obter as unidades monossacarídicas parcialmente metiladas constituintes, as quais foram identificadas através de seus tempos de retenção e por seus perfis característicos de fragmentação.

Os mesmos monossacarídeos parcialmente metilados foram obtidos para todas as seis frações, tanto pelo processo hidrolítico com TFA quanto pela metanólise (TABELA 6) e identificados como 2,3-di-O-metil xilose (64,3 – 81,8 %), 2,4-di-O-metil xilose (15,1 – 35,7 %) e 2,3,4-tri-O-metil xilose (0,0 – 4,8 mol%).

TABELA 6 - ANÁLISE DE METILAÇÃO, RAZÃO ENTRE AS LIGAÇÕES, GRAU DE POLIMERIZAÇÃO (DP) E MASSA MOLECULAR DETERMINADA PARA AS FRAÇÕES SOLÚVEIS.

FRAÇÃO	MONOSSACARÍDEO (mol%)*			RAZÃO (1→3):(1→4)	DP	MASSA MOLECULAR ^D
	2,3,4-Xil ^a	2,3-Xil ^b	2,4-Xil ^c			
GMs	3,0	81,1	15,9	1,0 : 5,1	32,3	4.000
GOs	2,4	81,8	15,8	1,0 : 5,2	40,7	4.000
TCs	4,5	80,4	15,1	1,0 : 5,1	21,2	2.700
TFs	4,8	79,7	15,5	1,0 : 5,1	19,8	4.400
SHs	1,6	81,2	17,2	1,0 : 4,7	61,5	-
PPs	0,0	64,3	35,7	1,0 : 1,8	- ^e	2.112

* determinado mediante hidrólise ácida total (TFA 2M, 121°C, 90') e metanólise (MeOH/HCl 3%, 70°C, 3h) na forma de alditóis acetatos, por CLG e CG-EM.

^a 2,3,4-tri-O-metil xilose; ^b 2,3-di-O-metil xilose; ^c 2,4-di-O-metil xilose.

^d segundo PARK e JOHNSON (1949).

^e não determinado.

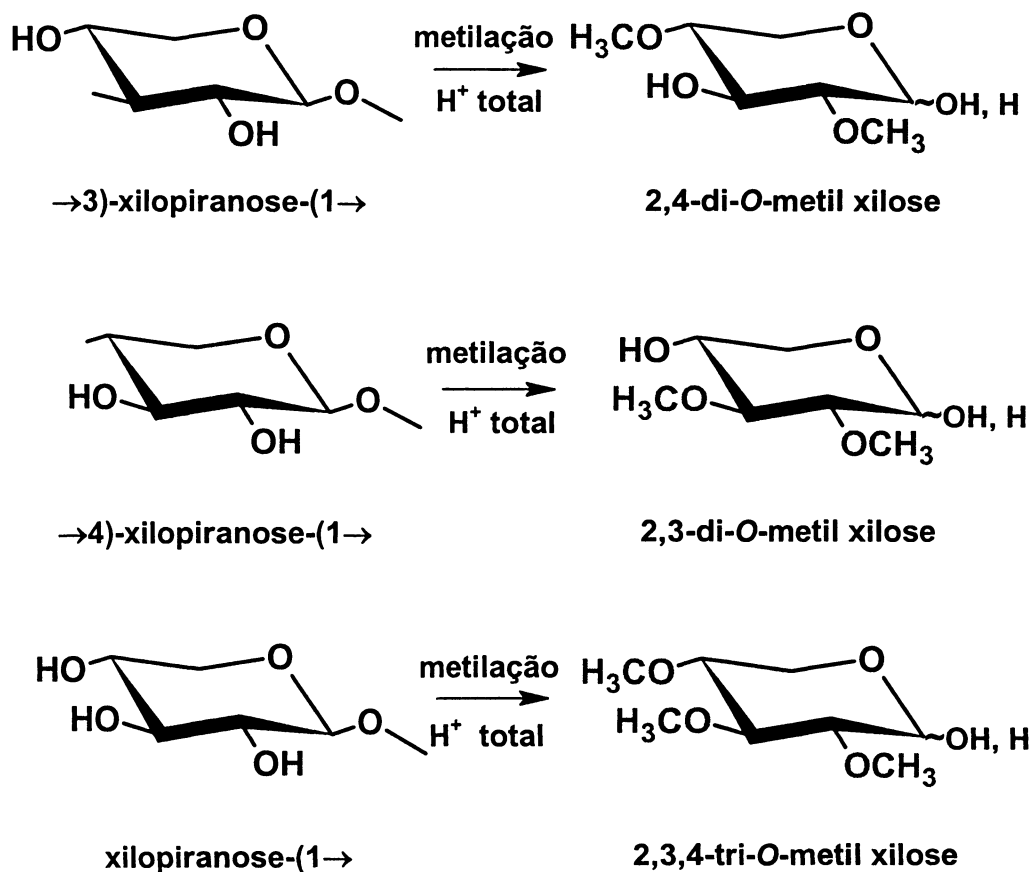
Os derivados 2,3-di-O-metil e 2,4-di-O-metil xilose, que se apresentaram majoritariamente nas frações, originaram-se, respectivamente a partir das unidades de xilopiranosose 4- e 3-glicosiladas presentes nos polissacarídeos (FIGURA 19), enquanto que o derivado 2,3,4-tri-O-metil xilose, originou-se a partir das unidades terminais de xilose, ou seja, localizadas como terminais não redutores (FIGURA 19).

A ausência de unidades monossacarídicas mono metiladas ou não metiladas entre os produtos de hidrólise das frações GMs, GOs, TCs, TFs, SHs e PPs, mostraram que suas xilanas constituintes não possuem pontos de ramificação, se tratando assim de polissacarídeos lineares, como já sugerido pelas análises de RMN.

A partir das percentagens dos derivados 2,4-di-O-metil e 2,3-di-O-metil xilose determinadas, foi possível estabelecer uma proporção entre os dois tipos de ligação glicosídica encontradas nas xilana constituintes de cada fração, a qual foi de aproximadamente 1,0:5,0 (TABELA 6). Ou seja, para cada unidade de xilose substituída glicosidicamente em carbono 3 existem aproximadamente outras cinco unidades substituídas em carbono 4. Esta proporção se mostrou a mesma para as

frações GMs, GOs, TCs, TFs e SHs, porém para PPs, a razão obtida foi de 1,0:2,0 (TABELA 6).

FIGURA 19 - UNIDADES PARCIALMENTE METILADAS OBTIDAS A PARTIR DAS XILANAS CONSTITUINTES DAS FRAÇÕES SOLÚVEIS.



A proporção estimada para as xilanas das frações obtidas a partir de algas pertencentes a ordem Nemaliales (*Galaxaura marginata*, *G. obtusata*, *Tricleocarpa cylindrica*, *T. fragilis* e *Scinaia halliae*) permaneceu muito próxima à determinada para as xilanas isoladas de outras algas pertencentes a esta mesma ordem, como

Galaxaura squalida (1,0:4,0 - USOV et al., 1981), *Nemalion vermiculare* (1,0:4,0 - USOV et al., 1973; KOVAC et al., 1980), *Chaetangium fastigiatum* (1,0:3,0 - CEREZO et al., 1971) e *Chaetangium erinaceum* (1,0:4,0 - NUNN et al., 1973).

O mesmo porém não foi observado para a xilana isolada da alga *Palmaria palmata*, onde a proporção determinada de 1,0:2,0 ficou muito abaixo daquelas determinadas previamente para a mesma alga (1,0:5,0 - LAHAYE et al., 1993, 2003) ou para outros representantes da ordem Palmariales como *Rhodymenia stenogona* (1,0:4,0 - KOVAC et al., 1980) e *Halosaccion glandiforme* (1,0:4,0 - KOVAC et al., 1980).

A proporção entre os dois tipos de ligações presentes nas xilanas das frações GMs, GOs, TCs, TFs, SHs e PPs também foi determinada através da integração dos sinais em 4,68 - 4,69 e 4,48 ppm, preferentes aos prótons anoméricos das unidades de β -D-xilopiranosose-(1 \rightarrow 3) e -(1 \rightarrow 4), observados nos espectros de RMN de H^1 (TABELA 5). Por esta análise, os valores determinados variaram entre 1,0:2,7 a 1,0:5,6, para as frações obtidas a partir das algas da ordem Nemaliales, ficando abaixo do determinado pelas análises químicas, e 1,0:3,0 para a alga *P. palmata*, valor muito próximo ao determinado pelo método químico.

A diferença observada entre os valores determinados pelas análises de RMN e de metilação pode ser atribuída a incompleta metilação dos polissacarídeos, degradação preferencial das ligações -(1 \rightarrow 4) ou ainda a erros na integração manual dos picos de RMN (LAHAYE et al., 1993).

Estudos realizados com xilanas mistas tem mostrado que as ligações -(1 \rightarrow 3) se apresentam aleatoriamente distribuídas ao longo da molécula, nunca ocorrendo em posições contíguas e conferindo desta maneira a molécula, uma conformação ao acaso ou "random coil" (CEREZO et al., 1971; NUNN et al., 1973; MATULEWICZ et al., 1992). Estudos mais recentes onde foram obtidos oligossacarídeos a partir das xilanas de *N. erinacea* e *P. palmata* têm sugerido a existência de um motivo pentamérico idealizado nas xilanas das ordens Nemaliales e Palmariales, onde existiriam quatro unidades de xilose 4-O-ligadas contíguas para cada unidade 3-O-ligada, pequenas irregularidades neste modelo, também permitiriam a ocorrência de menores seqüências de xilose 4-O-ligadas (DENIAUD et al., 2003, NERINCKX et al., 2004).

Ainda, a presença do derivado 2,3,4-tri-O-metil xilose entre os produtos de hidrólise das frações metiladas (TABELA 6) mostrou que as xilanas apresentam baixo grau de polimerização (DP 19,8 – 61,5; TABELA 6), uma vez que, como mencionado anteriormente, estes polímeros são lineares não possuindo pontos de ramificação, sugerindo assim baixas massas moleculares.

As massas moleculares determinadas para as xilanas GMs, GOs, TCs, TFs e SHs foi determinada utilizando-se os teores do derivado trimetilado e o valor da massa molecular de uma unidade de xilose, como sendo 4.400, 5.500, 2.930, 2.750 e 8.250 Da, respectivamente.

Os valores determinados colorimetricamente pelo método de PARK e JOHNSON (1949), mostrados na TABELA 6, confirmaram os valores obtidos para as frações GMs e TCs, mas diferiram para as xilanas das frações GOs e TFs. Contudo a análise conjunta destes valores permite dizer que as algas do gênero *Galaxaura* sintetizam polímeros de maiores massas do que as do gênero *Tricleocarpa*.

As massas das xilanas SHs e PPs não foram confirmadas, uma vez que cada polímero foi analisado por uma única metodologia.

Desta maneira, este conjunto de informações mostra que as xilanas presentes nas frações solúveis isoladas das algas *G. marginata*, *G. obtusata*, *T. cylindrica*, *T. fragilis*, *S. halliae* e *P. palmata* apresentam uma estrutura mista, linear e de baixa massa molecular, de maneira semelhante aquelas já descritas na literatura para xilanas solúveis isoladas a partir de outras espécies de algas vermelhas.

Assim, estes resultados podem ampliar os dados disponíveis na literatura que sugerem a utilização das xilanas mistas (solúveis) como marcadores taxonômicos para as ordens Nemaliales e Palmariales (MILLER, 1997). Esta estrutura química poderia ser utilizada com este fim já que obedece aos critérios para ser considerada como tal, ou seja, ser específico de um certo táxon ou grupo de organismos e ser suficientemente abundante para ser detectado e identificado com segurança (KARSTEN et al., 1999).

Estes polissacarídeos, apesar de alguns questionamentos (CRAIGIE 1990, em COLE; SEATH, 1990), já foram utilizados como critério decisivo na incorporação da alga *Leptosarca simplex* A. et E.S. Gepp, originalmente pertencente à ordem Gigartinales, na ordem Palmariales, como sinônimo da alga *Palmaria decipiens* (Reinsch) R.W. Ricker by Ricker (FURNEAUX; MILLER, 1986).

4.1.2. ESTRUTURAS DAS XILOMANANAS SULFATADAS PRESENTES NAS FRAÇÕES PRECIPITADAS COM CETAVLON

Para a caracterização da estrutura química fina das xilomananas sulfatadas, foram escolhidas as frações Gmp e TFp, isoladas a partir das algas *G. marginata* e *T. fragilis*, respectivamente. Esta escolha foi feita baseando-se nos rendimentos (3,17 e 1,73%, respectivamente) e na quantidade de material disponível de cada fração, comparado às demais. Além disso, também foi utilizado como critério de escolha a diferença observada entre suas composições monossacarídicas (TABELA 7), uma vez que Gmp apresentou elevados teores de manose (53,3 mol%) e xilose (36,2 mol%), enquanto TFp apresentou-se majoritariamente composta por manose (54,8 mol%), xilose (21,1 mol%) e 4-O-metil xilose (15,8 mol%).

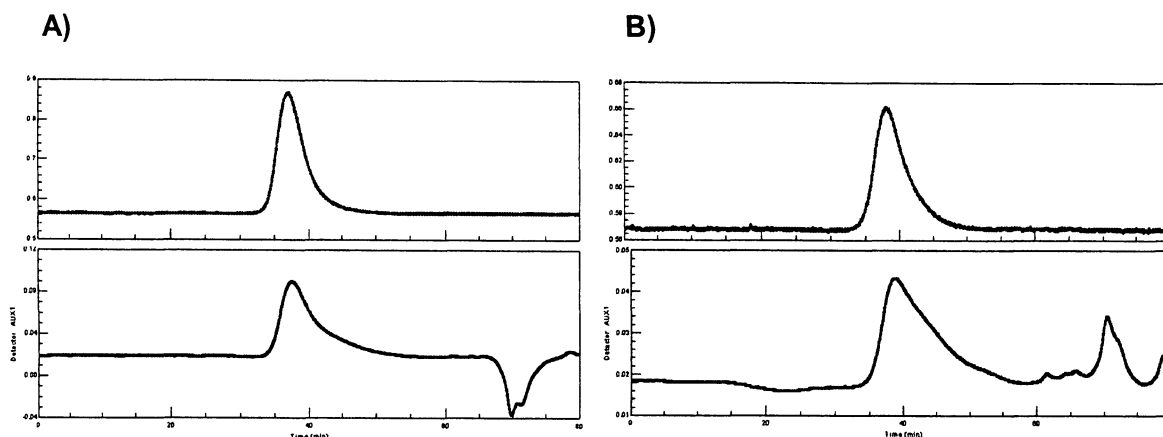
TABELA 7 – CARACTERÍSTICAS GERAIS E COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES Gmp E TFp.

FRAÇÃO	SULFATO (%) ^a	α_D^{20} (°) ^b	COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA (mol%)*				
			4xil ¹	Xil ²	Man ³	Gal ⁴	Glc ⁵
Gmp	10,5	+19,5	0,0	36,2	53,3	9,0	1,5
TFp	25,0	+29,0	15,8	21,1	54,8	6,5	1,8

^a segundo DODGSON; PRICE (1961), expresso como NaSO₃; ^b rotação óptica específica dos polissacarídeos dissolvidos em água (0,2g%); * determinada mediante hidrólise ácida total (TFA 2M, 121°C, 90'), na forma de alditóis acetatos, por CLG e CG-EM; ¹ 4-O-metil xilose, ² xilose, ³ manose, ⁴ galactose, ⁵ glucose.

Análises mediante cromatografia de exclusão estérica acoplada a detectores de espalhamento de luz e índice de refração (HPSEC-MALLS) mostraram que as frações Gmp e TFp eram compostas por um polímero de elevada massa molecular (espalhamento de luz), apresentando um pico de eluição próximo a 40 minutos (FIGURA 20). As análises ainda mostraram em TFp a presença de outros polímeros de baixa massa molecular (índice de refração).

FIGURA 20 - CROMATOGRAMA DE HPSEC-MALLS DAS FRAÇÕES GMp (A) E TFp (B).



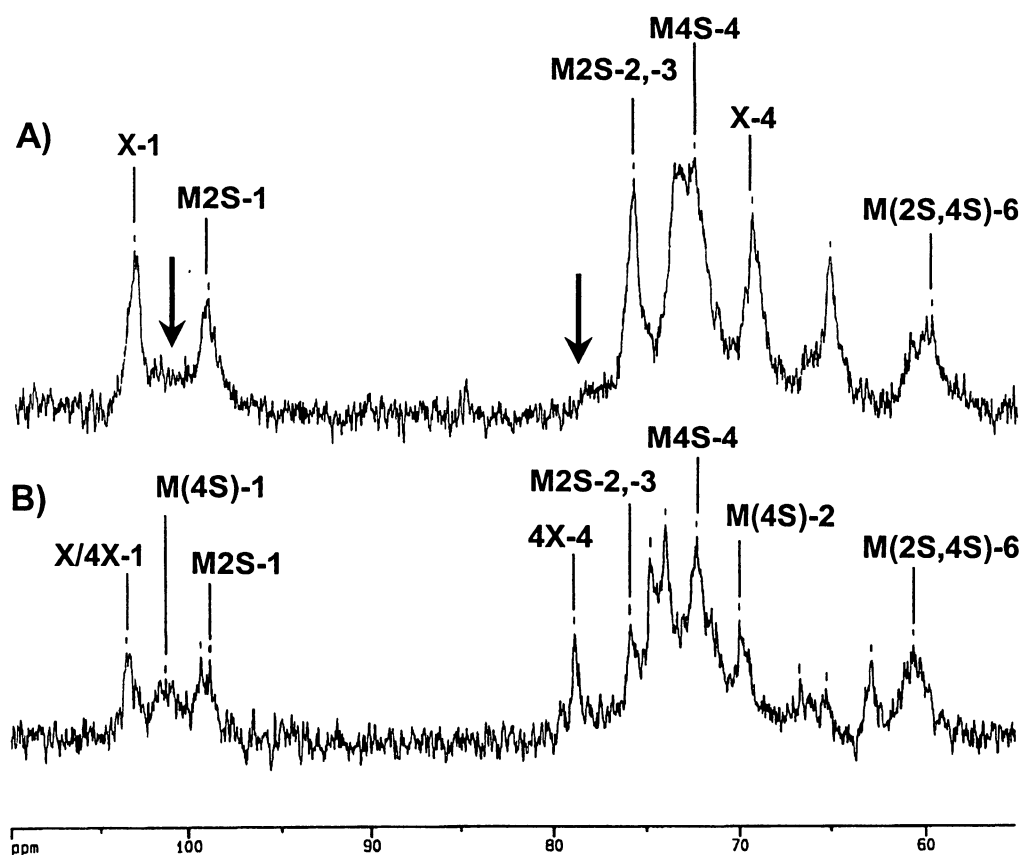
detector 11 (acima): espalhamento de luz, detector auxiliar 1 (abaixo): índice de refração; * experimento realizado com os polissacarídeos dissolvidos em solução de nitrito contendo azida sódica.

Quando submetidas à análise de ressonância magnética nuclear de C^{13} , as frações GMp e TFp geraram espectros distintos porém com alguns assinalamentos comuns (FIGURA 21). Tais espectros apresentaram baixa resolução, provavelmente devido à elevada viscosidade das soluções, elevada sulfatação (a qual reduz a mobilidade molecular) e pela microheterogeneidade estrutural gerada por estes grupos.

Na região anomérica do espectro da fração GMp, somente dois sinais foram observados em 103,2 e 99,1 ppm (TABELA 8), enquanto que em TFp estes mesmos sinais, localizados em 103,4 e 99,0 ppm, ocorriam juntamente com um terceiro sinal, de baixa definição, centrado em 101,8 ppm (TABELA 8).

O sinal em campo mais baixo observado em ambos os espectros (103,4 e 103,2 ppm) foi atribuído ao C-1 de unidades de β -D-xilopiranosose e ou de β -D-xilopiranosose 4-O-metiladas (4-O-metil xilose), enquanto que o localizado em campo mais alto (99,1 e 99,0 ppm) foi atribuído ao C-1 de unidades de α -D-manopiranosose, quando esterificadas em carbono 2 por grupos sulfato (manose 2-sulfato - KOLENDER et al., 1995 e 1997; USOV et al., 1997; FALSHAW et al., 1998).

FIGURA 21 - ESPECTROS DE RMN DE C^{13} * DAS XILOMANANAS CONSTITUINTES DAS FRAÇÕES GMp (A) E TFp (B).



as siglas correspondem as unidades: β -D-xilopiranosose (X), 4-O-metil β -D-xilopiranosose (4-X), α -D-manopiranosose 2-sulfato (M2S), α -D-manopiranosose 4-sulfato (M4S); os números são referentes aos carbonos identificados; as setas indicam os sinais ausentes em GMp. * experimento realizado à 80°C com os polissacarídeos dissolvidos em D_2O .

Já o sinal em 101,8 ppm, presente unicamente em TFp, foi atribuído ao C-1 de unidades de α -D-manopiranosose não sulfatadas em carbono 2 (KOLENDER et al., 1995 e 1997). Como mencionado, o sinal em 103,4 - 103,2 ppm foi atribuído ao carbono 1 das unidades de xilose e de 4-O-metil xilose. Porém, a composição monossacarídica determinada para estas duas frações, mostrou que a pentose mono metilada somente estava presente em TFp (TABELA 8). Desta maneira pôde-

se considerar que o sinal em 103,4 ppm era referente a uma sobreposição dos C-1 de ambas as unidades monossacarídicas, enquanto que o sinal em 103,2 ppm referia-se somente ao C-1 das unidades de xilose. Esta afirmação foi confirmada mediante a identificação do sinal em 78,8 ppm em TFp e do sinal em 69,4 ppm em GMp (TABELA 8), os quais foram respectivamente atribuídos ao carbono 4 metilado e ao carbono 4 livre, destas referidas unidades (USOV et al., 1997; FALSHAW et al., 1998).

A presença de unidades de α -D-manopiranosose sulfatadas em carbono 2 (manose 2-sulfato), sugerida pela ocorrência dos sinais em 99,1 (GMp) e 99,0 ppm (TFp), foi confirmada mediante a identificação do sinal em 75,8 ppm (TABELA 8), em ambas as frações, atribuído ao referido carbono substituído por sulfato (KOLENDER et al., 1995 e 1997).

O sinal em 101,8 ppm mostrou que, ao menos em TFp, algumas unidades de α -D-manopiranosose também ocorriam sob outros padrões de sulfatação. A identificação dos sinais em 69,9 e 72,2 ppm (TABELA 8), nesta mesma fração, respectivamente atribuídos ao C-2 livre e ao C-4 sulfatado, evidenciou a ocorrência a presença de unidades de α -D-manopiranosose 4-sulfato (KOLENDER et al., 1995 e 1997). A identificação do sinal em 72,6 ppm em GMp (TABELA 8) mostrou que, também nesta fração existiam unidades de α -D-manopiranosose 4-sulfatadas.

Nenhum sinal porém mostrou a possibilidade de sulfatação no carbono 6 desta hexose, estando este sempre livre em ambas as frações, como evidenciaram os sinais centrados em 59,8 e 60,6 ppm (TABELA 8), encontrados em GMp e TFp, respectivamente (KOLENDER et al., 1995 e 1997). Desta mesma forma não foram identificados nestes espectros quaisquer sinais passíveis de atribuição a unidades de galactose, apesar da ocorrência de 9,0 e 6,5 mol% (TABELA 7) deste monossacarídeo nas frações GMp e TFp, respectivamente.

As frações brutas GMp e TFp foram, em seguida, submetidas a purificação e fracionamento por cromatografia de troca-iônica em DEAE-Sephacel, utilizando como eluente água e soluções de concentrações crescentes de NaCl (0,5, 1,0, 2,0 e 4,0 M). Desta maneira, cada fração originou 5 outras, cujas características gerais podem ser observadas na TABELA 9.

TABELA 8 - ASSINALAMENTOS QUÍMICOS DE RMN DE C¹³* DAS FRAÇÕES NATIVAS GMp E TFp.

UNIDADE	CARBONO	FRAÇÃO	
		GMp	TFp
(4-O-metil) β-D-xilopiranosose	C-1	103,2	103,4
α-D-manopiranosose (4-sulfato)	C-1		101,8
α-D-manopiranosose 2-sulfato	C-1	99,1	99,0
4-O-metil β-D-xilopiranosose	C-4		78,8
α-D-manopiranosose 2-sulfato	C-2/C-3	75,8	75,8
α-D-manopiranosose 4-sulfato	C-4	72,6	72,2
α-D-manopiranosose (4-sulfato)	C-2		69,9
β-D-xilopiranosose	C-4	69,4	
α-D-manopiranosose 2-sulfato	C-6	59,8	60,6

* segundo KOLENDER et al., 1995 e 1997; USOV et al., 1997; FALSHAW et al., 1998

TABELA 9 - RENDIMENTO, TEOR DE GRUPOS SULFATO E PROTEÍNAS DAS SUB-FRAÇÕES OBTIDAS A PARTIR DE TFp E GMp MEDIANTE CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA EM DEAE-SEPHACEL.

FRAÇÃO	[NaCl] (M)	RENDIMENTO (%)*	SULFATO (%) ^a	PROTEÍNA (%) ^b
GMp			10,5	3,3
GMp-A	- ^c	^d	^e	^e
GMp-B	0,5	48,7	8,9	3,3
GMp-C	1,0	6,5	11,5	3,8
GMp-D	2,0	3,4	11,3	9,2
GMp-E	4,0	6,0	10,6	11,2
TFp			25,0	7,0
TFP-A	-			
TFp-B	0,5	17,4	11,9	4,8
TFp-C	1,0	17,1	18,2	3,8
TFp-D	2,0	7,7	17,7	6,8
TFp-E	4,0	11,0	23,9	9,0

* em relação a massa submetida a cromatografia (650 mg – TFp; 600 mg - GMp); ^a determinado segundo o método descrito por DODGSON; PRICE (1961), expresso como NaSO₃; ^b determinado segundo o método descrito por LOWRY et al. (1951), ^c fração obtida utilizando-se H₂O como eluente; ^d valor inferior a 1,0 %, ^e não determinado.

Todas as sub-frações obtidas se mostram sulfatadas (8,9 – 11,5%, para Gmp e 11,9 – 25,0% para TFp – TABELA 9) e continham proteínas (3,3 – 11,2% para Gmp e 3,8 – 9,0% para TFp – TABELA 9).

A partir de Gmp foi obtida somente uma sub-fração de elevado rendimento, eluída com NaCl 0,5 M e denominada Gmp-B (48,7% - TABELA 9), enquanto que a partir de TFp, foram obtidas duas, eluídas com NaCl 0,5 e 1,0 M e denominadas respectivamente de TFp-B (17,4%) e TFp-C (17,1% - TABELA 9).

Para a determinação da composição monossacarídica as frações foram submetidas à hidrólise ácida total utilizando TFA 2M (121 °C, 90'). A análise dos hidrolisados, na forma de alditóis acetatos, por cromatografia líquido-gasosa (CLG) e cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-EM), revelou que todas as dez sub-frações eram constituídas por 4-O-metil xilose, xilose, manose, galactose e glucose, em percentagens variadas (TABELA 10).

TABELA 10 - COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS SUB-FRAÇÕES OBTIDAS A PARTIR DE TFp E Gmp MEDIANTE CROMATOGRÁFIA DE TROCA IÔNICA EM DEAE-SEPHACEL.

SUB-FRAÇÃO	COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA (mol%)*				
	4-O-metil-xilose	Xilose	Manose	galactose	glucose
Gmp	0,0	36,2	53,3	9,0	1,5
Gmp-B	2,4	33,6	54,2	4,3	5,5
Gmp-C	5,0	32,5	48,9	8,6	5,0
Gmp-D	5,8	37,0	48,4	8,7	0,1
Gmp-E	8,9	33,6	33,3	16,9	7,3
TFp	15,8	21,1	54,8	6,5	1,8
TFp-A	22,1	41,4	9,9	4,8	21,8
TFp-B	32,5	10,4	46,9	6,0	3,2
TFp-C	19,4	27,0	46,1	5,1	2,4
TFp-D	15,7	20,1	47,0	10,4	6,8
TFp-E	13,2	24,2	54,3	4,5	3,8

* Composição monossacarídica em mol%, obtida mediante hidrólise ácida total (TFA 2M, 121 °C, 90') na forma de alditóis acetatos, por CLG.

A composição monossacarídica apresentada por Gmp-B se mostrou extremamente similar àquela de Gmp, sendo manose (54,2 mol%) e xilose (33,6 mol%) os constituintes majoritários (TABELA 10). TFp-B e TFp-C porém, apresentaram composições distintas daquela apresentada por TFp, uma vez que ambas apresentaram valores inferiores de manose (46,9 – 46,1 mol%) e que, enquanto TFp-B apresentou maior teor de 4-O-metil xilose (32,5 mol%), TFp-C apresentou maior teor de xilose (27,0 mol%), como mostrado na TABELA 10. Galactose (4,3 – 16,9 mol%) e glucose (0,1 – 21,8 mol%) também foram detectadas em todas as sub-frações.

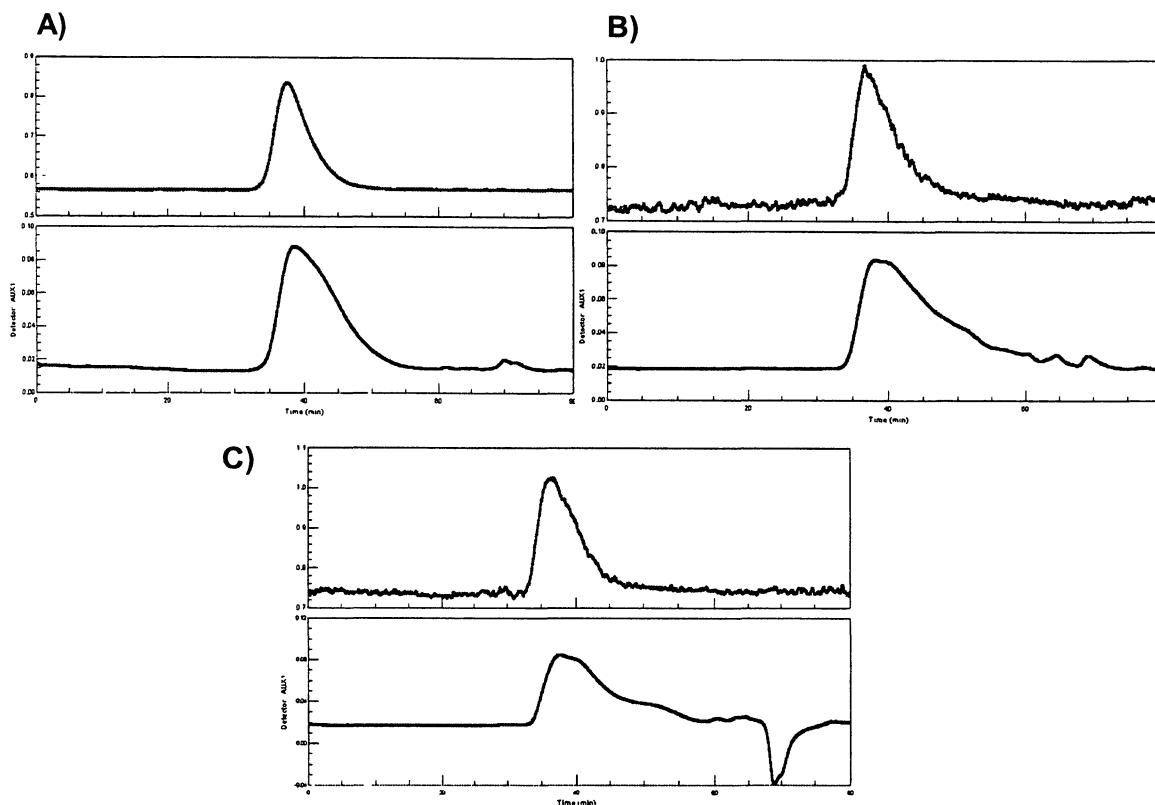
Estes resultados indicam que, da mesma forma que em Gmp e TFp, os polissacarídeos constituintes das sub-frações majoritárias Gmp-B, TFp-B e TFp-C eram xilomananas sulfatadas. Análises de HPSEC-MALLS mostraram que estas sub-frações, assim como Gmp e TFp, eram majoritariamente compostas por um polímero de elevada massa molecular, o qual apresentou um pico de eluição em aproximadamente 37,5 minutos, porém moléculas de baixa massa molecular também compõem estas sub-frações, especialmente TFp-B e C (FIGURA 22).

Os espectros de RMN de C^{13} obtidos para estas três sub-frações se mostraram extremamente semelhantes àqueles obtidos para as suas respectivas frações originais (Gmp e TFp). Na região anomérica do espectro da fração Gmp-B, três sinais foram identificados em 103,3, 101,8 e 99,2 ppm (TABELA 11), respectivamente atribuídos ao carbono 1 de unidades de β -D-xilopiranosose, α -D-manopiranosose e α -D-manopiranosose 2-sulfato (KOLENDER et al., 1995 e 1997; USOV et al., 1997; FALSHAW et al., 1998).

Os sinais em 103,3 e 99,2 ppm já eram observados no espectro da fração Gmp, porém o sinal em 101,8 ppm passou a ser observado somente após o processo de fracionamento. Este último sinal apresentou-se em Gmp-B acompanhado pelo sinal à 69,9 ppm (TABELA 11), atribuído ao carbono 2 não sulfatado de unidades de α -D-manopiranosose (KOLENDER et al., 1995 e 1997), o qual também não estava presente na fração bruta.

A região anomérica dos espectros das sub-frações TFp-B e TFp-C reproduziu fielmente aquela da fração TFp (FIGURA 23), onde três sinais estavam presentes em 103,5, 101,2 e 98,8 ppm para TFp-B e em 103,2, 101,8 e 98,8 ppm para TFp-C (TABELA 11).

FIGURA 22 – CROMATOGRAMA DE HPSEC-MALLS DAS FRAÇÕES GMP-B (A), TFP-B (B) E TFP-C (C).

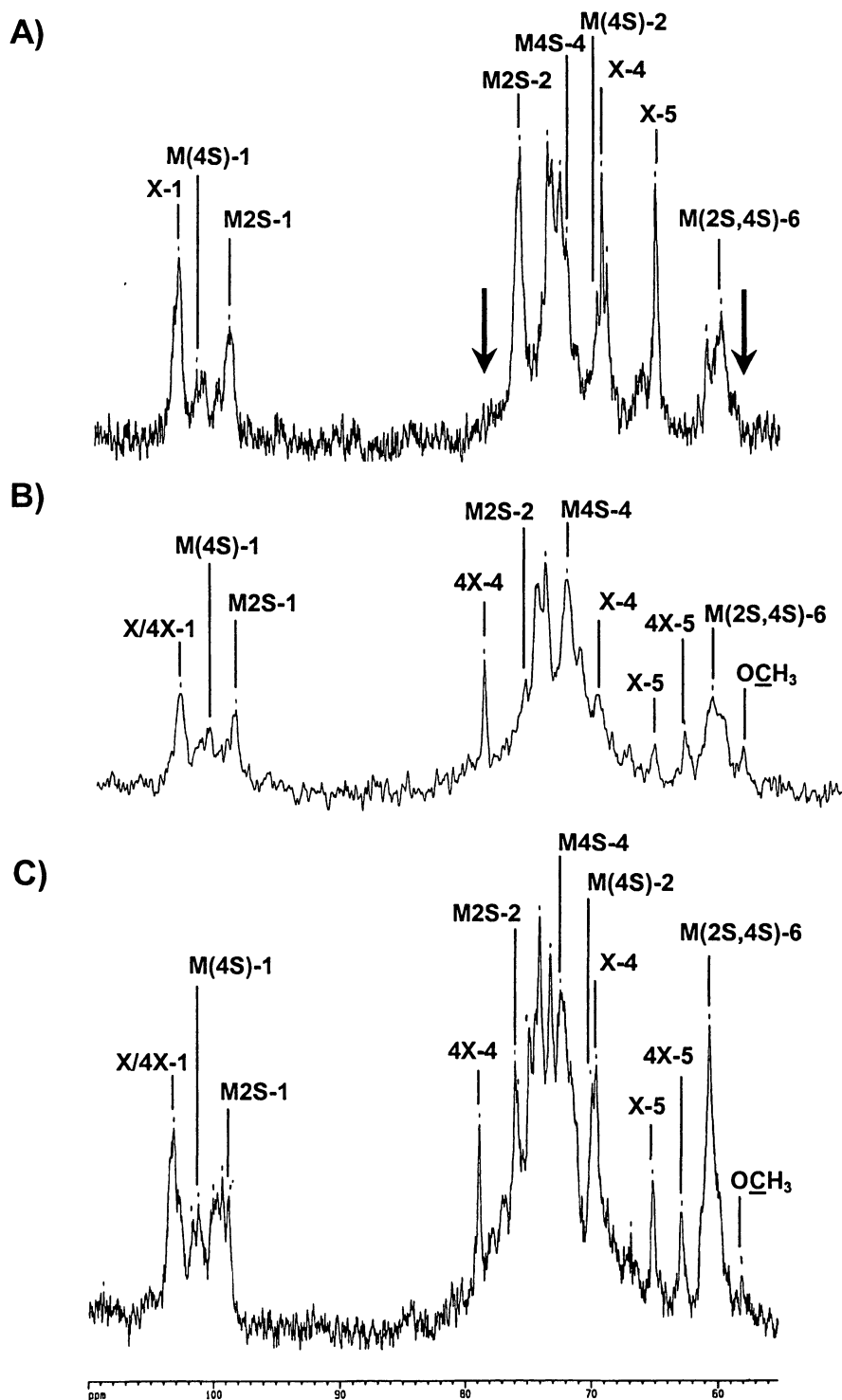


detector 11 (acima): espalhamento de luz, detector auxiliar 1 (abaixo): índice de refração; * experimento realizado com os polissacarídeos dissolvidos em solução de nitrito contendo azida sódica.

De forma coerente com a composição monossacarídica, o sinal atribuído ao C-4 metilado das unidades de 4-O-metil β -D-xilopiranosse, em 78,8 ppm (TABELA 11), apresentou maior intensidade na fração TFP-B do que em TFP-C e mostrou-se ausente em GMP-B (FIGURA 23). Já o sinal em 69,6 ppm (TABELA 11), referente ao carbono 4 livre da β -D-xilopiranosse (TABELA 11), apresentou maior intensidade e definição em GMP-B e TFP-C, quando comparado a fração TFP-B (FIGURA 23).

Nas sub-frações TFP-B e TFP-C foi possível ainda identificar o sinal em 58,2 ppm (FIGURA 23, TABELA 11), atribuído ao carbono metílico das unidades de 4-O-metil β -D-xilopiranosse (FALSHAW et al., 1998), presentes nestas frações.

FIGURA 23 - ESPECTROS DE RMN DE C^{13} DAS XILOMANANAS SULFATADAS CONSTITUINTES DAS SUB-FRAÇÕES Gmp-B (A), TFp-B (B) e TFp-C (C).



siglas e condições de análise como na FIGURA 21.

Os sinais em 75,4, 75,8 e 75,9 ppm (carbono 2 sulfatado), 72,3, 72,4 e 72,4 ppm (carbono 4 sulfatado) e 60,5, 60,5 e 60,1 ppm (carbono 6 livre) em TFp-B, TFp-C e Gmp-B, respectivamente (TABELA 11) observados nas três sub-frações confirmaram o padrão de substituição das unidades de α -D-manopiranoose por grupo sulfato em carbono 2 e 4, previamente sugerido para as frações Gmp e TFp.

Também nestas sub-frações não foram identificados quaisquer sinais passíveis de serem atribuídos a unidades de galactose.

TABELA 11 - ASSINALAMENTOS QUÍMICOS DE RMN DE C¹³* DAS FRAÇÕES SUB-FRAÇÕES Gmp-B, TFp-B E TFp-C.

UNIDADE	CARBONO	FRAÇÃO		
		Gmp-B	TFp-B	TFp-C
(4-O-metil) β -D-xilopiranoose	C-1	103,3	103,5	103,2
α -D-manopiranoose (4-sulfato)	C-1	101,8	101,2	101,8
α -D-manopiranoose 2-sulfato	C-1	99,2	98,8	98,8
4-O-metil β -D-xilopiranoose	C-4		78,8	78,8
α -D-manopiranoose 2-sulfato	C-2/C-3	75,9	75,4	75,8
α -D-manopiranoose 4-sulfato	C-4	72,4	72,3	72,4
α -D-manopiranoose (4-sulfato)	C-2	69,9		69,8
β -D-xilopiranoose	C-4	69,4	69,6	69,6
β -D-xilopiranoose	C-5	65,2	65,2	65,2
4-O-metil β -D-xilopiranoose	C-5		62,8	62,8
α -D-manopiranoose (2-sulfato)	C-6	60,1	60,5	60,5
4-O-metil β -D-xilopiranoose	O-CH ₃		58,2	58,2

* segundo KOLENDER et al., 1995 e 1997; USOV et al., 1997; FALSHAW et al., 1998

Para confirmar o padrão de sulfatação estabelecido pelas análises de RMN de C¹³, as sub-frações foram submetidas ao processo de dessulfatação seguindo a metodologia descrita por NAGASAWA et al. (1979).

Para tanto, os polissacarídeos das sub-frações Gmp-B, TFp-B e TFp-C, na forma de sal de piridônio, foram solubilizados em DMSO:MeOH:piridina (89:10:1) e mantidos a 100 °C durante 6 horas. Após diálise contra água destilada e liofilização,

foram obtidas três frações denominadas de Gmp-Bds, TFp-Bds e TFp-Cds, com rendimentos de 77, 90 e 75% respectivamente (TABELA 12). Como resultado desta metodologia, foi observado uma redução no teor de sulfatação destas sub-frações quando comparado ao das frações nativas. Para Gmp-Bds ocorreu uma redução de cerca de 63%, enquanto que em TFp-Bds de somente cerca de 13% e em TFp-Cds de cerca de 57% (TABELA 12).

A composição monossacarídica apresentada por estas frações também foi determinada (TABELA 12). Para Gmp-Bds verificou-se que nenhuma modificação considerável na composição monossacarídica ocorreu como resultado deste tratamento solvolítico, enquanto que para as frações TFp-Bds e TFp-Cds, esta mesma metodologia acarretou em uma redução nos teores de 4-O-metil xilose e de xilose (TABELA 12). Porém, estes monossacarídeos juntamente com a manose continuaram a representar os componentes majoritários das frações (95,3% para Gmp-Bds; 82,6% para TFp-Bds e 72,5% para TFp-Cds). Esta análise ainda mostrou que as frações TFp-Bds e TFp-Cds apresentavam elevados teores de galactose (11,8 e 24,1 mol% - TABELA 12).

TABELA 12 - CARACTERÍSTICAS DAS SUB-FRAÇÕES Gmp-B, TFp-B E TFp-C ANTES E APÓS DESSULFATAÇÃO SOLVOLÍTICA.

FRAÇÃO	RENDIMENTO (%) [*]	SULFATO (%) ^a	COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA(mol%) ^c				
			4-O-Xil ¹	Xil ²	Man ³	Gal ⁴	Glc ⁵
Gmp-B	-	9,0	2,4	33,6	54,2	4,3	5,5
Gmp-Bds	77,0	3,3 (63,3)	3,5	35,3	56,5	4,6	0,1
TFp-B	-	11,9	32,5	10,4	46,9	6,0	3,2
TFp-Bds	90,0	10,4 (12,6) ^b	21,7	9,6	51,3	11,8	5,6
TFp-C	-	18,2	19,4	27,0	46,1	5,1	2,4
TFp-Cds	75,0	7,9 (56,6)	10,0	14,0	48,5	24,1	3,4

* em relação a massa submetida a dessulfatação (100mg) segundo o método de NAGASAWA et al. (1979); ^a determinado segundo o método descrito por DODGSON; PRICE (1961), expresso como NaSO₃; ^b valores correspondentes a percentagem de dessulfatação; ^c composição monossacarídica em mol%, obtida mediante hidrólise ácida total (TFA 2M, 121 °C, 90') na forma de alditóis acetatos, por CLG; ¹4-O-metil xilose, ²xilose, ³manose, ⁴galactose, ⁵glucose.

As três frações dessulfatadas foram submetidas a análises de RMN de C^{13} (FIGURA 24). As frações Gmp-Bds e TFp-Cds, que sofreram perdas significativas em seus teores de sulfatação, geraram espectros distintos daqueles obtidos para as frações nativas. Como se podia esperar, o espectro da fração TFp-Bds mostrou-se similar ao da fração nativa (FIGURA 25), uma vez que o processo de dessulfatação, aqui, não se processou de forma eficiente.

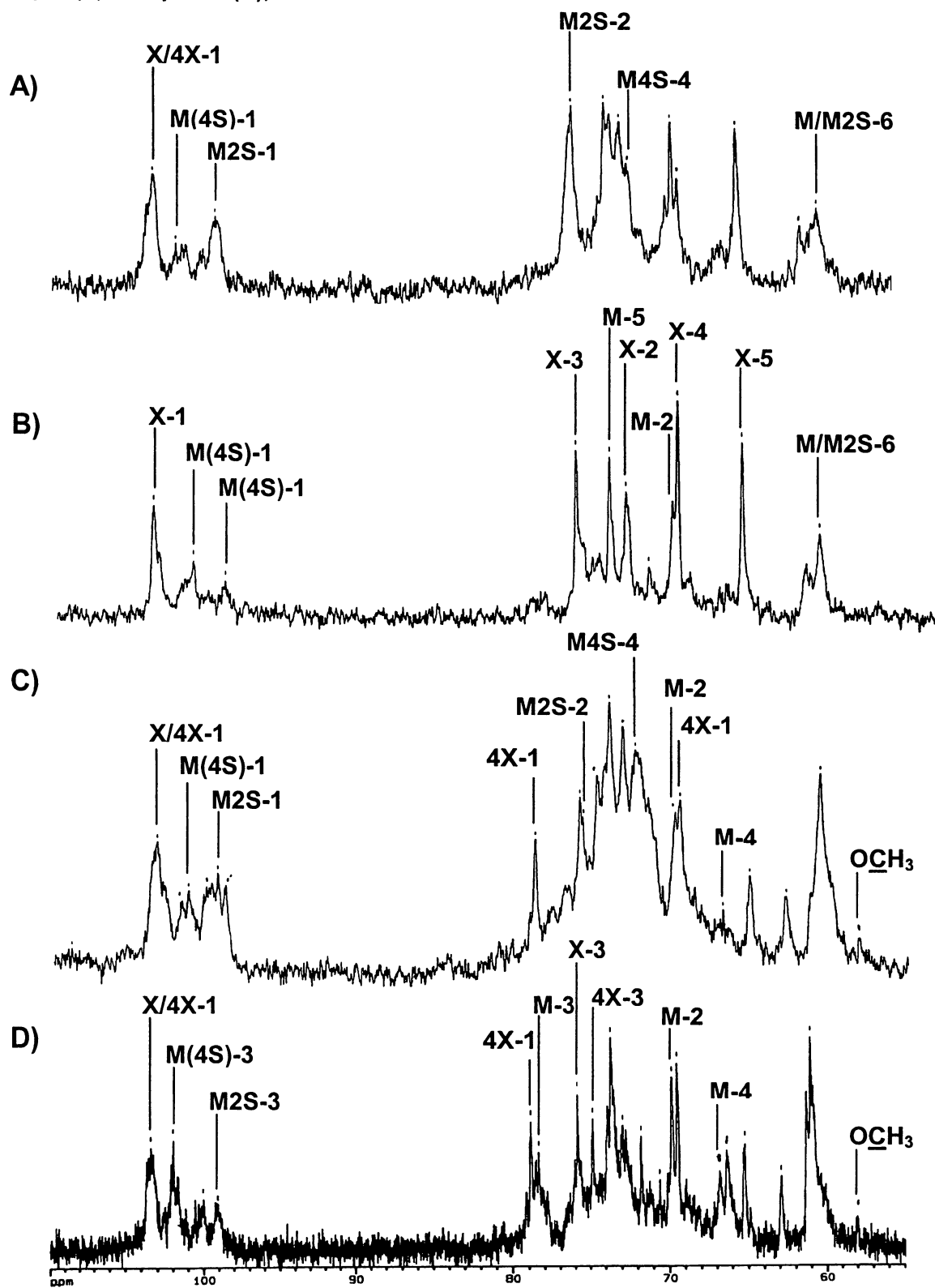
Nas três frações dessulfatadas, o sinal anomérico em 99,0 - 98,8 ppm, atribuído ao C-1 das unidades de α -D-manopiranosose 2-sulfato (TABELA 13), mostrou-se reduzido, principalmente em Gmp-Bds e TFp-Cds (FIGURAS 24 e 25). Os sinais referentes aos C-2 (72,4 - 72,3 ppm) e C-4 (75,8 - 75,4 ppm) sulfatados das unidades de α -D-manopiranosose se apresentaram respectivamente ausentes em Gmp-Bds, reduzido e ausente em TFp-Bds e reduzidos em TFp-Cds (TABELA 13, FIGURAS 24 e 25).

Ainda no espectro da fração Gmp-Bds, cinco sinais em 103,6, 72,7, 76,0, 69,4 e 65,2 ppm apresentaram elevadas intensidades (FIGURA 24, TABELA 13). Tais sinais foram atribuídos aos C-1 (glicosilação), C-2, C-3, C-4 e C-5 (livres) das unidades de β -D-xilopiranosose (USOV et al., 1997) e suas localizações confirmam a posição destas unidades como terminais não redutores. Neste espectro, estavam presentes também os sinais em 73,8, 69,7 e 61,0 ppm (FIGURA 24) referentes aos carbonos 5, 2 e 6 livres da α -D-manopiranosose (TABELA 13).

No espectro da fração TFp-Cds, foi possível observar um aumento na intensidade e na definição do sinal em 69,8 ppm, atribuído ao carbono 2 livre da α -D-manopiranosose e um aumento na intensidade do sinal referente ao carbono 4 livre desta mesma unidade, em 66,3 ppm (FIGURA 24). Ainda nesta fração, o processo de dessulfatação permitiu a visualização do sinal em 78,3 ppm (TABELA 13, FIGURA 24) e a sua atribuição ao C-3 da α -D-manopiranosose (KATZENELLENBOGEN et al., 2001). A localização em campo mais baixo deste sinal mostra seu envolvimento na ligação glicosídica.

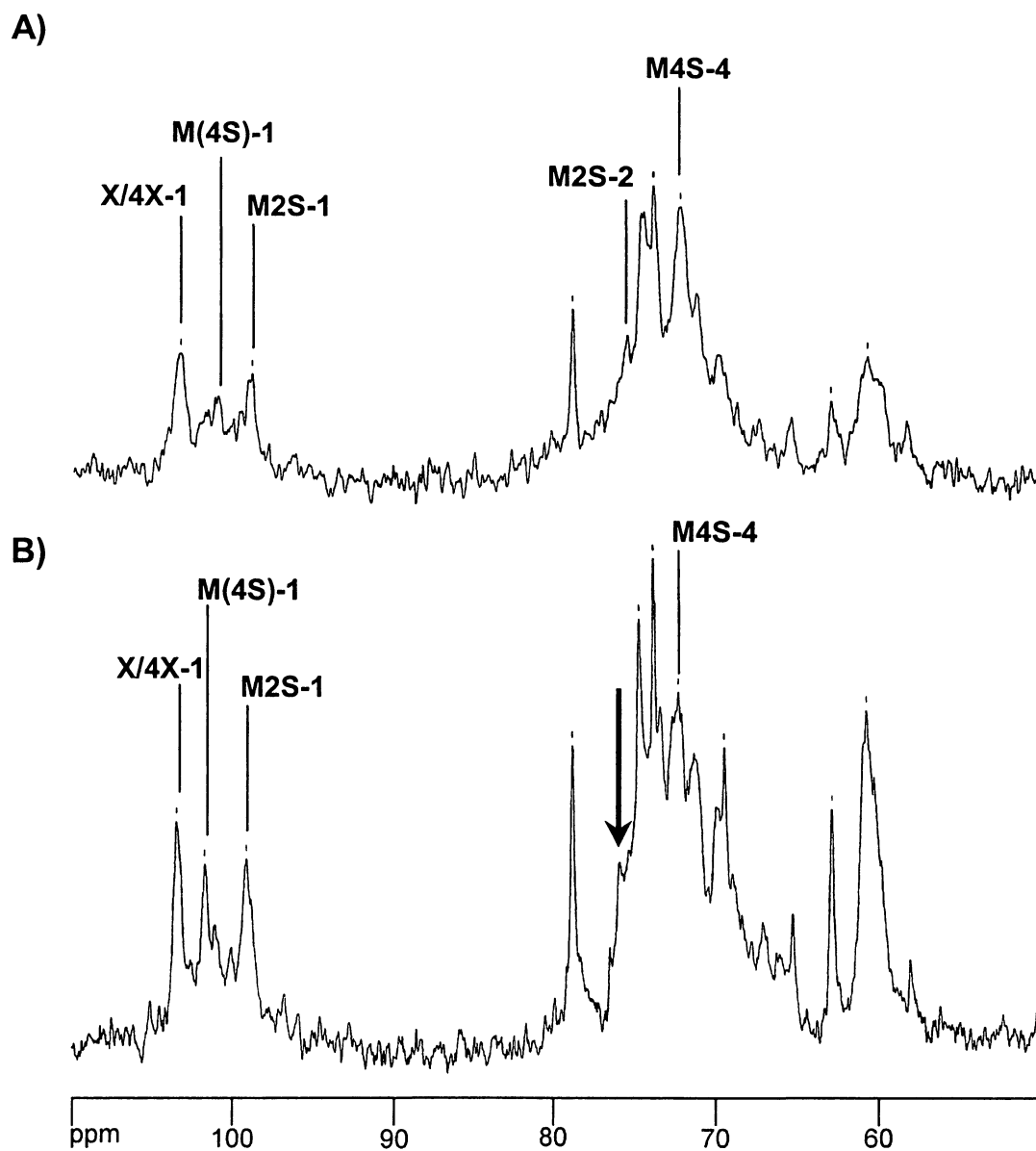
A permanência do sinal em 75,8 ppm na fração TFp-Cds, confirma que este sinal também pode ser atribuído ao C-3 da β -D-xilopiranosose.

FIGURA 24 - ESPECTROS DE RMN DE C^{13} DAS FRAÇÕES GMp-B (C), GMp-Bds (D), Tfp-C (A) E Tfp-Cds (B),



siglas e temperatura de análise como na FIGURA 25.

FIGURA 25 - ESPECTROS DE RMN DE C¹³ DAS FRAÇÕES TFp-B (A) E TFp-Bds (B).



as correspondem as unidades: β -D-xilopiranosse (X), 4-O-metil β -D-xilopiranosse (4X), α -D-manopiranosse 2-sulfato (M2S) e α -D-manopiranosse 4-sulfato (M4S); os números são referentes aos carbonos identificados; seta indica sinal ausente em TFp-Bds; * experimento realizado à 80 °C, com os polissacarídeos dissolvidos em D₂O.

TABELA 13 - ASSINALAMENTOS QUÍMICOS DE RMN DE C¹³* DAS FRAÇÕES DESSULFATADAS GMp-Bds, TFp-Bds E TFp-Cds.

UNIDADE	CARBONO	FRAÇÃO		
		GMp-Bds	TFp-Bds	TFp-Cds
(4-O-metil) β-D-xilopiranoose	C-1	103,6	103,4	103,3
α-D-manopiranoose (4-sulfato)	C-1	101,2	101,7	101,9
α-D-manopiranoose 2-sulfato	C-1	98,8	99,0	99,0
4-O-metil β-D-xilopiranoose	C-4		78,8	78,8
α-D-manopiranoose	C-3			78,3
β-D-xilopiranoose	C-3	76,0		
α-D-manopiranoose 2-sulfato	C-2/C-3			75,8
4-O-metil β-D-xilopiranoose	C-3		74,8	74,8
α-D-manopiranoose (2-sulfato)	C-5	73,8	73,8	73,6
β-D-xilopiranoose	C-2	72,7		
α-D-manopiranoose 4-sulfato	C-4		72,3	72,3
α-D-manopiranoose (4-sulfato)	C-2	69,7		69,8
β-D-xilopiranoose	C-4	69,4	69,4	69,4
α-D-manopiranoose (2-sulfato)	C-4			66,8
β-D-xilopiranoose	C-5	65,2		
α-D-manopiranoose (2-sulfato)	C-6	61,0	60,7	60,9
4-O-metil β-D-xilopiranoose	O-CH ₃		58,0	58,2

* segundo KOLENDER et al., 1995 e 1997; USOV et al., 1997; FALSHAW et al., 1998; KATZENELLENBOGEN et al., 2001.

As frações GMp-B, TFp-B e TFp-C nativas e dessulfatadas foram submetidas à análise de metilação. Para tanto, utilizou-se o método descrito por CIUCANU e KERREK (1984) com os polissacarídeos na forma de sal de trietilamônio (SEVENSON; FURNEAUX, 1991). As frações metiladas foram hidrolisadas (TFA 2M/ 121 °C/ 90') e analisadas por CG-EM.

Desta maneira, as xilomananas constituintes das frações originaram um número de derivados parcialmente metilados, os quais evidenciaram a variedade estrutural destes polissacarídeos (TABELA 14).

Entre os derivados obtidos a partir da fração GMp-B, os mais abundantes foram 2,3,4-tri-O-metil xilose (40,7 mol%) e 2,6-di-O-metil manose (46,4 mol% - TABELA 14). O derivado 2,3,4-tri-O-metil xilose se originou a partir das unidades de xilose e 4-O-metil xilose, presentes no polissacarídeo nativo sob as percentagens de

36,0 e 2,4 mol%, respectivamente, localizadas como terminais não redutores (não substituídas). O derivado 2,6-di-O-metil manose se originou a partir das unidades de manose constituintes da cadeia principal e substituídas em carbonos 3 e 4 (FIGURA 26).

As percentagens quase equimolares destes dois derivados parcialmente metilados (TABELA 14) mostraram que as unidades terminais de xilose glicosilam a cadeia principal através do carbono 4 das unidades de manose. O teor excedente de 2,6-di-O-metil manose (5,7 mol%) corresponderia àquelas unidades de manose sulfatadas em carbono 4, cuja presença foi primeiramente identificada pelas análises de RMN de C¹³.

TABELA 14 - ANÁLISE DE METILAÇÃO DAS FRAÇÕES GMp-B, TFp-B E TFp-C.

DERIVADO METILADO*	FRAÇÃO				
	GMp-B	TFp-B	TFp-Bds	TFp-C	TFp-Cds
2,3,4-tri-O-metil xilose	40,7	44,0	33,2	23,8	23,6
2,4,6-tri-O-metil manose	3,5	17,5	31,8	6,0	26,3
2,6-di-O-metil manose	46,4	34,9	28,8	37,6	39,2
2,4-di-O-metil manose			1,2	3,4	4,4
6-O-metil manose				26,6	3,7
2-O-metil manose	1,9	3,6	5,0	2,6	2,8
Manose	7,5				

* obtidos após hidrólise ácida total (TFA 2M/121 °C/90') mediante cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-EM), em mol%.

O terceiro derivado de maior percentagem detectado foi a manose (7,5 mol% - TABELA 14). Este derivado poderia sugerir a ocorrência de unidades de manose totalmente substituídas. Porém como mostraram as análises de RMN de C¹³, as xilomananas desta fração não apresentam substituição em carbono 6, assim, este derivado pode ser considerado um produto de sub-metilação, podendo estar aqui incluídas, unidades de manose sulfatadas em carbono 2 ou 4. Por esta mesma razão, ao derivado 2-O-metil manose (1,9 mol%), o qual poderia refletir a presença

de unidades de manose substituídas em carbonos 4 e 6, atribuiu-se a mesma origem (TABELA 14).

Ainda o derivado 2,4,6-tri-O-metil manose (1,6 mol% - TABELA 14) revelou a presença, neste polissacarídeo, de unidades de manose desprovidas de qualquer outra substituição que não a glicosídica envolvida na cadeia principal (FIGURA 26). Tais unidades não foram explicitadas nas análises de RMN de C¹³, provavelmente devido ao baixo teor das mesmas.

Para a fração TFp-B foram encontrados três monossacarídeos principais 2,3,4-tri-O-metil xilose (44,0 mol%), 2,6-di-O-metil manose (34,9 mol%) e 2,4,6-tri-O-metil manose (17,5 mol% - TABELA 14). Os mesmos monossacarídeos foram observados na fração TFp-Bds nas proporções de 33,2, 28,8 e 31,8 mol%, respectivamente (TABELA 14).

Nestas frações o derivado 2,3,4-tri-O-metil xilose originou-se a partir das unidades de 4-O-metil xilose e xilose, também localizadas como terminais não redutores (FIGURA 26). A diferença observada entre os teores deste monossacarídeo nas frações metiladas (TABELA 14) também foi observada entre os teores das pentoses nas frações nativas TFp-B e TFp-Bds (TABELA 14) e atribuída, como já mencionado anteriormente, a degradação ocorrida durante o processo de dessulfatação.

As unidades de manose substituídas em carbono 4 (por grupo sulfato ou glicosil) presentes nas frações nativas originaram o derivado 2,6-di-O-metil manose (FIGURA 26). A substituição deste carbono por grupo sulfato foi evidenciada pela redução (6,1 mol%) no teor desta unidade após dessulfatação da fração TFp-B (TABELA 14). Já a substituição por grupo glicosil (4-O-metil xilose ou xilose) foi evidenciada pela manutenção do elevado teor do referido derivado, em percentagem quase equimolar ao do tri-O-metil xilose (TABELA 14).

Por fim, o derivado 2,4,6-tri-O-metil manose originou-se a partir das unidades de manose não substituídas naturalmente presentes, em TFp-B ou geradas a partir da completa remoção de seus grupos sulfato, em TFp-Bds (FIGURA 26). Porém, como mostrado na TABELA 12, a fração TFp-B sofreu somente 12,6% de dessulfatação, assim os elevados teores observados para o monossacarídeo 2,4,6-tri-O-metil manose em ambas as frações, sugerem que uma nova dessulfatação se

processou nesta molécula durante a metilação ou que a dosagem de grupos sulfato para esta fração foi super estimada (TABELA 7).

Ainda, os derivados 2,4-di-O-metil (1,2 mol% em TFp-Bds) e 2-O-metil manose (3,6 mol% em TFp-B e 5,0 mol% em TFp-Bds) foram identificados e considerados como produtos de sub-metilação. Como mostrado na TABELA 14, a metilação das frações TFp-C e TFp-Cds gerou praticamente os mesmos derivados metilados já descritos para as outras frações analisadas.

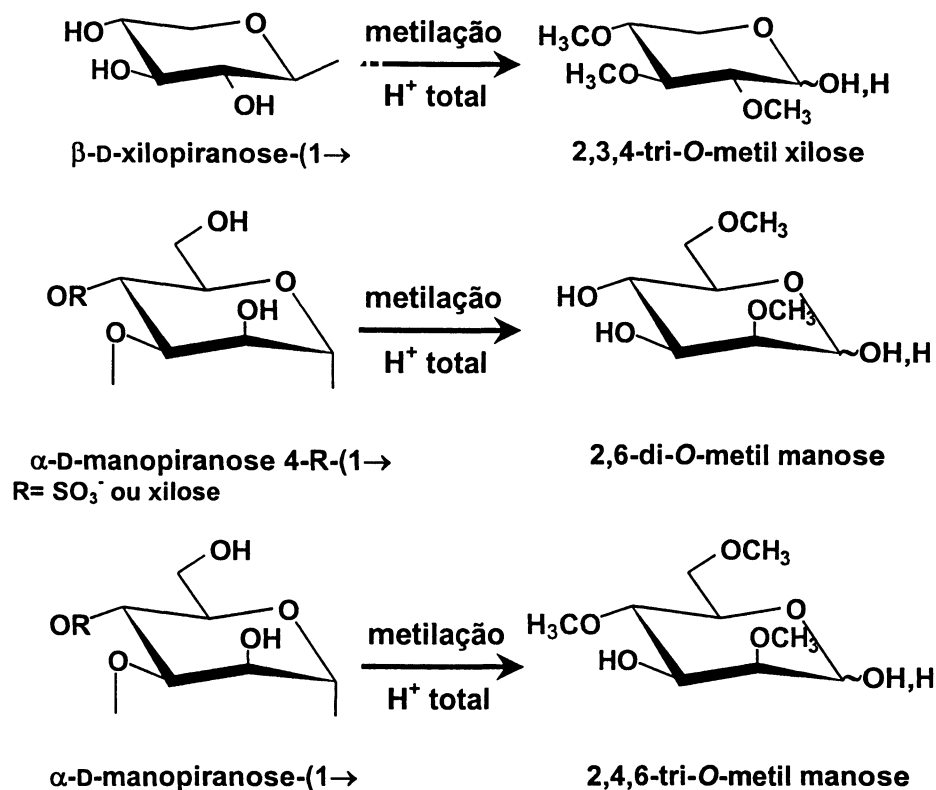
TFp-C e TFp-Cds apresentaram valores muito próximos de 2,3,4-tri-O-metil xilose (23,8 e 23,6 mol%, respectivamente), provenientes, da mesma forma que em TFp-B e TFp-Bds das unidades de 4-O-metil xilose e xilose. A diferença observada entre os teores destes monossacarídeos nas frações metiladas e nas frações nativas (TABELA 14) pode ser atribuída a um processo hidrolítico incompleto destas unidades.

Da mesma forma, o derivado 2,6-di-O-metil manose também apresentou valores próximos entre as frações nativa e dessulfatada (37,6 e 39,2 mol%, respectivamente), mostrando que este monossacarídeo originou-se somente a partir das unidades de manose localizadas como pontos de ramificação (FIGURA 26).

Já o derivado 2,4,6-tri-O-metil manose apresentou, como mostrado na Tabela 13, um aumento de teor entre as frações nativa (6,0 mol%) e dessulfatada (26,3 mol%). Este monossacarídeo representa as unidades de manose naturalmente não substituídas. Em TFp-Cds porém, representa as unidades de manose que sofreram dessulfatação simultânea em carbono 2 e 4. Esta afirmação esta de acordo com a percentagem apresentada pelo derivado 6-O-metil manose, identificado em ambas as frações (TABELA 14), o qual se originou a partir das unidades de manose 2,4-dissulfato (FIGURA 26). Este monossacarídeo apresentou uma redução de 22,9 mol% após dessulfatação, um valor muito próximo aquele observado para o aumento do derivado 2,4,6-tri-O-metil manose (20,6 mol%). A permanência do derivado mono metilado na fração TFp-Cds (3,7 mol%) reflete a dessulfatação incompleta desta molécula.

A identificação dos elevados teores do derivado 2,4,6-tri-O-metil manose tanto na fração nativa como na dessulfatada confirma os resultados de RMN anteriormente apresentados, que mostram o envolvimento do carbono 3 das unidades de manose na ligação glicosídica da cadeia principal.

FIGURA 26 - UNIDADES MONOSSACARÍDICAS PRESENTES NAS XILOMANANAS DAS FRAÇÕES Gmp-B, TFp-B E TFp-C, NATIVAS E DESSULFATADAS E SEUS DERIVADOS PARCIALMENTE METILADOS.



Uma vez estabelecido o padrão de sulfatação das xilomananas constituintes das frações, partiu-se para a confirmação da estrutura da cadeia principal e confirmação do padrão de glicosilação destes polissacarídeos pelas unidades de 4-O-metil xilose e/ou xilose.

Para tanto a fração TFp foi submetida a degradação controlada de Smith, sob condições específicas para polissacarídeos sulfatados como estabelecido por FURNEAUX; STEVENSON (1990). Assim a fração polissacarídica foi solubilizada em água destilada contendo metaperiodato de sódio e após ser mantida em ambiente escuro sob temperatura ambiente durante 48 horas, redução, diálise e

linfofilização, rendeu a fração degradada denominada TFp-S, obtida com 65% de rendimento (TABELA 15).

A análise de composição monossacarídica da fração TFp-S evidenciou o sucesso desta metodologia em promover a remoção das unidades de 4-O-metil xilose e xilose, localizadas como terminais não redutores, uma vez que o polissacarídeo degradado apresentou-se composto majoritariamente por unidades de manose (92,3 mol%). Somando os teores das pentoses somente 5% do total (TABELA 15). Esta metodologia ainda mostrou não ter alterado o grau de sulfatação do polímero, já que 23,2% de sulfato foi determinado para TFp-S, valor muito próximo ao da fração nativa TFp de 25,0% (TABELA 15).

Para obter-se então a cadeia principal linear e neutra do polissacarídeo nativo, parte da fração TFp-S foi submetida a dessulfatação solvolítica, seguindo a mesma metodologia descrita anteriormente. A fração obtida, denominada de TFp-Sds, apresentou 80% de dessulfatação e uma composição monossacarídica extremamente semelhante a da fração TFp-S (TABELA 15).

TABELA 15 - RENDIMENTO, TEOR DE SULFATO E COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES OBTIDAS A PARTIR DE TFp MEDIANTE DEGRADAÇÃO CONTROLADA DE SMITH (TFp-S) E DESSULFATAÇÃO SOLVOLÍTICA (TFp-Sds).

FRAÇÃO	RENDIMENTO (%) [*]	SULFATO (%) ^A	MONOSSACARÍDEOS (mol%) ^b				
			4-me-xil ¹	Xil ²	Man ³	Gal ⁴	Glc ⁵
TFp	-	25,0	15,8	11,1	64,8	6,5	1,8
TFp-S	65	23,2	1,8	3,2	92,3	2,4	0,3
TFp-Sds	45,7	4,5 (80) ^c	1,5	1,1	90,5	2,5	4,4

* para TFp-S: em relação a massa submetida a degradação de Smith (300 mg), para TFp-Sds: em relação a massa submetida a dessulfatação solvolítica (35 mg); ^a determinado segundo DODGSON; PRICE (1961), expresso como NaSO₃; ^b após hidrólise ácida total (TFA 2M, 121 °C, 90') na forma de alditóis acetatos, por CLG; ^c valor entre parênteses corresponde a percentagem de dessulfatação; ¹4-O-metil xilose, ²xilose, ³manose, ⁴galactose, ⁵glucose.

As frações TFp-S e TFp-Sds foram então submetidas a análise de RMN de C^{13} . O espectro obtido para a fração TFp-S, apresentou na região anomérica somente dois sinais, em 101,8 e 98,6 ppm (FIGURA 27). O sinal localizado em 98,6 ppm foi atribuído ao C-1 de unidades de α -D-manopiranoose 2-sulfato, já o sinal em 101,8 ppm ao C-1 das unidades de α -D-manopiranoose não sulfatadas em carbono 2 (TABELA 16). A identificação dos sinais em 75,8 e 72,3 ppm confirmou a presença das unidades de α -D-manopiranoose 2-sulfato e 4-sulfato em TFp-S (TABELA 16).

Diferentemente da fração TFp e como resultado da degradação controlada de Smith, em TFp-S não estavam presentes os sinais referentes ao C-1 das unidades de β -D-xilopiranoose e de 4-O-metil β -D-xilopiranoose (103,4 ppm) e tampouco o referente ao C-4 das unidades de 4-O-metil β -D-xilopiranoose (78,8 ppm - FIGURA 27). Da mesma forma, o sinal em 66,3 ppm presente em TFp-S não se mostrava presente na fração nativa (FIGURA 27). O surgimento deste sinal, referente ao carbono 4 livre de unidades de β -D-manopiranoose, no espectro da fração contendo o polissacarídeo degradado, evidenciou de forma indireta que as unidades de 4-O-metil β -D-xilopiranoose e de β -D-xilopiranoose estavam substituindo a cadeia principal mediante a glicosilação do carbono 4 de algumas unidades de α -D-manopiranoose, como indicaram as análises de metilação. A possibilidade deste sinal ser referente a perda do grupo sulfato por parte de algumas unidades de α -D-manopiranoose 4-sulfato pôde ser descartada mediante o fato da degradação controlada de Smith não ter promovido dessulfatação considerável (TABELA 16).

O espectro de RMN de C^{13} da fração TFp-Sds mostrou-se extremamente simplificado, se comparado àquele da fração nativa, onde um conjunto de seis sinais de elevada intensidade apresentaram um padrão de absorção típico para uma α -D-manana neutra e linear (KATZENELLENBOGEN et al., 2001), a qual representa a cadeia principal da xilomanana constituinte da fração TFp (FIGURA 27). O sinal em 101,9 ppm foi atribuído ao C-1 das unidades de α -D-manopiranoose, enquanto que os sinais em 78,3, 73,6, 69,7, 66,3 e 61,1 ppm foram atribuídos aos carbonos 3 (glicosilado), 5, 2, 4 e 6 (livre), respectivamente. O sinal em 78,3 ppm confirmou que a cadeia principal deste polissacarídeo era uma manana α -(1 \rightarrow 3) ligada.

Ainda no espectro desta fração estavam presentes os sinais de baixa intensidade 99,0, 75,8 e 71,8 ppm (FIGURA 27). Os sinais em 99,0 e 75,8 ppm

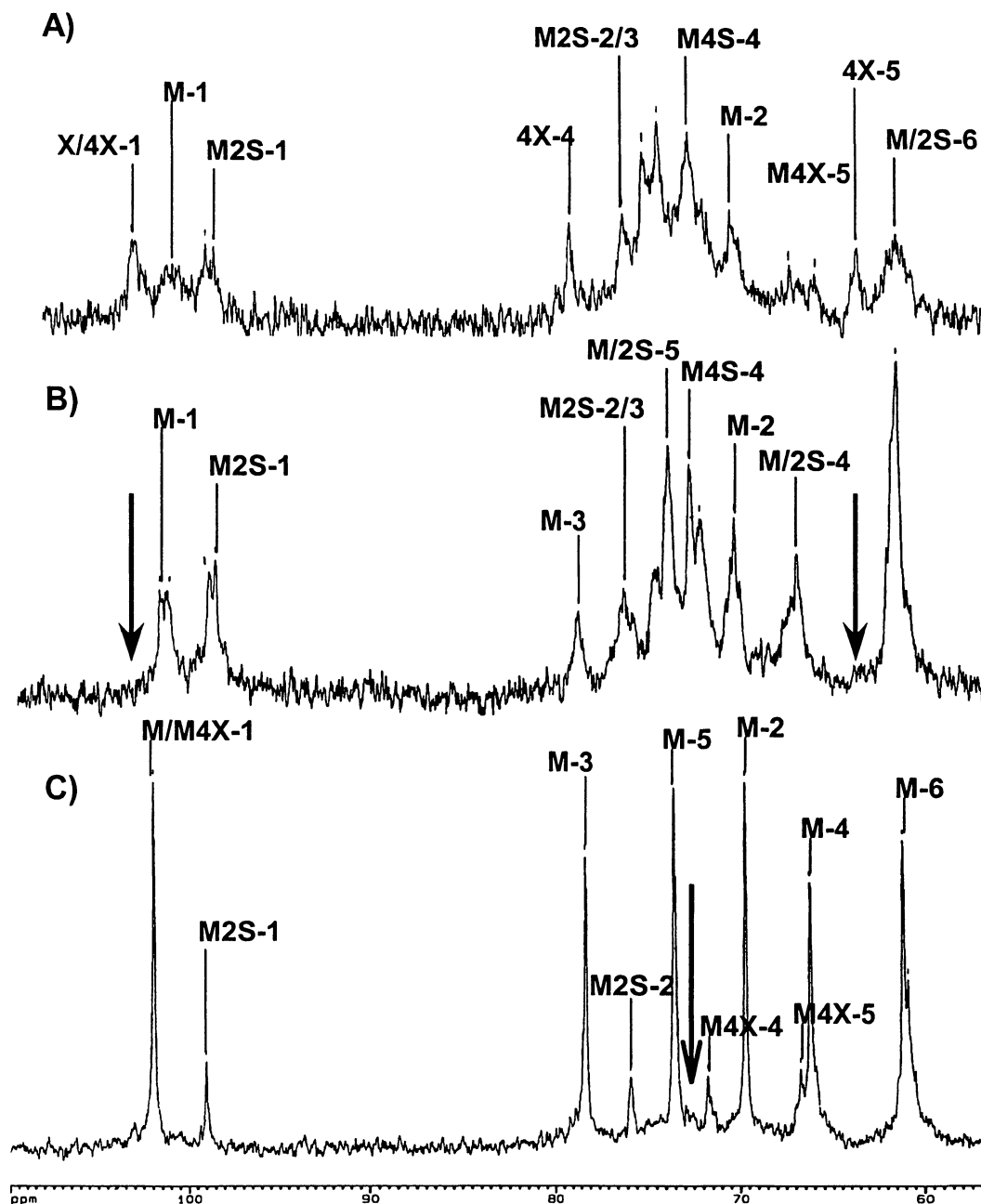
referentes a unidades de α -D-manopirase 2 sulfato, sugeriu que o polissacarídeo não sofreu completa remoção dos grupos sulfato em C-2. Já o sinal em 71,8 ppm, também observado em TFp-S (à 71,7 ppm), foi atribuído ao carbono 4 das unidades de manose glicosiladas por xilose ou 4-O-metil xilose (presente em TFp-S sob a percentagem de 2,6 mol%), cujo carbono anomérico se encontraria sobreposto ao sinal em 101,9 ppm e o carbono 5 em 66,7 ppm (TABELA 16). Este último sinal já era observado no espectro da fração nativa em 66,8 ppm (TABELA 16).

TABELA 16 - ASSINALAMENTOS QUÍMICOS DE RMN DE C¹³* DAS FRAÇÕES TFp, TFp-S E TFp-Sds.

UNIDADE	CARBONO/ PRÓTON	FRAÇÃO		
		TFp	TFp-S	TFp-Sds
(4-O-metil) β -D-xilopiranoose	C-1	103,4		
α -D-manopiranoose 4-sulfato (4-xilose)	C-1 / H-1	101,8	101,8	101,9 / 5,14
α -D-manopiranoose 2-sulfato	C-1	99,0	98,6	
4-O-metil β -D-xilopiranoose	C-4	78,8		
α -D-manopiranoose	C-3 / H-3		78,3	78,3 / 4,24
α -D-manopiranoose 2-sulfato	C-2; C-3	75,8	75,8	
α -D-manopiranoose (2-sulfato)	C-5 / H-5		73,4	73,6 / 4,02
α -D-manopiranoose 4-sulfato	C-4	72,2	72,3	
α -D-manopiranoose	C-3		71,7	71,2
α -D-manopiranoose (4-sulfato)	C-2 / H-2	69,9	69,8	69,7 / 3,83
α -D-manopiranoose 4-xilose	C-5	66,8		66,8
α -D-manopiranoose (2-sulfato)	C-4 / H-4		66,3	66,3 / 3,80
α -D-manopiranoose (2/4-sulfato)	C-6 / H-6;6'	60,6	60,6	60,9 / 3,91; 3,78

* segundo KOLENDER et al. (1995 e 1997); USOV et al. (1997); FALSHAW et al. (1998) e KATZENELLENBOGEN et al. (2001).

FIGURA 27 - ESPECTROS DE RMN DE C^{13} * DAS XILOMANAS CORRESPONDENTES AS FRAÇÕES TFp (A), TFp-S (B) E TFp-Sds (C).

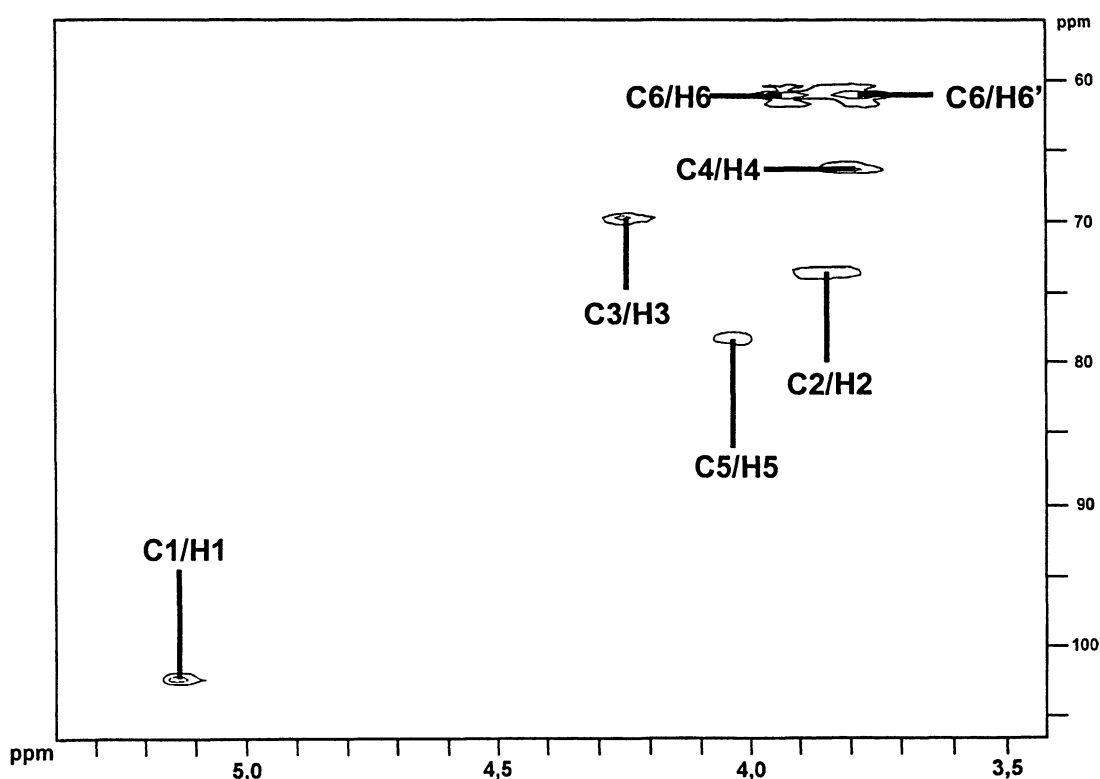


as siglas correspondem as unidades: β -D-xilopiranosse (X), 4-O-metil β -D-xilopiranosse (4X), α -D-manopiranosse 2-sulfato (M2S), α -D-manopiranosse 4-sulfato (M4S) e α -D-manopiranosse 4-xilose/4-O-metil xilose (M4X); números referem-se aos carbonos identificados; setas indicam os sinais ausentes em TFp-S e TFp-Sds; * experimento realizado à 80 °C com os polissacarídeos dissolvidos em D_2O .

A manana da fração TFp-Sds foi também submetida a análise de HMQC, onde somente 6 correlações C^{13}/H^1 foram observadas (FIGURA 28), possibilitando a identificação de todos os prótons desta estrutura (TABELA 16). Os sinais em 71,2 e 66,8 ppm, observados no espectro de RMN de C^{13} da fração TFp-Sds (FIGURA 27) não mostraram correlações nesta análise, sugerindo assim uma estrutura neutra e linear para a manana.

As frações TFp-S e TFp-Sds foram submetidas a análises de metilação, seguindo a mesma metodologia descrita para as frações nativas. Os polissacarídeos presentes nestas frações deram origem aos derivados parcialmente metilados mostrados na TABELA 17.

FIGURA 28 - ESPECTROS DE CORRELAÇÃO HMQC* DA FRAÇÃO TFp-Sds.



* os números referem-se as correlações C^{13}/H^1 identificados; experimento realizado à 80 °C, com os polissacarídeos dissolvidos em D_2O .

TABELA 17 - ANÁLISE DE METILAÇÃO DAS FRAÇÕES TFp-S E TFp-Sds.

DERIVADO METILADO*	FRAÇÃO	
	TFp-S	TFp-Sds
2,4,6-tri-O-metil manose	37,7	75,0
2,6-di-O-metil manose	46,2	12,2
2,4-di-O-metil manose	5,8	6,8
6-O-metil manose	5,8	1,2
2-O-metil manose	4,5	4,8

* obtidos após hidrólise ácida total (TFA 2M/121°C/90') mediante cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-EM), em mol%.

Nenhum derivado referente a pentoses foi encontrado no produto de hidrólise destas frações (TABELA 17), apesar dos baixos teores de 4-O-metil xilose e xilose identificados na composição monossacarídicas destas frações (TABELA 15).

Para a fração TFp-S, os mais abundantes derivados parcialmente metilados foram 2,4,6-tri-O-metil manose (37,7 mol%) e 2,6-di-O-metil manose (46,2 mol%), os quais se originaram a partir de unidades de manose e de manose 4-sulfato, respectivamente. A presença do derivado tri-metilado confirmou a estrutura da cadeia principal deste polissacarídeo (uma manana 3-substituída) e o carbono 4 da manose como ponto de ramificação.

A diferença observada entre os teores de 2,4,6-tri-O-metil manose e a soma das pentoses presentes na fração nativa (cerca de 11%), pode ser atribuída às unidades de manose não substituídas originalmente presentes no polímero ou à unidades que sofreram dessulfatação em carbono 4 durante o processo de degradação, uma vez que, como mostra a tabela 15, o teor de sulfato da fração sofreu uma pequena redução como resultado deste tratamento. As unidades que não perderam seus grupos sulfato originaram o derivado 2,6-di-O-metil manose.

A presença do derivado 6-O-metil manose (5,8 mol%) revelou que todas as unidades de manose sulfatadas em carbono 2, estão também simultaneamente sulfatadas em carbono 4.

Para a fração TFp-Sds observou-se um significativo aumento no teor do derivado tri-metilado (75,0 mol%), acompanhado por uma sensível diminuição nos teores dos derivados 2,6-di-O-metil (12,2 mol%) e 6-O-metil manose (1,2 mol%).

Esta alteração na composição monossacarídica foi resultado do processo solvolítico ao qual a fração TFp-S foi submetida, que resultou na perda da maior parte dos grupos sulfato da molécula, gerando um polímero praticamente neutro (4,5% de sulfato) como evidenciou a análise desta fração por RMN de C¹³ (FIGURA 27).

Os derivados 2,4-di-O-metil e 2-O-metil manose identificados tanto em TFp-S (5,8 e 4,5 mol%, respectivamente) como em TFp-Sds (6,8 e 4,8 mol%, respectivamente) que poderiam sugerir a ocorrência de unidades de manose substituídas em carbono 6, foram considerados como produtos de sub-metilação, uma vez que os espectros de RMN e C¹³ destas frações não mostram sinais que indiquem substituição neste carbono.

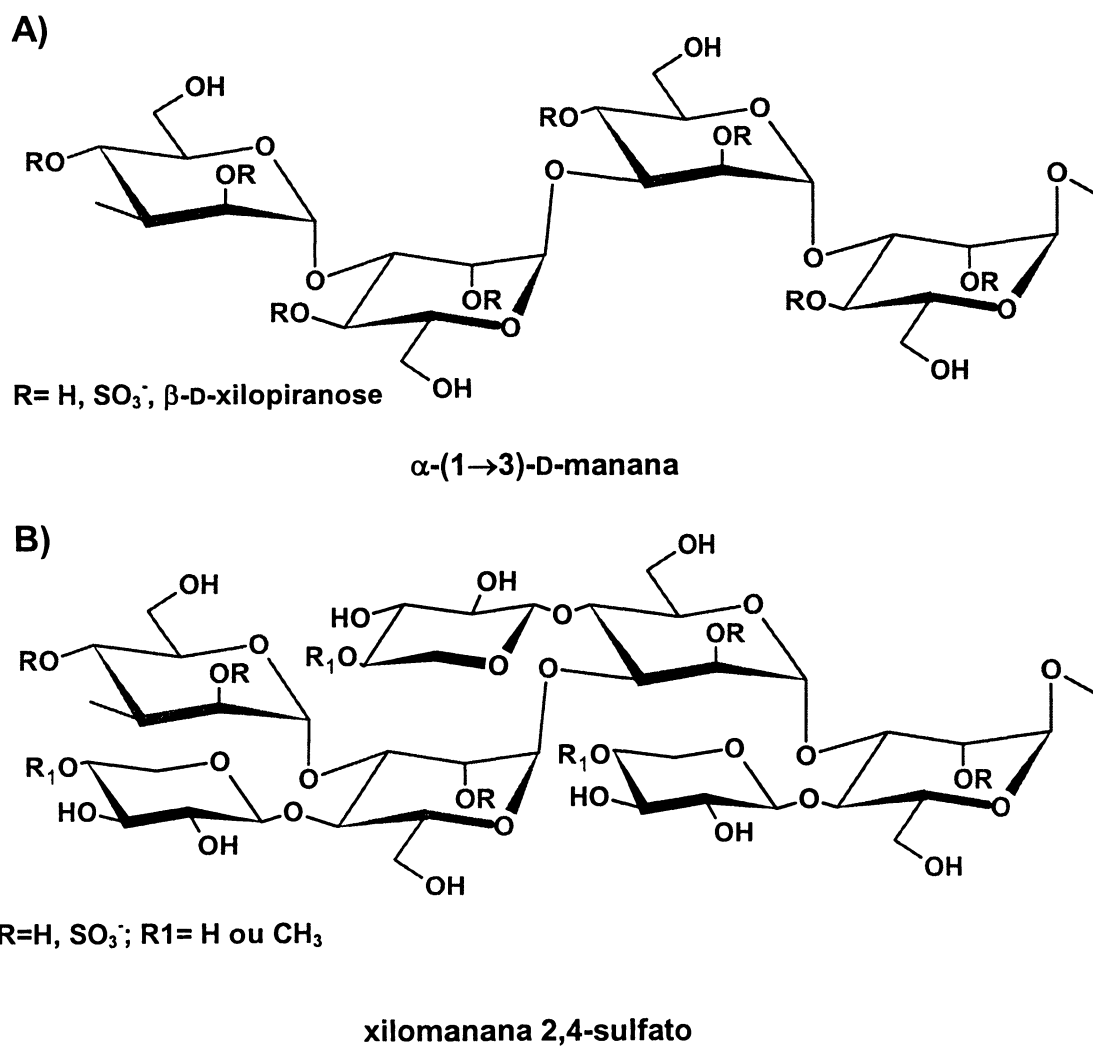
Esta análise confirmou a natureza da cadeia principal da xilomanana presente na fração TFp como uma manana 3-O-ligada, com sulfatação em carbonos 2 e 4 (FIGURA 29A).

Todas estas análises conjuntamente permitiram determinar que as xilomananas biossintetizadas pelas algas *Galaxaura marginata* (GMp) e *Tricleocarpa cylindrica* (TFp) apresentam uma estrutura distinta daquelas isoladas a partir de outras algas vermelhas pertencentes a ordem Nemaliales. As xilomananas GMp e TFp apresentam uma cadeia principal formada por unidades de α -D-manopiranosose 3-O-ligadas, esterificada por grupos sulfato em carbonos 2 e/ou 4 e glicosilada por unidades de 4-O-metil β -D-xilopiranosose e β -D-xilopiranosose em carbono 4 (FIGURA 29B).

As xilomananas isoladas de outras espécies de algas vermelhas, como por exemplo, *Nothogenia fastigiata* (anteriormente denominada *Chaetangium fastigiatum*), também apresentaram uma cadeia principal formada por unidades de α -D-manopiranosose 3-O-ligadas. O padrão de substituição da cadeia principal porém, diferia de GMp e de TFp uma vez que seus grupos sulfato se encontravam esterificando carbonos 2 e/ou 6 das unidades de manose. Como grupos substituintes, somente β -D-xilopiranosose foi encontrada nestes polissacarídeos, glicosilando também o carbono 2 das unidades constituintes da cadeia principal (CEREZO et al., 1971; MATULEWICZ; CEREZO, 1987¹; HAINES et al., 1990; MATULEWICZ et al., 1994; KOLENDER et al., 1995; 1997).

O mesmo padrão estrutural também foi encontrado nas xilomananas isoladas das algas *Nothogenia erinacea* (anteriormente denominada *Chaetangium erinaceum* - NUNN et al., 1973 em MATULEWICZ et al., 1987¹) e *Liagora sp* (USOV; DOBKINA, 1988 em HAINES et al., 1990). Entretanto, a xilomanana isolada da alga *Nemalion vermiculare* difere, de todas as mencionadas, quanto ao padrão de sulfatação, onde estes grupos esterificavam os carbonos 4 e 6 (USOV; YAROTSKII, 1975 em MATULEWICZ et al., 1987¹).

FIGURA 29 - ESTRUTURA APRESENTADA PELA MANANA CONSTITUINTE DA FRAÇÃO TFp-S (A) E DA XILOMANANA CONSTITUINTE DAS FRAÇÕES GMp E TFp (B).



4.2. CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E ESTUDO DA CINÉTICA QUÍMICA DA REAÇÃO DE CICLIZAÇÃO EM GALACTANAS SULFATADAS ISOLADAS DE ALGAS VERMELHAS

Como já mencionado anteriormente, a formação de unidades de 3,6-anidrogactose a partir de unidades precursoras de gactose 6-sulfato por tratamento alcalino é uma importante e bem conhecida reação sofrida pelas galactanas sulfatadas, tanto carragenanas como agaranas (PERCIVAL, 1949; TURVEY, 1965; USOV, 1998). A cinética química desta reação de ciclização tem sido estudada em diferentes modelos estruturais, como lambda- e kappa/iota-carragenanas (CIANCIA et al., 1993), oligossacarídeos derivados de lambda-carragenana (NOSEDA; CERZO, 1995) e porfiranas (NOSEDA, et al. 2000).

Estes trabalhos mostraram que a velocidade da reação de ciclização sofre influência direta da localização dos grupos sulfato na estrutura do polissacarídeo, onde a presença deste grupo no carbono 2 da unidade de β -D-gactose, como em lambda-carragenana, tem um efeito desacelerador (CIANCIA et al., 1993), enquanto que no carbono 4, como em carragenanas da família kappa (μ - e ν -carragenanas), acelera a reação de ciclização (CIANCIA et al., 1993).

Como descrito na literatura, as algas vermelhas *Eucheuma denticulatum* e *Furcellaria lumbricalis* caracterizam-se por biossintetizarem galactanas sulfatadas do tipo carragenana. A primeira alga citada é conhecida por produzir uma carragenana híbrida onde estruturas dos tipos ν - e iota- (TABELA 1) ocorrem simultaneamente, estando porém, a iota-carragenana, presente de forma predominante (ANDERSON et al., 1973; SANTOS, 1989; AGUILAN et al., 2003). A segunda alga citada, produz uma kappa-carragenana parcialmente dessulfatada, equivalente a uma galactana híbrida kappa/beta-carragenana (TABELA 1), estando também presentes unidades precursoras (gactose 6-sulfato) atribuídas a gamma-carragenana, esta estrutura polissacarídica complexa é genericamente denominada de furcellarana (KNUTSEN; GRASDALEN, 1987; KNUTSEN et al., 1990; TRUUS et al., 1997).

Baseando-se nisso, os polissacarídeos biossintetizados por estas algas se mostraram como modelos estruturais interessantes para utilização nos estudos de cinética química da reação de ciclização, uma vez que este estudo não foi realizado em gamma-carragenana, uma estrutura desprovida de grupos sulfato (equivalente a

porfirana), bem como em mu- e nu-carragenana, separadamente, mas somente com frações contendo uma mistura destes dois polissacarídeos (CIANCIA et al., 1993).

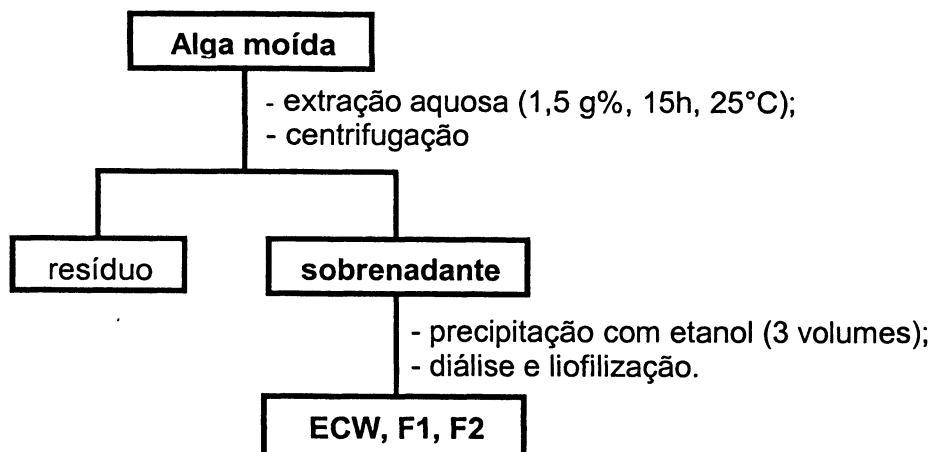
As galactanas sulfatadas a serem utilizadas nos estudos de cinética química da reação de ciclização devem conter um unidades precursoras (galactose 6-sulfato) em teores suficientes para que se possa acompanhar sua ciclização até unidades de 3,6-anidrogactose, e por esta razão, as algas *E. denticulatum* e *F. lumbricalis* foram submetidas à extração aquosa a temperatura ambiente e pH neutro (aproximadamente 6,0), no intuito de se preservar estas unidades naturalmente presentes nos polissacarídeos. Como pode ser observado nos trabalhos previamente realizados com estas mesmas espécies de algas vermelhas, extrações utilizando altas temperaturas ou condições alcalinas renderam estruturas altamente ciclizadas, como observado mediante os elevados teores de 3,6-anidrogactose apresentados nestes trabalhos (ANDERSON et al., 1973; SANTOS, 1989; TRUUS et al., 1997).

4.2.1. EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS SULFATADOS

As algas *E. denticulatum* e *F. lumbricalis* foram separadamente submetidas ao mesmo procedimento de extração, onde o material seco e moído foi submetido à extração aquosa (5g% p/v) a temperatura ambiente (25°C, 14 horas). Após centrifugação do extrato aquoso (10.000 rpm, 15 minutos) fração sobrenadante foi submetida a precipitação com etanol absoluto (3 volumes), como mostrado na FIGURA 30.

Desta forma, a partir da alga *E. denticulatum* foi obtida a fração polissacarídica denominada ECW, de elevado rendimento (24,0 %) e a partir da alga *F. lumbricalis*, foi obtida a fração denominada F1, cujo baixo rendimento obtido (0,82 %) motivou um segundo processo de extração, seguindo as mesmas condições descritas, obtendo-se assim a fração F2, com 0,75 % de rendimento (TABELA 18).

FIGURA 30 - FLUXOGRAMA DE EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS DAS ALGAS *Euclima denticulatum* E *Furcellaria lumbricalis*.



Os valores de rendimento aqui obtidos são baixos se comparados aos obtidos por outros autores, que estudaram estas mesmas espécies anteriormente, os quais atingiram valores de até 50% (KNUTSEN; GRASDALEN, 1987; AGUILAN et al., 2003), tais valores, porém, foram conseguidos mediante extração aquosa a quente (60 – 90 °C), a qual não foi empregada aqui, uma vez que condição mais drástica pode promover alterações estruturais não desejadas no polissacarídeo.

TABELA 18 - RENDIMENTO, ANÁLISES E COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES ECW, F1 E F2.

FRAÇÃO	RENDIMENTO (%) ^a	SULFATO (%) ^b	[α _D ²⁰] (°) ^c	MONOSSACARÍDEOS (mol%)		
				Gal ^d	Angal ^e	Glc ^f
ECW	24,0	30,7	+29,0	63,9	36,1	- ^h
F1	0,82	24,0	- ^g	94,9	3,6	1,5
F2	0,75	25,4	+36,0	96,9	1,5	1,5

^a em relação a massa submetida a extração aquosa (*E. denticulatum* 7,5 g e *F. lumbricalis* 63,0 g); ^b segundo DODGSON e PRICE (1961), expresso como NaSO₃; ^c rotação óptica específica dos polissacarídeos dissolvidos em água (0,2g%); ^d galactose; ^e 3,6-anidrogactose; ^f glucose; ^g não determinado, ^h não detectado.

A composição monossacarídica das frações ECW, F1 e F2 foi determinada utilizando-se um método hidrolítico específico para galactanas sulfatadas, denominado hidrólise redutiva, a qual preserva as unidades de 3,6-anidrogactose, uma vez que tais unidades se mostram lábeis a condições fortemente ácidas (STEVENSON; FURNEAUX, 1991; FALSHAW; FURNEAUX, 1994).

Análise por CLG então revelou que todas as frações eram compostas majoritariamente por galactose (63,9 – 96,9 mol%) e 3,6-anidrogactose (1,5 – 36,1 mol%), como mostrado na TABELA 18. Ainda, unidades de glucose foram detectadas nas frações F1 e F2 (TABELA 18), sendo a presença deste monossacarídeo atribuída a uma contaminação por amido das florídeas, o polissacarídeo de reserva das algas vermelhas. O teor de glucose contaminante nestas frações se revelou mais elevado (33,5 e 17,8 mol%), quando estas frações foram hidrolisadas sob condições mais fortes (TFA 2M).

Esta contaminação em frações polissacarídicas obtidas a partir da alga *F. lumbricalis* é relatada na literatura (KNUTSEN; GRASDALEN, 1987; TRUUS et al., 1997) e provavelmente se deve ao fato das plantas terem sido coletadas no mês de setembro, outono no hemisfério norte, época em que o acúmulo desta glucana no tecido vegetal é alto (KNUTSEN; GRASDALEN, 1987). Possivelmente, a ausência de glucose na fração ECW possa ter a mesma explicação, assim a alga *E. denticulatum*, provavelmente tenha sido coletada em um período do ano onde o acúmulo do amido é baixo (inverno, primavera) e desta maneira, os teores de galactose e de seu derivado 3,6-anidro podem ter encoberto o possível teor de glucose presente.

Xilose foi identificada por AGUILAN et al. (2003) e 6-O-metil galactose e 2-O-metil 3,6-anidrogactose por TRUUS et al. (1997) entre os produtos de hidrólise dos polissacarídeos isolados de *E. denticulatum* e de *F. lumbricalis*, respectivamente, porém tais monossacarídeos não foram aqui encontrados entre os componentes destes polímeros.

As frações ECW, F1 e F2 também se mostraram ricas em grupos sulfato (30,7 - 24,0%) e apresentaram valores positivos de rotação óptica específica, sugerindo que estas frações fossem compostas por galactanas sulfatadas do tipo carragenana (TABELA 18).

4.2.1.1. DETERMINAÇÃO DA ESTRUTURA QUÍMICA DE ECW

A fração ECW foi submetida a análise de RMN de C^{13} visando elucidar sua estrutura química fina. O espectro obtido para esta fração (FIGURA 31) apresentou um grande número de sinais, sendo possível identificar na região anomérica (110 – 90 ppm) quatro picos de absorção, atribuídos ao C-1 das unidades de β -D-galactopiranosose 4-sulfato (104,5 e 102,0 ppm), quando glicosidicamente ligadas a unidades de α -D-galactopiranosose 2,6-dissulfato (98,1 ppm) e de 3,6-anidro- α -D-galactopiranosose 2-sulfato (91,8 ppm), respectivamente (TABELA 19).

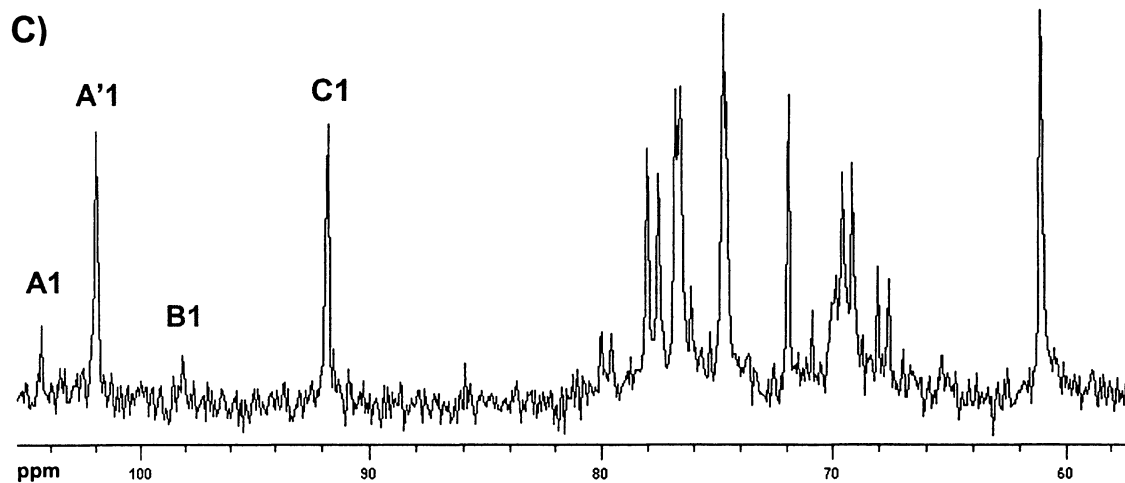
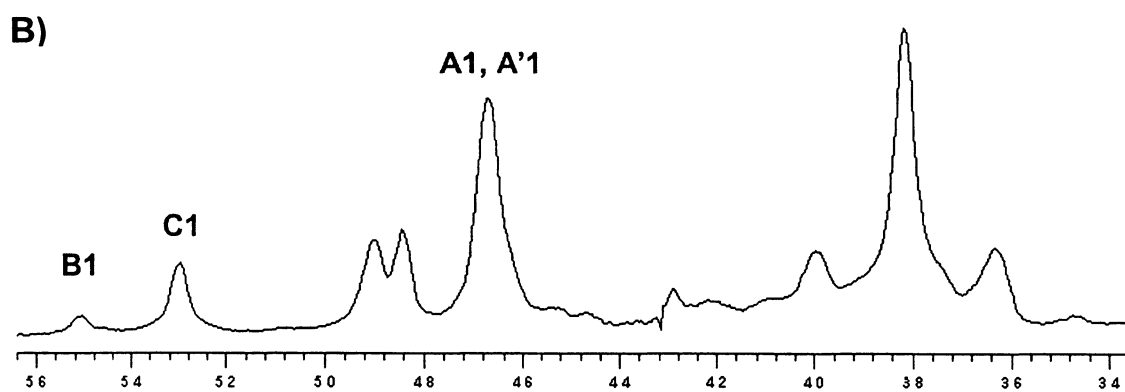
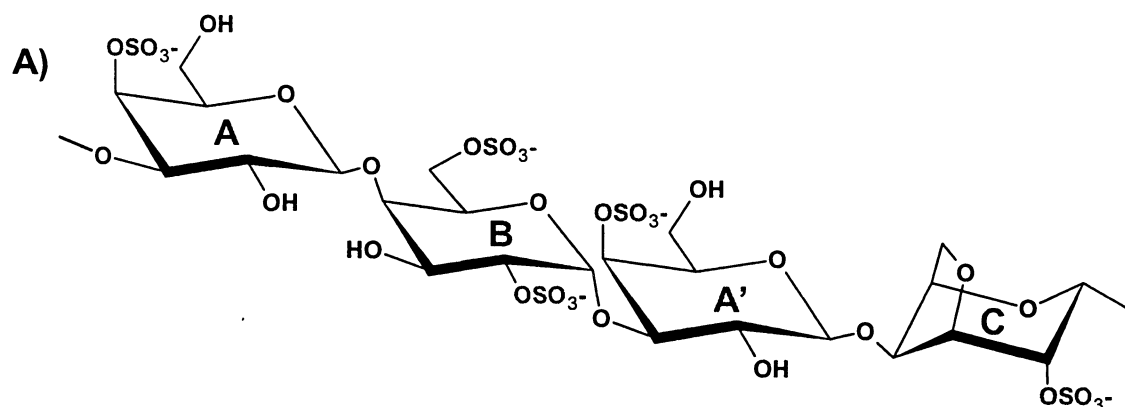
No espectro de RMN de H^1 desta fração, também foram identificados os sinais atribuídos aos H-1 destas mesmas unidades monossacarídicas em 4,67, 5,51 e 5,30 ppm, respectivamente (FIGURA 31).

Estes assinalamentos estão de acordo com os já relatados na literatura para nu- e iota-carragenana, onde os sinais em 104,5 e 98,1 ppm e 4,67 e 5,51 ppm são referentes ao dissacarídeo repetitivo constituinte da primeira estrutura citada e os sinais em 102,0 e 91,8 ppm e 4,67 e 5,30 ppm ao da segunda estrutura citada (STORTZ; CERESO, 1993; FALSHAW et al., 1996; VAN DE VELDE et al., 2002; AGUILAN et al., 2003) como mostrado na FIGURA 31 e na TABELA 19.

A TABELA 19 apresenta o completo assinalamento para os demais carbonos de cada unidade monossacarídica constituinte desta estrutura, o qual se mostra de acordo com aqueles apresentados por outros autores (STORTZ; CERESO, 1994; FALSHAW et al., 1996; VAN DE VELDE et al., 2002).

A identificação destes dois padrões em uma mesma estrutura polissacarídica se deve ao fato, já conhecido, da nu-carragenana ser o precursor biológico da iota-carragenana (REES, 1969; GREER; YAPHE, 1984).

FIGURA 31 – ESTRUTURA QUÍMICA (A) E ESPECTROS DE RMN* DE H¹ (B) E C¹³ (C) DA CARRAGENANA CONSTITUINTE DA FRAÇÃO ECW.



as letras correspondem as unidades identificadas: A, A' - β -D-galactopiranosse 4-sulfato, B - α -D-galactopiranosse 2,6-dissulfato, C - 3,6-anidro- α -D-galactopiranosse 2-sulfato; os números correspondem aos carbonos ou prótons identificados; * experimento realizado à 70 °C com os polissacarídeos dissolvidos em D₂O.

TABELA 19 - ASSINALAMENTOS QUÍMICOS DE RMN DE C¹³ DAS FRAÇÕES ECW (NU/IOTA-CARRAGENANA) E ECWTA (IOTA-CARRAGENANA).

FRAÇÃO	UNIDADE DISSACARÍDICA	ASSINALAMENTOS (ppm)*					
		C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
ECW	3-O-β-D-Galp-4-S ^a	104,5	69,9	79,7	70,9	74,6	61,1
	4-O-α-D-Galp-2,6-S ^b	98,1	76,2	68,1	- ^d	68,1	67,7
	3-O-β-D-Galp-4-S	102,0	69,1	76,6	72,0	74,6	61,1
	4-O-3,6-An-α-D-Galp-2-S ^c	91,8	74,8	77,6	78,1	76,8	69,6
ECWTA	3-O-β-D-Galp-4-S	102,2	69,4	76,8	72,1	74,8	61,3
	4-O-3,6-An-α-D-Galp-2-S	92,0	74,9	77,8	78,2	77,1	69,7

* de acordo com STORTZ; CERESO, 1994; FALSHAW et al., 1996; VAN DE VELDE et al., 2002; ^a 3-O-substituída-β-D-galactopiranoose-4-sulfato; ^b 4-O-substituída-α-D-galactopiranoose-2,6-dissulfato; ^c 4-O-substituída-3,6-anidro-α-D-galactopiranoose-2-sulfato; ^d não determinado.

Visando-se confirmar o padrão estrutural acima relatado, a fração ECW foi submetida a tratamento alcalino (NaOH 1M; 80°C; 0,5h). Nestas condições as unidades de galactose 2,6-dissulfato são convertidas a unidades de 3,6-anidrogactose 2-sulfato, simplificando, desta maneira, a estrutura do polissacarídeo presente na fração submetida a este tratamento (ECWTA).

A fração modificada ECWTA (80% de rendimento) apresentou-se, desta maneira, composta por galactose e 3,6-anidrogactose em percentagens praticamente equimolares (51,0 e 49,0 mol%, respectivamente – TABELA 20) e ainda altamente sulfatada (24,3% - TABELA 20).

TABELA 20 - RENDIMENTO, ANÁLISES E COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES ECW E ECWTA.

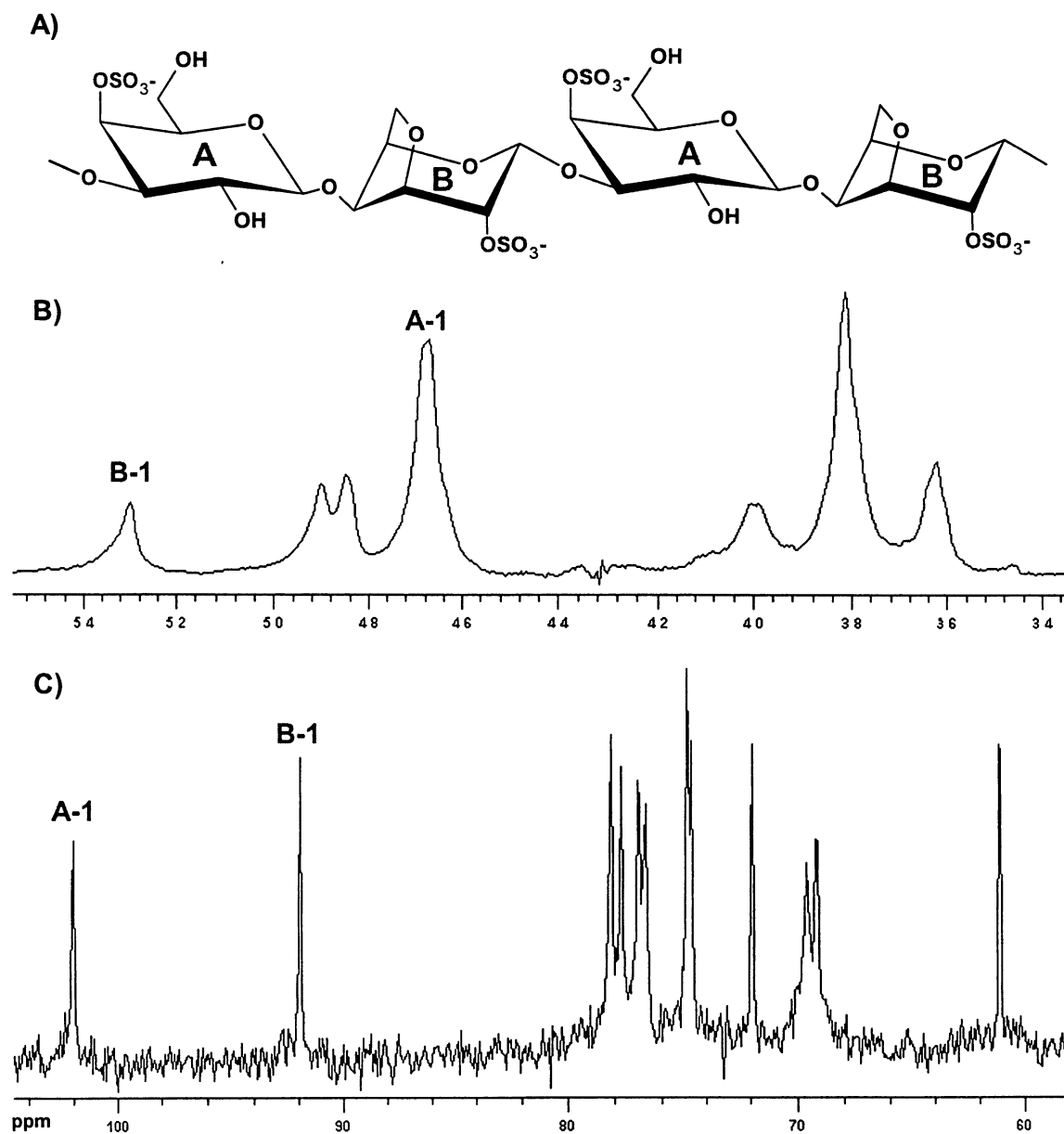
FRAÇÃO	RENDIMENTO (%) ^a	SULFATO (%) ^b	[α_D^{20}] (°) ^c	MONOSSACARÍDEOS (mol%)	
				Gal ^d	Angal ^e
ECW	-	30,7	+29,0	63,9	36,1
ECWTA	80,0	24,3	+16,5	51,0	49,0

^a em relação a massa submetida a tratamento alcalino (100 mg); ^b segundo DODGSON; PRICE (1961), expresso como NaSO₃; ^c rotação óptica específica dos polissacarídeos dissolvidos em água (0,2g%); ^d galactose; ^e 3,6-anidrogactose.

O espectro de RMN de C¹³ obtido para esta fração quando comparado ao da fração nativa (ECW), mostrou-se, como esperado, mais simples (FIGURA 32), com apenas 12 picos de absorção típicos para uma iota-carragenana (VAN DE VELDE et al., 2002; AGUILAN et al., 2003). Na região anomérica, somente dois sinais se mostram presentes, em 102,2 e 92,0 ppm (TABELA 19), os quais foram atribuídos ao C-1 das unidades de β -D-galactopiranosose 4-sulfato glicosidicamente ligadas a unidades de 3,6-anidro- α -D-galactopiranosose 2-sulfato, respectivamente (STORTZ; CERREZO, 1994; FALSHAW et al., 1996; VAN DE VELDE et al., 2002). Da mesma forma no espectro de RMN de H¹ somente os sinais em 4,66 e 5,30 ppm (FIGURA 32) referentes aos prótons anoméricos destas mesmas unidades (FALSHAW et al., 1996) foram identificados.

O completo assinalamento deste polissacarídeo modificado, de acordo com a literatura (STORTZ; CERREZO, 1994; FALSHAW et al., 1996; VAN DE VELDE et al., 2002) é apresentado na TABELA 19.

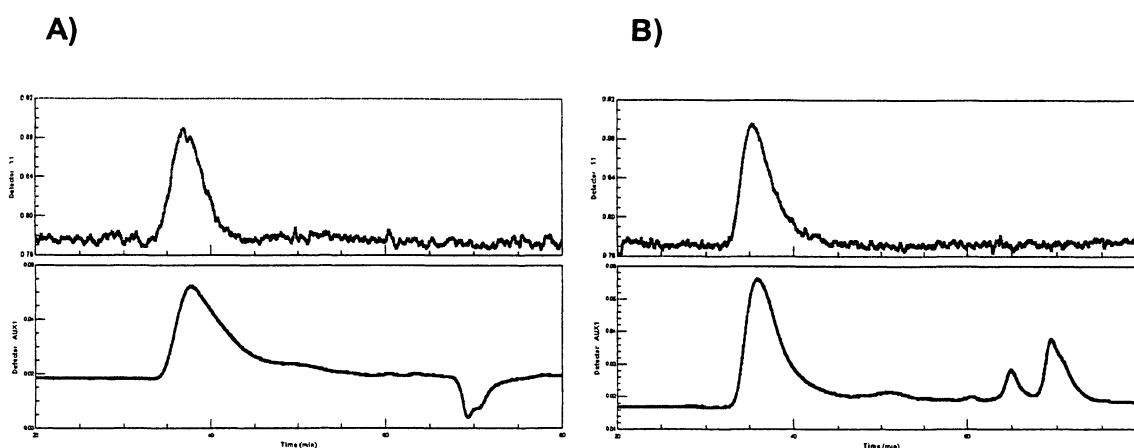
FIGURA 32 - ESTRUTURA QUÍMICA (A) E ESPECTROS DE RMN* DE H¹ (B) E C¹³ (C) DA CARRAGENANA CONSTITUINTE DA FRAÇÃO ECWTA.



as letras A e B referem-se as unidades de β -D-galactopiranosse 4-sulfato e 3,6-anidro- α -D-galactopiranosse 2-sulfato, respectivamente; os números referem-se aos carbonos ou prótons identificados; * experimentos realizado à 70°C com os polissacarídeos dissolvidos em D₂O.

Análises mediante cromatografia de exclusão estérica acoplada a detectores de espalhamento de luz e índice de refração (HPSEC-MALLS) mostraram que ambas as frações, ECW e ECWTA possuíam um caráter homogêneo, compostas majoritariamente por um polímero de elevada massa molecular, o qual apresentou um pico de eluição em aproximadamente 37,5 minutos (FIGURA 33).

FIGURA 33 - PERFIL CROMATOGRÁFICO APRESENTADO PELAS FRAÇÕES ECW (A) E ECWTA (B) MEDIANTE ANÁLISE POR HPSEC-MALLS.



detector 11 (acima): espalhamento de luz, detector auxiliar 1 (abaixo): índice de refração; * experimento realizado com os polissacarídeos dissolvidos em solução de nitrato contendo azida sódica.

Visando obter maiores detalhes quanto à estrutura química fina destes polissacarídeos, as frações ECW e ECWTA foram submetidas à análise de metilação (CIUCANU; KEREK, 1984). A composição monossacarídica dos produtos parcialmente metilados foi determinada por hidrólise redutiva e CG-EM, através de seus tempos de retenção e perfis característicos de fragmentação.

Um mesmo padrão de substituição foi evidenciado para ECW e ECWTA, uma vez que os mesmos derivados foram encontrados no produto de hidrólise de ambas as frações, porém em percentagens distintas (TABELA 21).

TABELA 21 – ANÁLISE DE METILAÇÃO DAS FRAÇÕES NATIVA ECW E MODIFICADA ECWTA.

FRAÇÃO	COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA (mol%)				
	2,6-MeGal ¹	6-MeGal ²	3-MeGal ³	2-MeGal ⁴	AnGal ⁵
ECW	46,9	2,3	10,3	5,1	35,4
ECWTA	46,8	0,8	1,3	2,8	48,3
ligação deduzida	(→3)	(→3) ou (→4)	(→4)	(→3) ou (→4)	(→4)

¹ 2,6-di-O-metil galactose; ² 6-O-metil galactose; ³ 3-O-metil galactose; ⁴ 2-O-metil galactose; ⁵ 3,6-anidrogactose.

Os derivados parcialmente metilados mais abundantes obtidos para a fração ECW foram 2,6-di-O-metil galactose (46,9 mol%), 3,6-anidrogactose (35,4 mol%) e 3-O-metil galactose (10,3 mol% - TABELA 21). Estes derivados originaram-se a partir das unidades de galactose 4-sulfato, 3,6-anidrogactose 2-sulfato e galactose 2,6-dissulfato, respectivamente, presentes no polissacarídeo nativo (FIGURA 34).

Estas percentagens somadas mostram que 93% da estrutura do polissacarídeo constituinte da fração ECW, representa uma típica nu/iota-carragenana híbrida (TABELA 21). Porém 7% da estrutura é representada por unidades não usuais, uma vez que os derivados 6-O-metil e 2-O-metil galactose foram identificadas sob baixas percentagens (2,3 e 5,1 mol%, respectivamente – TABELA 21) e podem sugerir a presença de unidades de galactose 2,4-dissulfato (ou alternativamente galactose 2,3-dissulfato) e galactose 3,6-dissulfato (ou alternativamente galactose 4,6-dissulfato), como mostrado na FIGURA 35.

Esta última unidade de galactose dissulfatada já havia sido relatada anteriormente na literatura (AGUILAN et al., 2003) e juntamente com outras refletem diferentes padrões de sulfatação para esta mesma carragenana (ANDERSON et al., 1973; AGUILAN et al., 2003).

Ainda, baseado nas percentagens detectadas de 3,6-anidrogactose e de 3-O-metil galactose, pôde-se afirmar que aproximadamente 71% da estrutura do polissacarídeo (ou 72% como determinado pela composição monossacarídica) se encontra como iota-carragenana e aproximadamente 21% como a precursora, nu-carragenana.

Estes valores se aproximaram da percentagem obtida mediante integração dos prótons anôméricos referentes às unidades de β -D-galactopiranosose 4-sulfato, α -D-galactopiranosose 2,6-dissulfato e 3,6-anidro- α -D-galactopiranosose 2-sulfato, presentes no espectro de RMN de H^1 desta fração (FIGURA 31), onde estabeleceu-se que 30% do polímero era nu- enquanto que 70% era iota-carragenana.

Para ECWTA, entretanto, somente 2,6-di-O-metil galactose (46,8 mol%) e 3,6-anidrogallactose (48,3 mol%) apresentaram percentagens expressivas (TABELA 21). Estes valores, quando comparados àqueles da fração nativa, refletem a ciclização das unidades de galactose 2,6-dissulfato à 3,6-anidrogallactose 2-sulfato, como consequência do tratamento alcalino.

Baseado na percentagem detectada de 2,6-di-O-metil galactose pôde-se afirmar que aproximadamente 94% da estrutura do polissacarídeo presente na fração ECWTA se encontra como iota-carragenana.

A manutenção dos teores de 3,6-anidrogallactose nos polissacarídeos antes e após metilação (TABELAS 20 e 21) mostra que este processo não causou ciclização das unidades precursoras e desta maneira não alterou a estrutura original apresentada pelas moléculas.

Ainda, a identificação do derivado 3-O-metil galactose (1,3 mol%) na fração modificada (TABELA 21), indica que o processo de ciclização não ocorreu completamente, restando ainda no polissacarídeo algumas unidades de galactose 2,6-dissulfato, cuja ocorrência, muito baixa, não permite sua detecção mediante análise de RMN de C^{13} ou H^1 (FIGURA 32). Este fenômeno também é observado para as unidades presentes no polissacarídeo nativo e tratado, que originaram os derivados 6-O-metil e 2-O-metil galactose, detectados na fração ECWTA sob as percentagens de 0,8 e 2,8 mol%, respectivamente (TABELA 20).

A não detecção destas unidades por RMN de C^{13} ou H^1 , pode explicar a diferença encontrada entre a percentagem estrutural estabelecida para o polissacarídeo da fração ECW, determinada mediante integração dos prótons anôméricos e análise de metilação.

FIGURA 34 – UNIDADES MONOSSACARÍDICAS PARCIALMENTE METILADAS OBTIDAS A PARTIR DAS FRAÇÕES ECW (NU/IOTA-CARRAGENANA) E ECWTA (IOTA-CARRAGENANA).

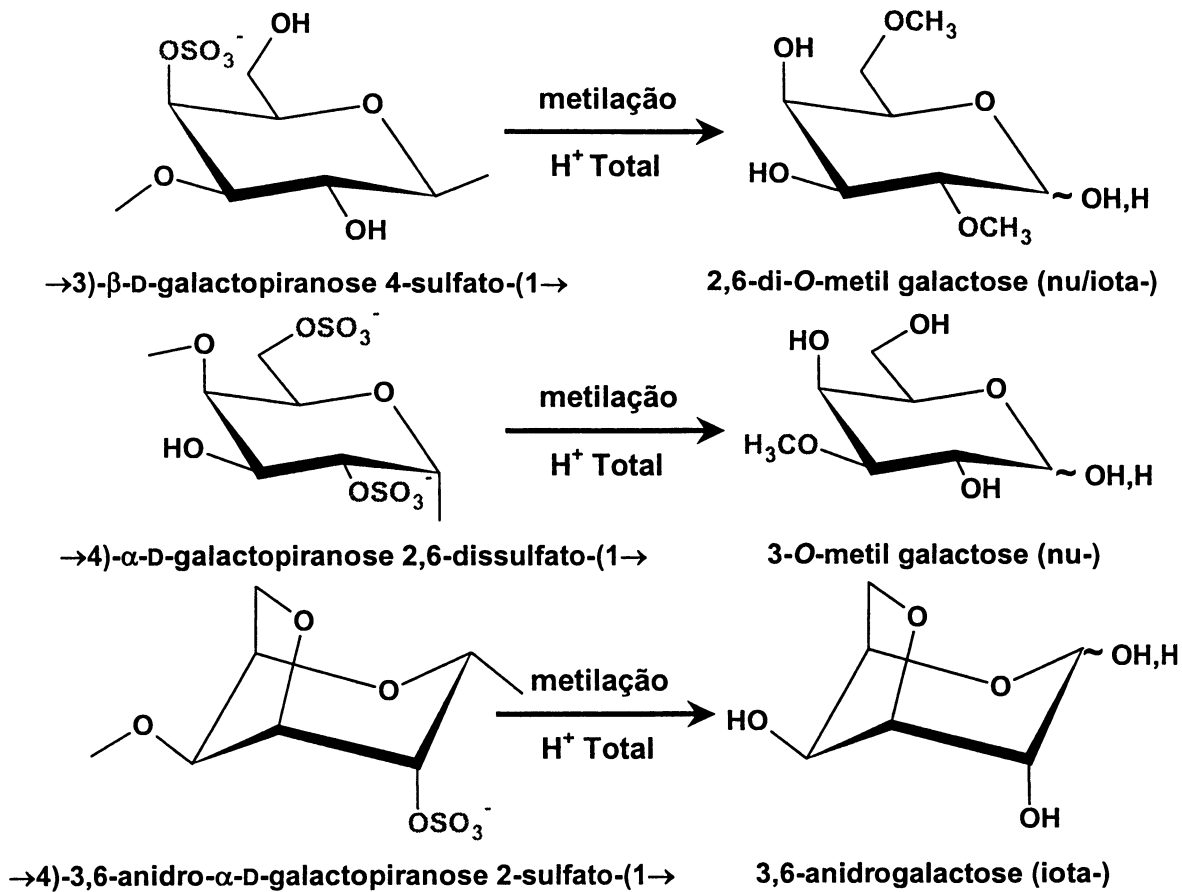
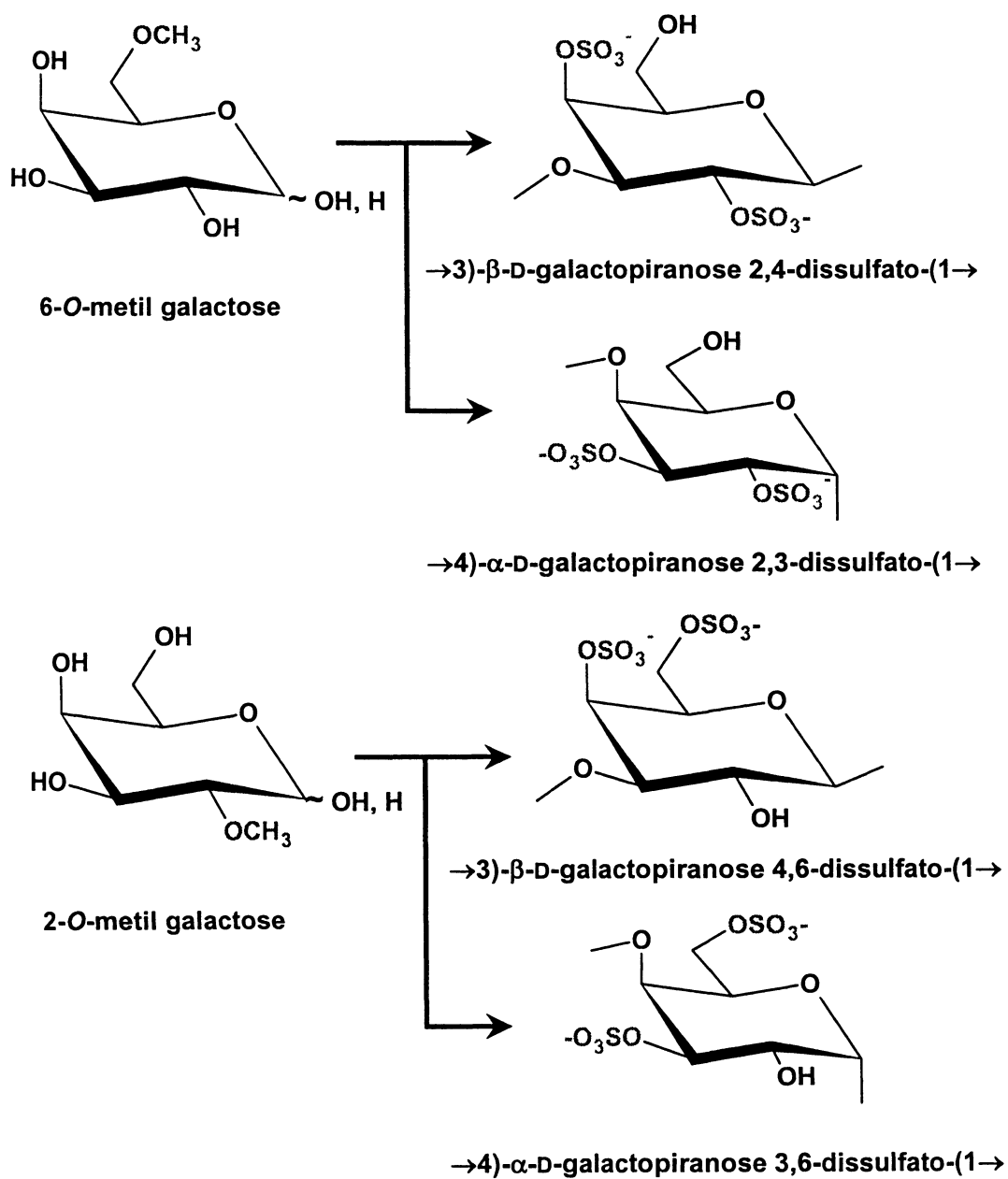


FIGURA 35 - UNIDADES MONOSSACARÍDICAS NÃO USUAIS PRESENTES NOS POLISSACARÍDEOS DAS FRAÇÕES ECW (NU/IOTA-CARRAGENANA) E ECWTA (IOTA-CARRAGENANA).



As frações ECW e ECWTA foram submetidas a análises de infravermelho. Os espectros de FT-IR obtidos para ambas se mostraram extremamente similares, porém um aumento nos picos de absorção em 928,7 e 805,1 cm^{-1} , pôde ser observado no espectro da fração modificada (FIGURA 36).

Estes picos correspondem ao anel 3,6-anidro e ao grupo sulfato ligado ao carbono 2 da unidade de 3,6-anidrogactose, respectivamente (BELLION et al., 1984; SANTOS, 1989; AGUILAN et al., 2003; PRADO-FERNÁNDEZ et al., 2003), como mostrado na TABELA 22.

O aumento observado nestes picos, em ECW-TA, reflete a conversão das unidades de galactose 2,6-dissulfato, presentes no polissacarídeo nativo, para 3,6-anidrogactose 2-sulfato como resultado do tratamento alcalino. Ainda nestes espectros, os sinais em 867 e 830 cm^{-1} , atribuídos aos carbonos 6 e 2 sulfatados do precursor (nu-carragenana), não foram observados, apesar da fração ECW conter 10 % de unidades de galactose 2,6-dissulfato, como determinado pelas análises de metilação (TABELA 21).

FIGURA 36 - ESPECTRO DE FT-IR DAS FRAÇÕES ECW E ECWTA.

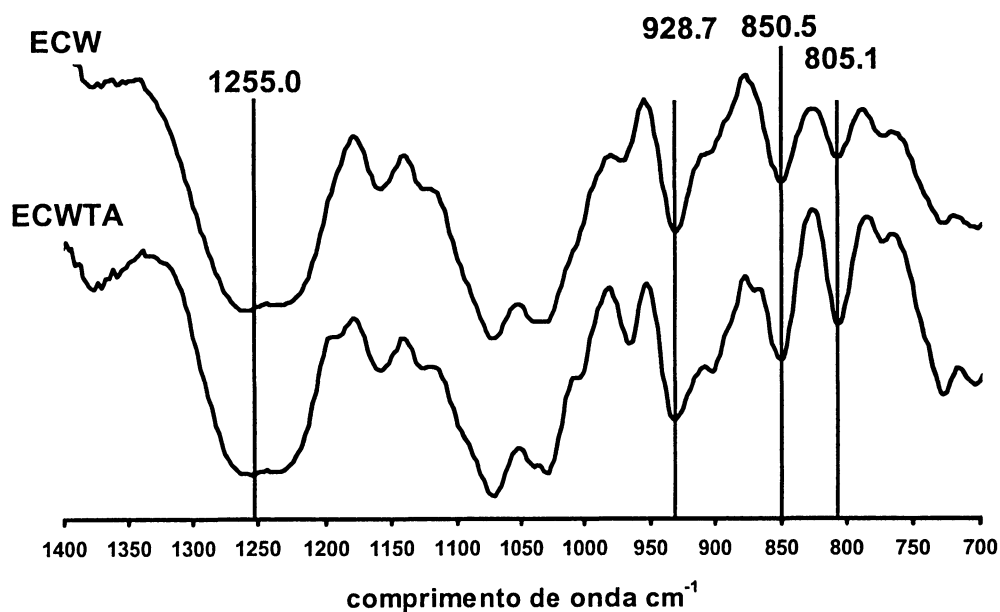


TABELA 22 - PICOS DE ABSORÇÃO OBSERVADOS NOS ESPECTROS DE FT-IR DAS FRAÇÕES ECW E ECWTA E SEUS GRUPOS FUNCIONAIS CORRESPONDENTES.

COMPRIMENTO DE ONDA (cm ⁻¹)	GRUPO FUNCIONAL
1255,0	O=S=O (sulfato total)
928,7	C-O-C (3,6 anidrogactose)
850,5	C-O-SO ₄ (em O axial de C secundário → C-4 da Gal)
805,1	C-O-SO ₄ (em O axial de C secundário da 3,6 Angal)

* de acordo com BELLION et al., 1983; CHOPIN, et al., 1999; PRADO-FERNÁNDEZ et al., 2003.

Desta maneira, a carragenana isolada e caracterizada aqui, a partir da alga *E. denticulatum*, apresenta-se estruturalmente distinta daquelas extraídas da mesma fonte e caracterizadas previamente por outros autores (ANDERSON et al., 1973; SANTOS, 1989; AGUILAN et al., 2003).

4.2.1.2. DETERMINAÇÃO DA ESTRUTURA QUÍMICA DE F1 E F2

As frações F1 e F2 foram submetidas à análise de RMN de C¹³ visando elucidar a estrutura química fina de seus polissacarídeos constituintes. Os espectros de RMN de C¹³ obtidos para estas frações apresentaram baixa resolução, como mostrado na FIGURA 37. Na região anomérica dos espectros de ambas as frações, somente dois sinais foram passíveis de identificação, em 104,3 – 104,4 ppm, atribuídos ao C-1 de unidades de β-D-galactopiranosose e 99,7 – 99,7 ppm atribuídos as unidades de α-D-glucopiranosose (GREER; YAPHE, 1984; KNUTSEN; GRASDALEN, 1987; VAN DE VELDE et al., 2002).

A identificação das unidades de α-D-glucopiranosose nos espectros de F1 e F2, confirmou o caráter heterogêneo destas frações, devido à contaminação por amido das florídeas como inicialmente proposto, mediante análise da composição monossacarídica.

Visando-se purificar as frações F1 e F2, ambas foram submetidas a precipitação fracionada com KCl. Este processo baseia na propriedade apresentada pelas carragenanas de geleificarem na presença de cátions, como o íon potássio, a qual é dependente do teor de unidades de 3,6-anidrogactose e de grupos sulfato presente na molécula (CEREZO, 1967; NOSEDA, 1994; USOV, 1998). Carragenanas com maiores teores de 3,6-anidrogactose e menores de sulfato tendem a geleificar em menores concentrações de potássio.

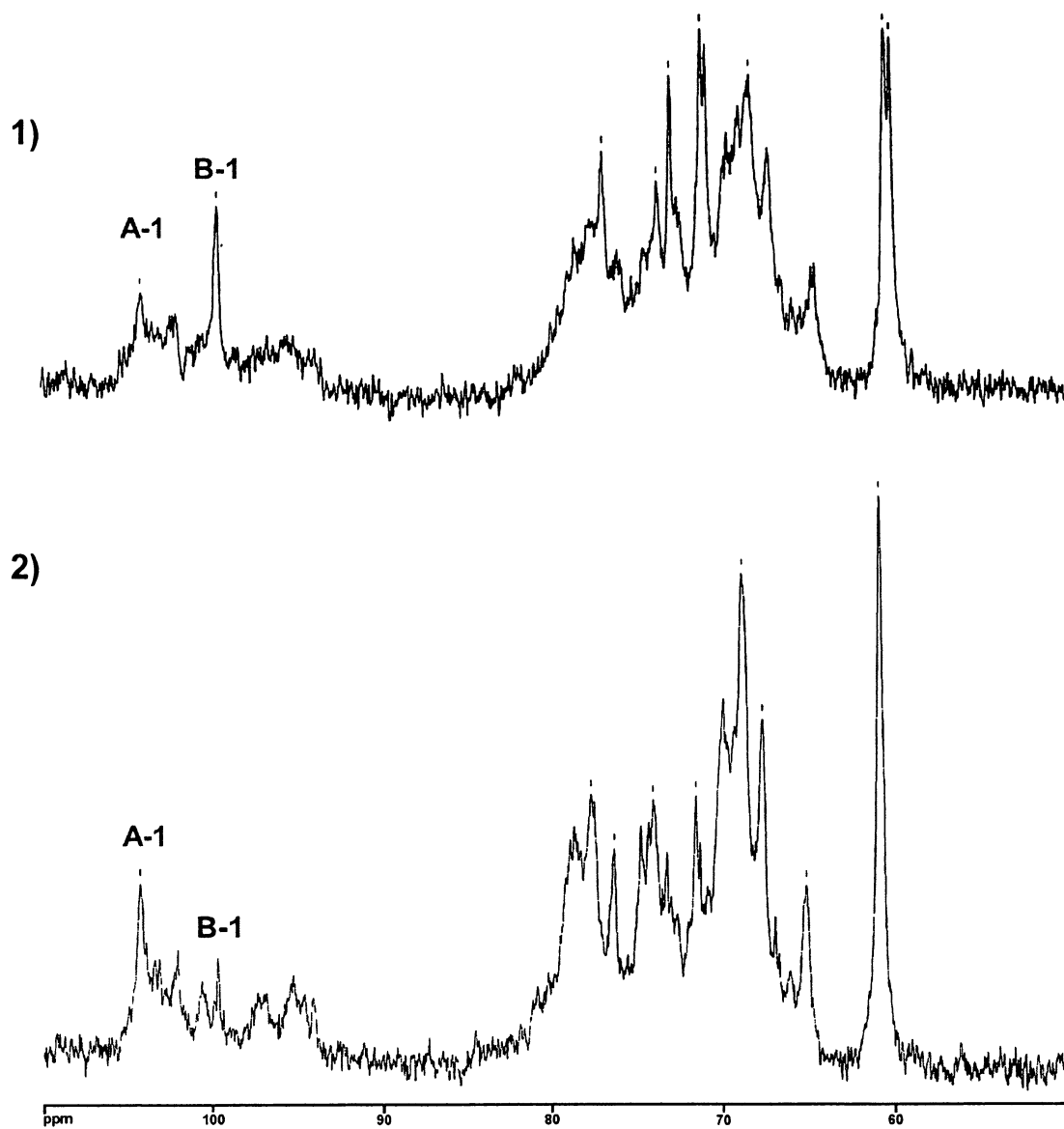
Para tanto, a fração F1 foi ressolubilizada em água e tratada com soluções de concentrações crescentes de KCl (0,15; 0,3; 0,6; 1,0; 1,5 e 2M). Após a adição de cada concentração do sal a solução foi centrifugada, os precipitados dialisados exaustivamente contra água destilada e o sobrenadante submetido a um novo passo de precipitação. Desta maneira sete sub-frações foram obtidas a partir de F1 (TABELA 23).

TABELA 23 - RENDIMENTO, TEOR DE SULFATO E COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS SUB-FRAÇÕES OBTIDAS A PARTIR DE F1 E F2 MEDIANTE TRATAMENTO COM KCl.

FRAÇÃO	[KCl] (M)	RENDIMENTO (%)	SULFATO (%) ^c	MONOSSACARÍDEO (mol%)		
				Gal ^d	Angal ^e	Glc ^f
F1	-	0,82 ^a	24,0	94,9	3,6	1,5
F1A	0,0 - 0,15	2,5 ^b	15,4	71,1	0,0	28,9
F1B	0,15 - 0,3	2,0	16,8	90,0	5,7	4,3
F1C	0,3 - 0,6	1,75	15,8	89,5	4,5	6,0
F1D	0,6 - 1,0	2,25	14,1	86,2	7,6	6,3
F1E	1,0 - 1,5	1,75	16,0	84,2	2,1	13,7
F1F	1,5 - 2,0	-	5,6	76,9	9,0	14,2
FS2	solúvel em 2M	59,2	26,2	85,9	4,2	9,9
F2	-	0,75 ^a	25,4	96,9	1,5	1,5
F2A	0,0-2,0	4,25 ^b	14,0	42,1	4,6	53,3
F2S2	Solúvel em 2M	85,1	30,2	86,5	6,8	6,6

^a em relação a massa algal inicialmente submetida a extração; ^b em relação a massa de polissacarídeo submetida a precipitação fracionada com KCl; ^c segundo DODGSON e PRICE (1961), expresso como NaSO₃; ^d galactose; ^e 3,6-anidrogactose; ^f glucose.

FIGURA 37 - ESPECTROS DE RMN DE C^{13} * OBTIDOS A PARTIR DAS CARRAGENANAS CONSTITUINTES DAS FRAÇÕES F1 (1) E F2 (2).



as letras referem-se as unidades de β -D-galactopiranoose (A) e α -D-glucopiranoose (B); os números referem-se aos carbonos identificados; * experimento realizado à 70 °C com os polissacarídeos dissolvidos em D_2O .

A sub-fração que apresentou maior rendimento foi aquela que continha os polissacarídeos que permaneceram solúveis em KCl 2M (FS2 – TABELA 23), todas as demais frações obtidas sob concentrações inferiores de KCl apresentaram rendimentos desprezíveis. Baseado nisto a fração F2 foi diretamente submetida a tratamento com KCl 2M, obtendo-se desta maneira a fração F2S2 com 85% de rendimento (TABELA 23).

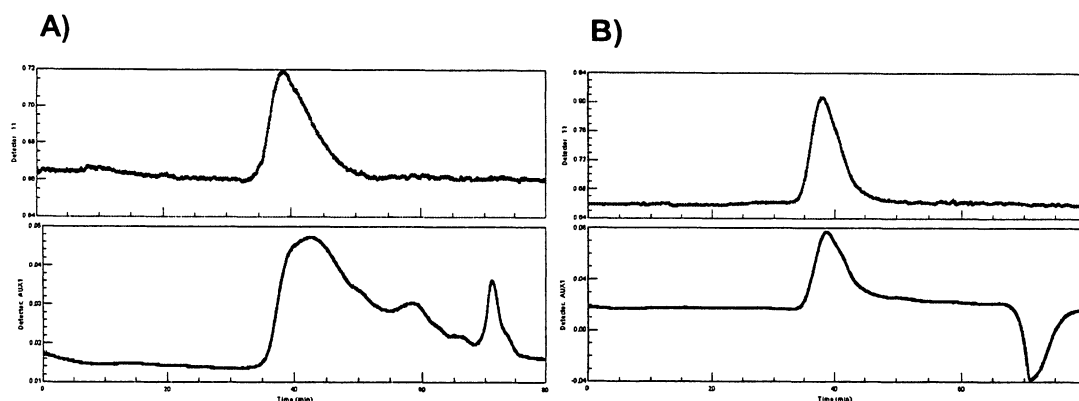
Todas as sub-frações obtidas, de maneira similar às frações de origem, apresentaram a mesma composição monossacarídica: 3,6-anidrogactose (0,0 – 9,0 mol%), gactose (71,1 – 94,9 mol%) e gucose (1,5 – 28,9 mol%). Grupos sulfato também foram detectados em todas as frações (5,6 – 26,2% - TABELA 23).

As duas sub-frações de maiores rendimentos obtidas FS2 e F2S2 foram submetidas a análise por HPSEC-MALLS. Os cromatogramas obtidos mostraram que ambas as frações eram majoritariamente compostas por um polímero de elevada massa molecular, o qual apresentou tempo médio de eluição de aproximadamente 40 minutos (FIGURA 38). A fração FS2 mostrou, ainda por esta análise, um caráter heterogêneo, uma vez que polímeros de baixa massa molecular foram detectados. A fração F2S2, entretanto, mostrou um caráter homogêneo, refletindo assim a eficiência do processo de purificação por precipitação com KCl, o qual também se refletiu mediante análise de composição monossacarídica das sub-frações, uma vez que, como mostrado na TABELA 23, as frações precipitadas com 0,15 e 2,0M concentram a maior parte da gucose contaminante (28,9 e 14,2 mol%).

Quando submetidas a análises de RMN de C¹³ as sub-frações FS2 e F2S2 geraram espectros de resolução superior àqueles obtidos para as frações F1 e F2 (FIGURA 39).

Na região anomérica do espectro da fração FS2 estão presentes os sinais em 104,5, 104,4, 97,5 e 95,8 ppm (TABELA 24). Na mesma região do espectro da fração F2S2 estão presentes sinais semelhantes, localizados em 104,4 e 102,2 ppm (TABELA 24). Nos espectros de ambas as frações ainda estão presentes os sinais em 69,1, 67,9, 67,1 e 61,1 ppm (FS2) e 69,1, 67,8, 67,0 e 61,0 ppm (F2S2).

FIGURA 38 – CROMATOGRAMA DE HPSEC-MALLS APRESENTADO PELAS FRAÇÕES FS2 (A) E F2S2 (B).



detector 11 (acima): espalhamento de luz, detector auxiliar 1 (abaixo): índice de refração; * experimento realizado com os polissacarídeos dissolvidos em solução de nitrito contendo azida sódica.

Os sinais em 104,5 e 104,4 ppm (FS2), foram assinalados como C-1 das unidades de β -D-galactopiranosose e de β -D-galactopiranosose 4-sulfato, constituintes dos dissacarídeos repetitivos da gamma- e da mu-carragenana, respectivamente (GREER; YAPHE, 1984; KNUTSEN; GRASDALEN, 1987; VAN DE VELDE et al., 2002, 2004). Em F2S2, o sinal em 104,4 ppm provavelmente corresponde a sobreposição dos C-1 das mesmas unidades, acima mencionadas.

Já os sinais em 97,5 e 95,8 ppm foram atribuídos ao C-1 das unidades de α -D-galactopiranosose 6-sulfato constituinte dos dissacarídeos repetitivos da mu- e da gamma-carragenana, respectivamente (GREER; YAPHE, 1984; KNUTSEN; GRASDALEN, 1987; VAN DE VELDE et al., 2002, 2004).

O sinal em 102,2 ppm, observado na fração F2S2, por sua vez, se mostrou referente a sobreposição dos carbonos 1 das unidades de β -D-galactopiranosose (beta-) e de β -D-galactopiranosose 4-sulfato (kappa-carragenana - GREER; YAPHE, 1984; KNUTSEN; GRASDALEN, 1987; VAN DE VELDE et al., 2002, 2004).

Ainda os sinais em 67,9 e 67,8 ppm foram atribuídos ao carbono 6 sulfatado das unidades de α -D-galactopiranosse 6-sulfato da gamma- enquanto os sinais em 67,1 e 67,0 ppm ao da mu-carragenana (GREER; YAPHE, 1984; VAN DE VELDE et al., 2002, 2004). Por fim os sinais em 69,1 e 61,0 ppm eram referentes ao C-6 das unidades de 3,6-anidro- α -D-galactopiranosse pertencentes tanto a kappa como a beta-carragenana (GREER; YAPHE, 1984; VAN DE VELDE et al., 2002, 2004).

Estes assinalamentos se mostraram coerentes com o padrão de absorção de uma kappa-carragenana parcialmente dessulfatada, onde estruturas ciclizadas (kappa/beta-) ocorrem juntamente com estruturas precursoras (mu/gamma-), como mostra a FIGURA 40, descrita na literatura (GREER; YAPHE, 1984; KNUTSEN; GRASDALEN, 1987; KNUTSEN et al., 1990; TRUUS et al., 1997).

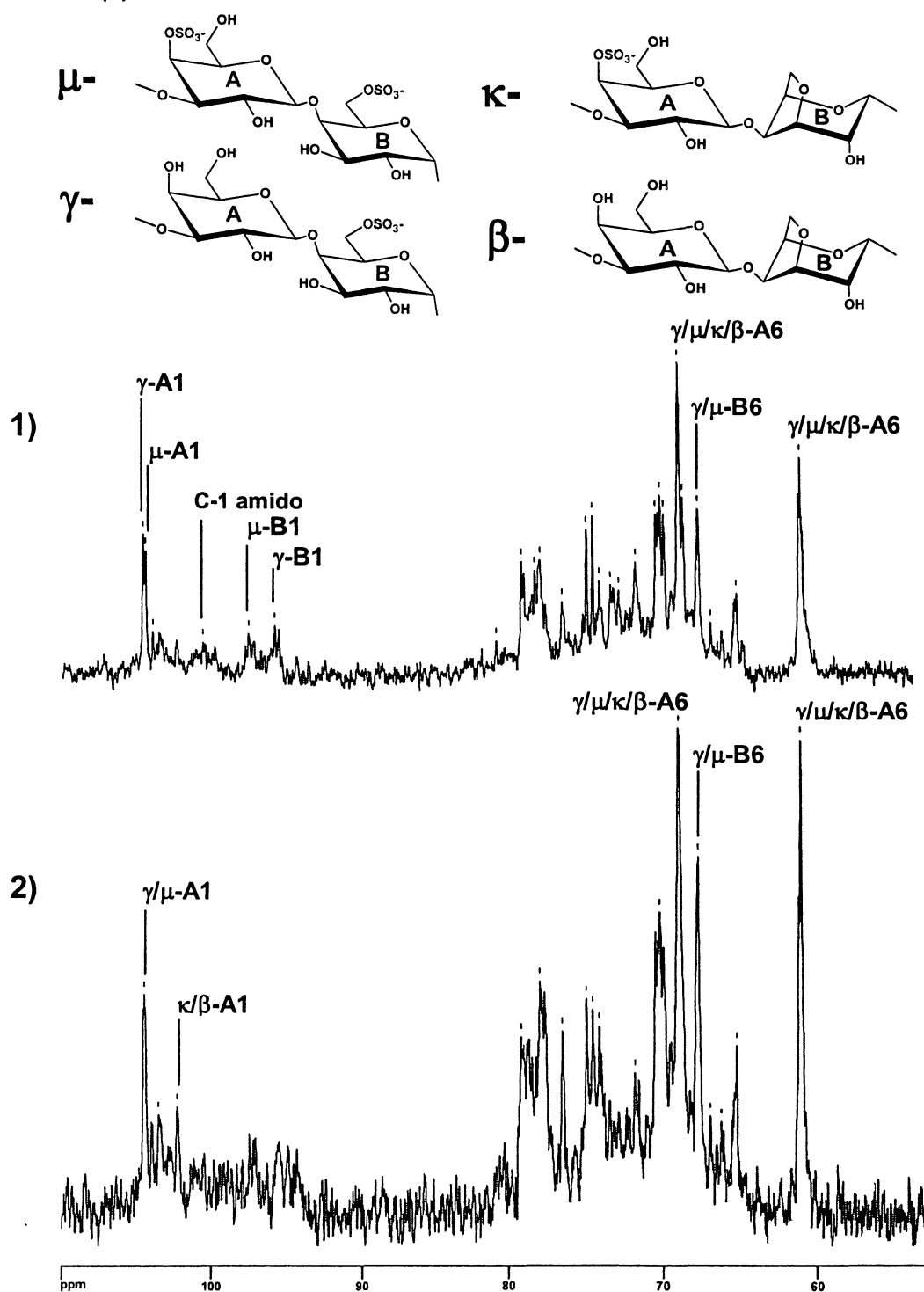
O sinal observado em 100,6 ppm, no espectro da fração FS2, referente ao C-1 das unidades de α -D-glucopiranosse, indica que nela ainda esta presente o amido das florídeas (KNUTSEN; GRASDALEN, 1987; VAN DE VELDE et al., 2002).

TABELA 24 - ASSINALAMENTOS QUÍMICOS DE RMN DE C¹³ DAS FRAÇÕES NATIVAS F1 E F2 E SOLÚVEIS EM KCl 2M FS2 E F2S2.

CARBONO → UNIDADE	ASSINALAMENTOS (ppm)				ESTRUTURA*
	F1	FS2	F2	F2S2	
C-1 β -D-Galp ¹	104,3	104,5	104,4	104,4	Gamma-
C-1 β -D-Galp 4S ²		104,4		104,4	Mu-
C-1 β -D-Galp (4S)				102,2	Kappa-/Beta-
C-1 α -D-Glcp ³	99,7	100,6	99,7		Amido
C-1 α -D-Galp 6S ⁴		97,5			Mu-
C-1 α -D-Galp 6S		95,8			Gamma-
C-6 3,6-An- α -D-Galp ⁵		69,1		69,1	Beta-/Kappa-
C-6 α -D-Galp 6S		67,9		67,8	Gamma-
C-6 α -D-Galp 6S		67,1		67,0	Mu-
C-6 α -D-Galp		61,1		61,0	

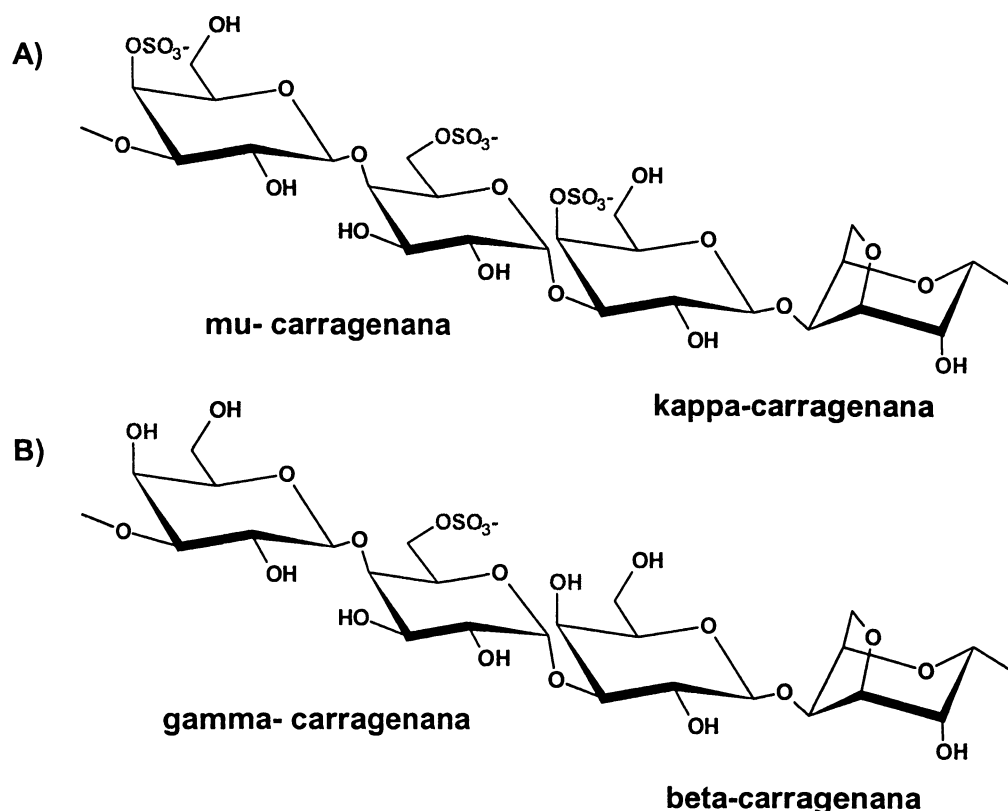
¹ β -D-galactopiranosse; ² β -D-galactopiranosse 4-sulfato; ³ α -D-glucopiranosse; ⁴ α -D-galactopiranosse 6-sulfato; ⁵3,6-anidro- α -D-galactopiranosse; * segundo GREER e YAPHE (1984); KNUTSEN e GRASDALEN (1987); VAN DE VELDE et al. (2002, 2004).

FIGURA 39 - ESPECTROS DE RMN DE C^{13} * OBTIDOS A PARTIR DAS FRAÇÕES FS2 (1) E F2S2 (2).



A: unidades 3-O-substituidas; B: unidades 4-O-substituidas; Os carbonos de cada estrutura são identificados como μ -A_n e μ -B_n para mu-; κ -A_n e κ -B_n para kappa-; γ -A_n e γ -B_n para gamma- e β -A_n e β -B_n para beta-carragenana; * experimento realizado à 70°C com os polissacarídeos dissolvidos em D₂O.

FIGURA 40 - ESTRUTURA APRESENTADA PELA MU/KAPPA- (A) E BETA/GAMMA-CARRAGENANA (B).



Para confirmar a estrutura acima proposta, a fração FS2 foi submetida a tratamento alcalino (NaOH 1M; 80°C; 1,5h) visando-se obter uma fração quimicamente modificada (FS2TA), mediante a conversão das unidades de galactose 6-sulfato para 3,6-anidrogactose.

A fração FS2TA (75% de rendimento), mostrou-se composta por galactose (53,7 mol%) e 3,6-anidrogactose (35,3 mol%) e ainda sulfatada (15,1%).

O espectro de RMN de C^{13} desta fração apresentou-se, quando comparado ao da fração nativa, mais simples (FIGURA 41), devido à inexistência dos sinais referentes às estruturas precursoras e somente contendo os picos de absorção típicos da estrutura de uma kappa/beta-carragenana (GREER; YAPHE, 1984; KNUTSEN; GRASDALEN, 1987; KNUTSEN et al., 1990; TRUUS et al., 1997).

O tratamento alcalino, portanto, eliminou os sinais em 104,5, 104,4, 97,5 e 95,8 ppm presentes na fração nativa, sendo observados na fração modificada os

sinais em 102,2, 95,0 e 94,3 ppm (FIGURA 41). Ainda, os sinais em 67,9 e 67,1 ppm também foram eliminados pelo tratamento alcalino (FIGURA 41).

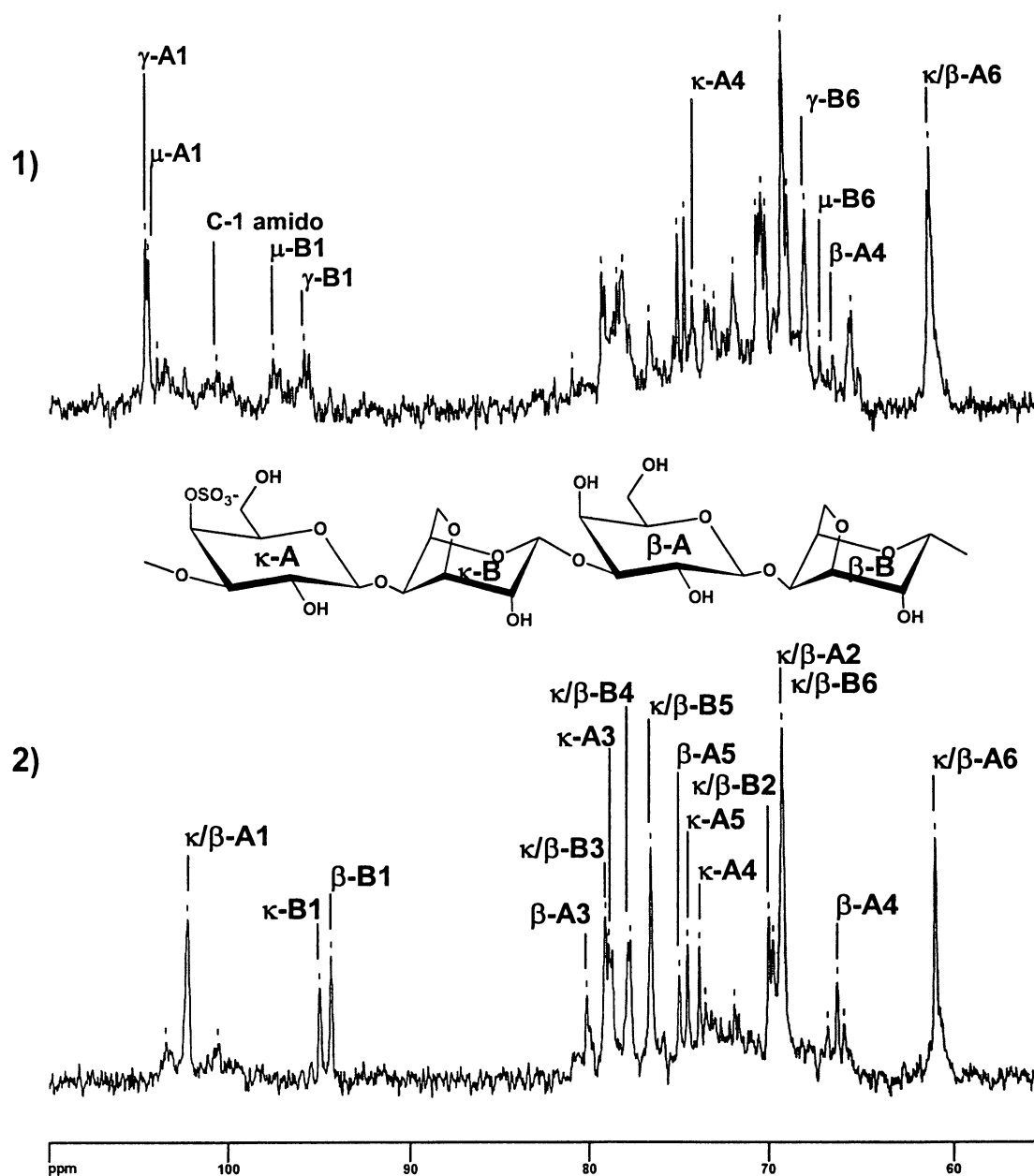
Os sinais em 102,2 e 95,0 ppm, bem como os sinais em 102,2 e 94,3 ppm, se mostraram de acordo com os valores relatados na literatura para os carbonos anoméricos das unidades dissacarídicas repetitivas da kappa- [\rightarrow 3]- β -D-galactopiranosose 4-sulfato-(1 \rightarrow 4)-3,6-anidro- α -D-galactopiranosose-(1 \rightarrow) e beta-carragenana [\rightarrow 3]- β -D-galactopiranosose-(1 \rightarrow 4)-3,6-anidro- α -D-galactopiranosose-(1 \rightarrow), respectivamente (GREER; YAPHE, 1984; KNUTSEN; GRASDALEN, 1987; VAN DE VELDE et al., 2002, 2004).

Os sinais em 73,8 e 66,2 ppm observados no espectro da fração modificada, e atribuídos ao C-4 sulfatado da unidade de β -D-galactopiranosose 4-sulfato e ao C-4 livre da β -D-galactopiranosose (GREER; YAPHE, 1984; KNUTSEN; GRASDALEN, 1987; VAN DE VELDE et al., 2002, 2004), respectivamente encontrados na kappa- e na beta-carragenana, já se mostravam presentes na fração nativa (73,4 e 66,2 ppm) e confirmaram a estrutura proposta para os polissacarídeos constituintes das frações FS2 e FS2TA (TABELA 25). O assinalamento completo da kappa/beta-carragenana constituinte da fração FS2TA é mostrado na TABELA 25.

Analisando-se ainda os sinais anoméricos referentes às unidades de 3,6-anidro- α -D-galactopiranosose pertencentes a kappa- e a beta-carragenana nos espectros de RMN de C¹³ da fração modificada FS2TA, foi possível observar uma sutil diferença entre suas intensidades (FIGURA 41). Assim estes sinais foram integrados e mostraram que o teor de unidades de 3,6-anidrogalactose pertencentes a beta- era pouco maior que o teor de unidades pertencentes a kappa-carragenana (1,18:1,0). Esta mesma proporção foi observada entre os derivados 2,6-di-O-metil galactose (54,0 mol%) e 2,4,6-tri-O-metil galactose (46,0 mol%), provenientes das unidades de β -D-galactose 4-sulfato (μ /kappa-) e galactose (γ /beta-carragenana), obtidos a partir da análise de metilação da fração FS2 (1,17:1,0).

Desta maneira, a furcelarana caracterizada aqui, obtida a partir da alga *F. lumbricalis*, é estruturalmente distinta daquela extraída da mesma fonte e caracterizadas previamente por outros autores (TRUUS et al., 1997; KNUTSEN; GRASDALEN, 1987; KNUTSEN; GRASDALEN, 1992; KNUTSEN et al., 1992).

FIGURA 41 - ESPECTROS DE RMN DE C^{13} * OBTIDOS A PARTIR DAS FRAÇÕES FS2 (1) E FS2TA (2).



A: unidades 3-O-substituídas; B: unidades 4-O-substituídas; os carbonos de cada estrutura são identificados como μ -A_n e μ -B_n para mu-; κ -A_n e κ -B_n para kappa-; γ -A_n e γ -B_n para gamma- e β -A_n e β -B_n para beta-carragenana; * experimento realizado à 70°C com os polissacarídeos dissolvidos em D₂O.

TABELA 25 - ASSINALAMENTOS QUÍMICOS DE RMN DE C¹³ DA FRAÇÃO NATIVA FS2 E QUIMICAMENTE MODIFICADA FS2TA.

CARBONO → UNIDADE	ASSINALAMENTOS (ppm)		ESTRUTURA
	FS2	FS2TA	
C-1 β-D-Galp ¹	104,5		Gamma-
C-1 β-D-Galp 4S ²	104,4		Mu-
C-1 β-D-Galp (4S)		102,2	Beta-/Kappa-
C-1 α-D-Glcp ³	100,6		Amido
C-1 α-D-Galp 6S ⁴	97,5		Mu-
C-1 α-D-Galp 6S	95,8		Gamma-
C-1 3,6-An-α-D-Galp ⁵		95,0	Kappa-
C-1 3,6-An-α-D-Galp		94,3	Beta-
C-3 β-D-Galp		80,1	Beta-
C-3 3,6-An-α-D-Galp		79,1	Beta-/Kappa-
C-3 β-D-Galp 4S		78,9	Kappa-
C-4 3,6-An-α-D-Galp		77,7	Beta-/Kappa-
C-5 3,6-An-α-D-Galp		76,5	Beta-/Kappa-
C-5 β-D-Galp		74,9	Beta-
C-5 β-D-Galp 4S		74,5	Kappa-
C-4 β-D-Galp 4S	73,4	73,8	Kappa-
C-2 3,6-An-α-D-Galp		69,9	Beta-/Kappa-
C-2 β-D-Galp (4S)		69,2	Beta-/Kappa-
C-6 3,6-An-α-D-Galp		69,2	Beta-/Kappa-
C-6 β-D-Galp 6S	67,9		Gamma-
C-6 β-D-Galp 6S	67,1		Mu-
C-4 β-D-Galp	66,2	66,2	Beta-
C-6 β-D-Galp (4S)	61,1	60,9	Beta-/Kappa-

¹β-D-galactopiranoose; ²β-D-galactopiranoose 4-sulfato; ³α-D-glucopiranoose; ⁴α-D-galactopiranoose 6-sulfato; ⁵3,6-anidro-α-D-galactopiranoose.

* segundo GREER e YAPHE (1984); KNUTSEN e GRASDALEN (1987); VAN DE VELDE et al. (2002, 2004).

4.2.2. ESTUDO CINÉTICO DA REAÇÃO DE CICLIZAÇÃO NOS POLISSACARÍDEOS ECW E FS2

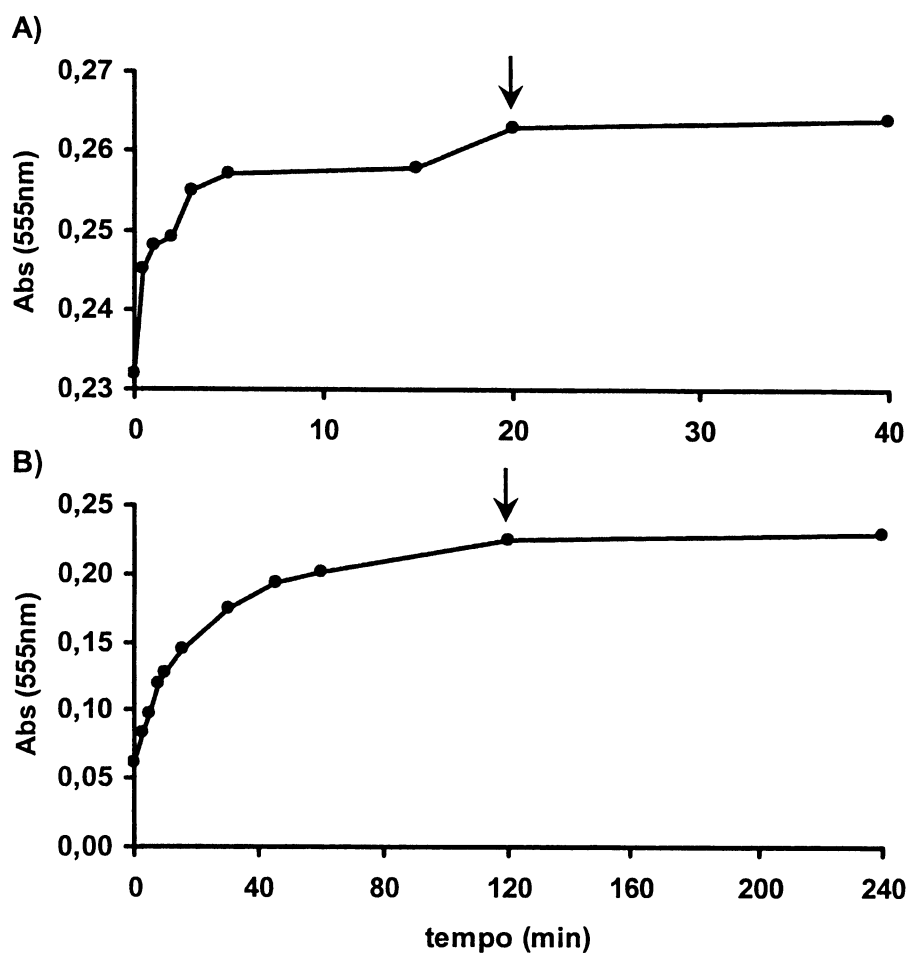
Uma vez elucidada a estrutura química fina das carragenanas constituintes das frações ECW e FS2, obtidas a partir das algas *Eucheuma denticulatum* e *Furcellaria lumbricalis*, estas foram utilizadas como modelos no estudo da cinética química da reação de ciclização.

A carragenana constituinte da fração ECW foi utilizada para estudar o comportamento da reação de ciclização em unidades de α -D-galactopiranosose 2,6-dissulfato ligadas a unidades de β -D-galactopiranosose 4-sulfato (nu-carragenana), enquanto que a carragenana da fração FS2, em unidades de α -D-galactopiranosose 6-sulfato ligadas a unidades de β -D-galactopiranosose e β -D-galactopiranosose 4-sulfato (μ /gamma-carragenana).

Para este objetivo, as frações foram submetidas a tratamento alcalino analítico. Assim, hidróxido de sódio (3M) foi adicionado a cada amostra polissacarídica, previamente solubilizada em água e reduzida com NaBH_4 por 14 horas. Estas soluções foram então incubadas sob uma determinada temperatura enquanto alíquotas eram retiradas em intervalos regulares de tempo, como descrito por CIANCIA et al. (1993). Este experimento foi realizado diversas vezes, sempre nas mesmas condições, porém variando-se a temperatura de incubação (40, 50, 60, 70 e 80°C).

Nestas condições as unidades precursoras de galactose 6-sulfato (em FS2) e 2,6-dissulfato (em ECW) foram convertidas a unidades de 3,6-anidrogactose e 3,6-anidrogactose 2-sulfato, respectivamente. O teor destas unidades monossacarídicas, presentes em cada alíquota, foi dosado através do método colorimétrico do resorcinol (YAPHE; ARSENAULT, 1965), sendo possível assim observar um aumento no teor do anidro-açúcar presente na amostra com o decorrer do tempo até atingir valores constantes (FIGURA 42).

FIGURA 42 – TRATAMENTO ALCALINO DAS FRAÇÕES ECW (A) E FS2 (B).



* experimento realizado à 70 °C para ambas as frações.

Com os valores de absorbância obtidos a partir do acompanhamento do tratamento alcalino, aplicados a fórmula $\ln(A_0 - A_\infty / A_t - A_\infty)$, foi possível calcular a constante de velocidade da reação (k) e o tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) para cada polissacarídeo, sob cada diferente temperatura de incubação estudada, como mostrado na TABELA 26. Ambas as frações estudadas apresentaram aumento gradativo na velocidade da reação e diminuição no tempo de meia-vida, em função do aumento da temperatura de incubação (TABELA 26, FIGURAS 43 e 44).

A velocidade de ciclização das unidades de α -D-galactopiranosse 2,6-dissulfato presentes na nu-carragenana (ECW) foi determinada sob as temperaturas de 40, 50,

60 e 70 °C (FIGURA 43), mostrando-se, porém extremamente rápida para ser determinada a 80 °C (TABELA 26). A velocidade de ciclização das unidades de α -D-galactopiranosose 6-sulfato presentes na mu/gamma-carragenana (FS2), por sua vez, mostrou-se mais lenta, sendo assim determinada sob as temperaturas de 60, 70 e 80 °C (FIGURA 44, TABELA 26).

FIGURA 43 - DETERMINAÇÃO DA VELOCIDADE DA REAÇÃO DE CICLIZAÇÃO PARA A NU-CARRAGENANA (ECW) A DIFERENTES TEMPERATURAS.

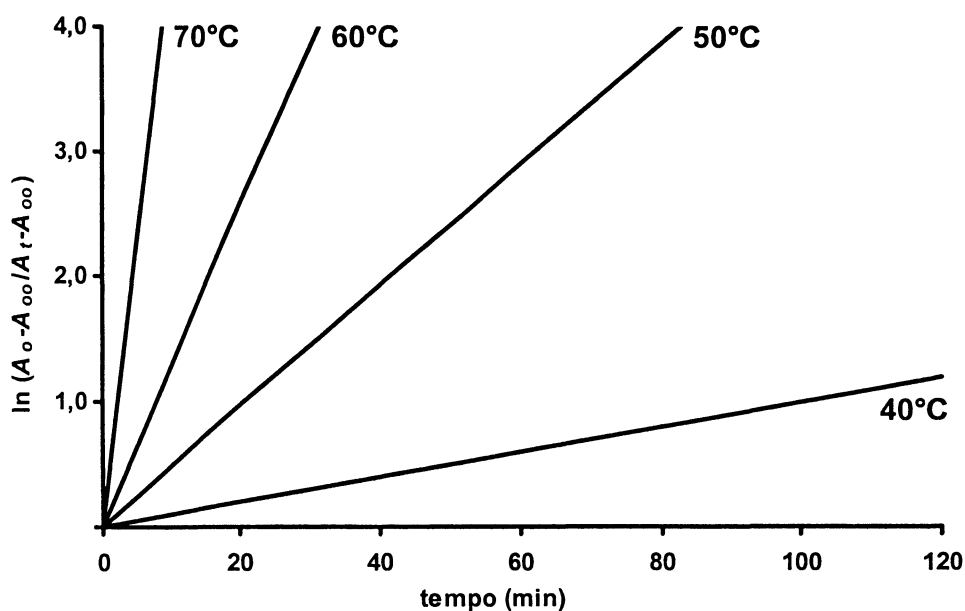
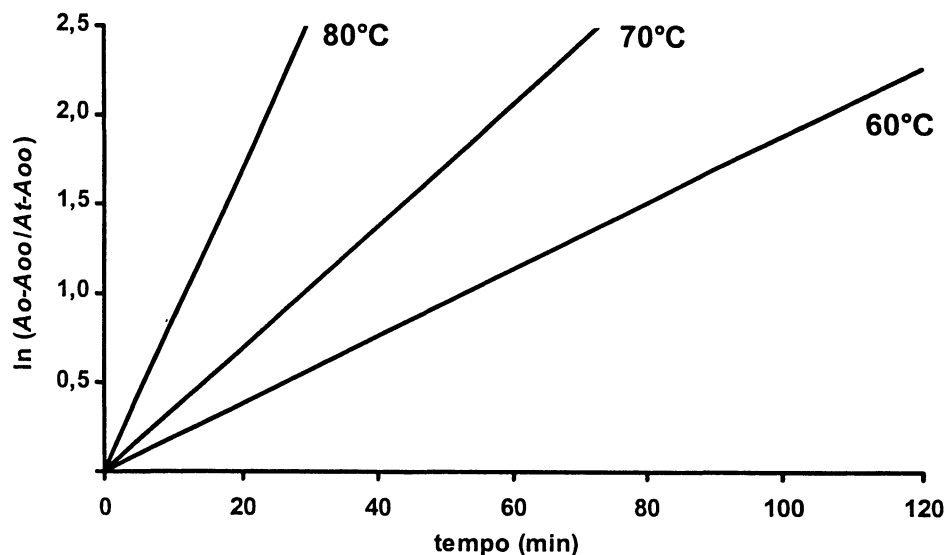


FIGURA 44 - DETERMINAÇÃO DA VELOCIDADE DA REAÇÃO DE CICLIZAÇÃO PARA A MU/GAMMA-CARRAGENANA (FS2) A DIFERENTES TEMPERATURAS.



Como mostrado na TABELA 26, quando comparadas sob as temperaturas de 60 e 70 °C, a velocidade de reação em ECW (21×10^{-4} e $77 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, respectivamente) se mostrou cerca de 7 e 13 vezes mais rápida do que em FS2 (4×10^{-4} e $6 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$).

Esta diferença, observada entre as duas frações, está diretamente relacionada ao padrão de sulfatação encontrado em cada uma das estruturas estudadas, uma vez que como mencionado anteriormente, em ECW todas as unidades de β -D-galactopiranosose apresentam-se sulfatadas em carbono 4 (nu-carragenana), enquanto que em FS2 somente 54% destas unidades apresentam sulfatação no referido carbono (μ/γ -carragenana).

TABELA 26 - VELOCIDADE DE REAÇÃO (K) E TEMPO DE MEIA VIDA (T_{1/2}) PARA AS CARRAGENANAS CONSTITUINTES DAS FRAÇÕES ECW E FS2 EM 1M DE NaOH, SOB DIFERENTES TEMPERATURAS, COMPARADAS COM OUTRAS GALACTANAS SULFATADAS, PREVIAMENTE ESTUDADAS.

TEMPERATURA (°C)	<i>k</i> (x10 ⁴ s ⁻¹)					t _{1/2} (minutos)				
	ECW	1C ₃ ^a	FS2	PC75 ^b	1T ₂ ^a	ECW	1C ₃ ^a	FS2	PC75 ^b	1T ₂ ^a
	v-	v-/μ-	μ/γ-	porfirana	λ-	v-	v-/μ-	μ/γ-	porfirana	λ-
40	2,0	-	-	-	-	69,4	-	-	-	-
50	7,0	2,3	-	-	0,04	15,8	49,9	-	-	3000
60	21,0	4,8	4,0	1,0	0,14	5,4	24,0	36,3	139,0	850
70	77,0	13,0	6,0	1,5	0,35	1,5	9,0	20,1	77,0	320
80	-	26,0	14,0	4,9	0,67	-	4,5	8,1	23,0	170

^a 1C₃: parcialmente ciclizada mu/nu-carragenana e 1T₂: lambda-carragenana (CIANCIA et al., 1993).

^b PC75: porfirana (NOSEDA et al., 2000).

Como previamente determinado, a presença de grupos sulfato esterificando o carbono 4 da unidade β acelera a velocidade da reação de ciclização nas mu-/nu-carragenanas (NOSEDA; CERESO, 1994). Este efeito acelerador pode ser explicado pelas possibilidades de interação entre o grupo sulfato em carbono 4 e os grupos sulfato em carbono 2 e 6 da unidade α , o que desestabiliza a conformação 4C_1 apresentada por esta última unidade, facilitando sua mudança conformacional para 1C_4 , passo necessário no processo de conversão das unidades precursoras para 3,6-anidrogactose (NOSEDA; CERESO, 1994).

Em FS2, o menor teor de sulfatação na unidade β e a completa ausência de sulfatação no carbono 2 da unidade α , explica a maior lentidão na velocidade da reação de ciclização observada neste polissacarídeo em relação a ECW. Por este motivo, a velocidade da reação em ECW, que apresenta completa sulfatação em carbono 2 da unidade α , se mostrou cerca de 4,5 e 6 vezes mais rápida do que em $1C_3$ (CIANCIA et al., 1993), 25 e 50 vezes mais do que na PC75 (NOSEDA et al., 2000) e 160 e 210 vezes mais do que em $1T_2$ (CIANCIA et al., 1993), previamente estudadas e relatadas na literatura, sob as mesmas temperaturas de análise, 60 e 70 °C (TABELA 26).

A explicação para tais valores reside, da mesma maneira, no padrão de sulfatação das unidades β e α observado entre as diferentes galactanas que constituem cada uma das frações. Enquanto $1C_3$ é composta por uma mistura de nu- e mu-carragenana (CIANCIA et al., 1993), PC75 contém uma porfirana (NOSEDA et al., 2000) e $1T_2$ uma lambda-carragenana (CIANCIA et al., 1993).

A velocidade da reação de ciclização determinada para ECW se mostrou superior a observada para $1C_3$, e esta superior a determinada para FS2 (TABELA 25). Isto pode ser explicado através do fato de que na nu-carragenana pura presente em ECW, todos os carbonos 2 se apresentam sulfatados, enquanto que em $1C_3$ estes mesmos carbonos podem também apresentar hidroxilas livres e em FS2 todos os carbonos 2 possuem hidroxilas livres.

Estudos prévios tem mostrado que a interação repulsiva entre as cargas negativas formadas a partir das hidroxilas livres em C-2 e C-3, é a força que dirige a mudança conformacional de 4C_1 para 1C_4 do anel piranosídico durante a ciclização alcalina (PERCIVAL, 1949; TURVEY, 1965). Desta maneira a velocidade de

ciclização tende a ser mais rápida naquelas estruturas onde o carbono 2 se apresenta sulfatado, ou seja, na nu-carragenana, uma vez que a hidroxila livre em carbono 2, por apresentar um maior caráter ácido (SUGIHARA, 1953; LENZ, 1960), ioniza-se primeiro e tende a estabilizar a hidroxila ciclizante em C-3 (VIANA et al., 2004).

Por esta razão a presença conjunta da mu- com a nu-carragenana em 1C₃ foi responsável por reduzir a velocidade em relação a ECW, uma vez que o primeiro polissacarídeo não apresenta sulfatação no carbono 2 das unidades α , mas a completa sulfatação em carbono 4 das unidades β , garantiu que ainda assim, fosse maior em relação a FS2.

A fração FS2, por sua vez, mostrou-se cerca de 4 vezes mais acelerada do que a PC75 (NOSEDA et al., 2000) e 23 e 16 do que a 1T₂ (CIANCIA et al., 1993), sob as temperaturas de análise de 60 e 70 °C (TABELA 26).

A porfirana PC75, não apresenta sulfatação na unidade β e somente sulfatação em C-6 na unidade α , por isso se mostrou mais lenta que ECW e que FS2.

Ainda, o fato da lambda-carragenana apresentar a mais baixa velocidade de ciclização, entre todos os polissacarídeos estudados, se deve a distribuição de grupos sulfato ao redor da hidroxila livre em carbono 3 da unidade α , o que acaba por proteger esta hidroxila da ionização, etapa primordial no processo de ciclização, reduzindo assim a velocidade (CIANCIA et al., 1993). Soma-se a isto ainda a presença do grupo sulfato esterificando o carbono 2 na unidade β , o qual forma uma ponte de hidrogênio com a hidroxila em carbono 3 da unidade vizinha, dificultando sua ionização e assim retardando a reação de ciclização (CIANCIA et al., 1993).

4.2.2.1. OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS OLIGOSSACARÍDEOS DE F2S2

Uma vez determinada a velocidade da reação de ciclização na mu/gamma-carragenana FS2, surgiu o interesse em estudar a cinética da reação de ciclização das unidades de α -D-galactopiranosose 6-sulfato ligadas a unidades de β -D-galactopiranosose 4-sulfato (mu-carragenana), separadamente das unidades de α -D-galactopiranosose 6-sulfato ligadas a unidades de β -D-galactopiranosose (gamma-carragenana), visando-se avaliar a participação de cada modelo estrutural no comportamento cinético apresentado pelo polissacarídeo híbrido.

Para tanto, a fração F2S2, cujas análises mostraram tratar-se de uma carragenana estruturalmente semelhante a FS2, foi submetida à hidrólise reductiva parcial (USOV; ELASHIVILI, 1991) visando obter oligossacarídeos representativos das estruturas de mu- e de gamma-carragenana. Por esta metodologia, as condições hidrolíticas geradas são capazes de romper somente as ligações 3,6-anidrogalactosídicas preservando as demais ligações, obtendo-se desta maneira, oligossacarídeos contendo 3,6-anidrogalactitol como unidade terminal.

Desta maneira o polissacarídeo F2S2 (em sua forma nativa) foi inicialmente dissolvido em água e após adição do agente redutor 4-MMB e do ácido (TFA 2M), a mistura foi mantida sob a temperatura de 65°C durante 8 horas. Após diálise (em membrana de 2.000 Da) e liofilização, foi obtida uma fração parcialmente depolimerizada, a qual foi denominada F2S2hp. Quando submetida à análise de composição monossacarídica, esta fração rendeu os monossacarídeos galactose (81,8 mol%), 3,6-anidrogalactose (7,8 mol%) e glucose (10,4 mol%). As percentagens obtidas se mostraram similares à obtida para a fração F2S2 (TABELA 27), sugerindo desta maneira que o processo hidrolítico não promoveu degradação de unidades monossacarídicas.

Análise de RMN de C^{13} desta fração originou um espectro (FIGURA 45) melhor definido que o obtido para a fração original (FIGURA 39). Na região anomérica deste espectro foi possível identificar seis sinais (localizados) em 104,3, 103,1, 102,2, 100,0, 97,4 e 95,4 ppm (FIGURA 45). O sinal em 104,3 ppm refere-se aos C-1 sobrepostos das unidades de β -D-galactopiranosose 4-sulfato ou β -D-galactopiranosose glicosilando unidades de α -D-galactopiranosose 6-sulfato, cujos sinais

anoméricos são observados em 97,4 ppm, quando pertencente ao dissacarídeo da mu-carragenana e em 95,4 ppm, quando pertencente ao dissacarídeo da gamma-carragenana, respectivamente (TABELA 27 – GREER; YAPHE, 1984; KNUTSEN; GRASDALEN, 1987; VAN DE VELDE et al. 2002, 2004). Os sinais referentes às unidades precursoras não eram observados no espectro da fração F2S2 (FIGURA 39).

Como mostrado na TABELA 27, o sinal em 103,1 ppm, por sua vez é referente às unidades de β -D-galactopiranosose 4-sulfato ou β -D-galactopiranosose glicosilando unidades de 3,6-anidro-D-galactitol, cujo sinal de C-1 localiza-se em 62,7 ppm, por tratar-se de um carbono primário (GREER; YAPHE, 1984; KNUTSEN; GRASDALEN, 1987; VAN DE VELDE et al. 2002, 2004). Este sinal em 62,7 ppm não era observado no espectro da fração nativa.

A presença do sinal em 102,2 ppm, referente às unidades de β -D-galactopiranosose 4-sulfato ou β -D-galactopiranosose ligadas a unidades de 3,6-anidro- α -D-galactopiranosose (TABELA 28 – GREER; YAPHE, 1984; KNUTSEN; GRASDALEN, 1987; VAN DE VELDE et al. 2002, 2004), sugere que nem todas as ligações 3,6-anidrogalactosídicas foram hidrolisadas durante o processo de hidrólise parcial. Porém, não foi observado neste espectro qualquer sinal passível de atribuição a unidades de 3,6-anidrogalactopiranosose (FIGURA 45). Por fim, o sinal localizado em 100,0 ppm é referente ao C-1 das unidades de α -D-glucopiranosose, pertencentes ao amido das florídeas, como mostra a TABELA 28 (KNUTSEN; GRASDALEN, 1987).

Em seguida, a fração F2S2hp foi submetida a cromatografia de troca-iônica em coluna de DEAE-Sepharose CL6B, utilizando água destilada e concentrações crescentes de NaCl (0,1; 0,25; 0,5 e 1,0 M) como eluentes, visando purificar e fracionar os fragmentos produzidos na hidrólise parcial. Após diálise exaustiva contra água destilada (em membrana de 2.000 Da) e liofilização, cinco sub-frações foram obtidas e denominadas FA (%), FB (3,7 %), FC (5,3 %), FD (6,3 %) e FE (11,1 %), como mostrado na TABELA 27.

Todas as sub-frações se mostraram compostas por galactose (12,4 – 90,4 mol%), 3,6-anidrogalactose (2,3 – 15,5 mol%) e glucose (6,8 – 84,7 mol% - TABELA 27).

TABELA 27 - RENDIMENTO E COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS SUB-FRAÇÕES OBTIDAS A PARTIR DE F2S2 (FA – FE).

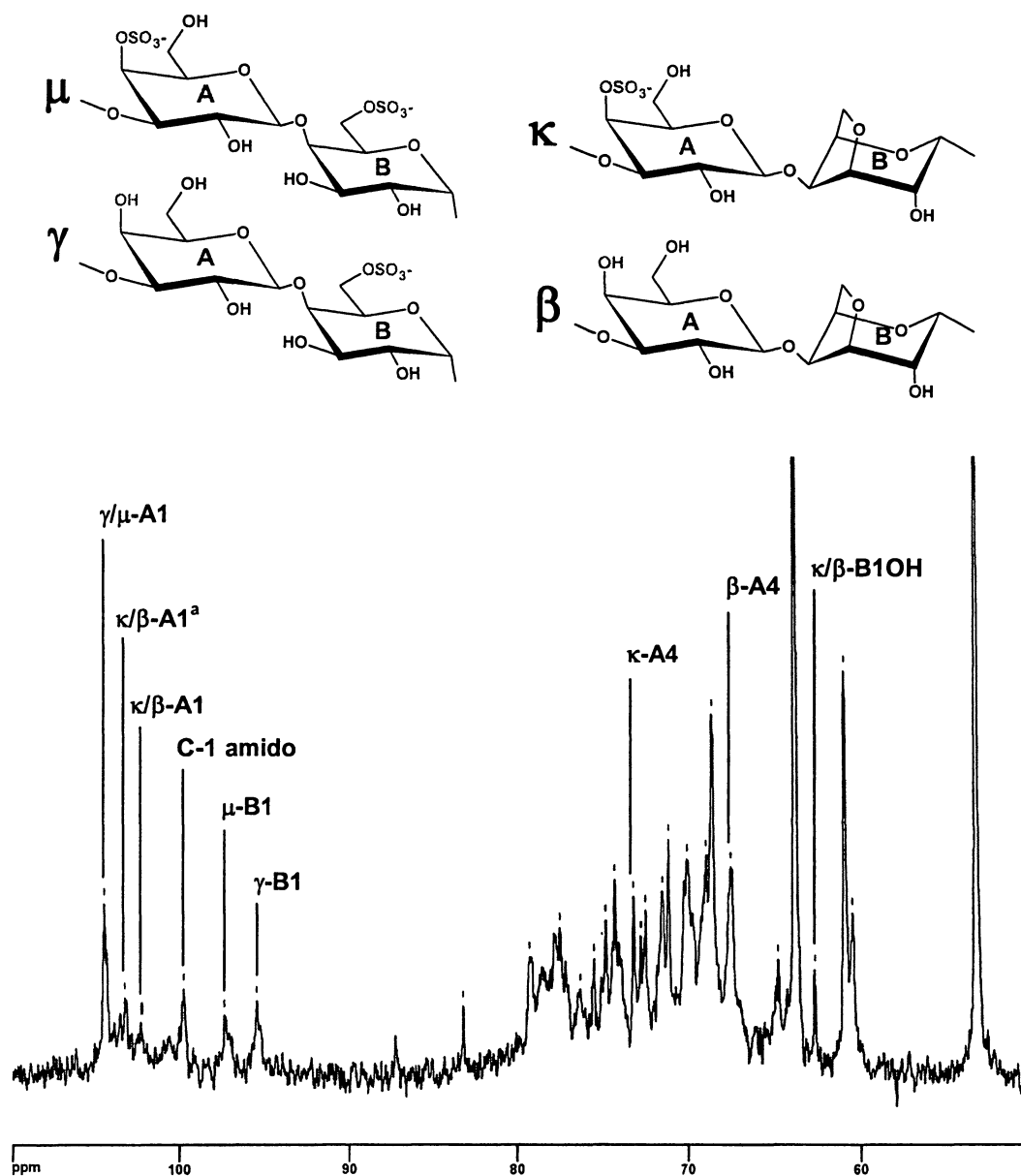
FRAÇÃO	[KCl] (M)	RENDIMENTO (%)	MONOSSACARÍDEO (mol%) ^c		
			Gal ¹	AnGal ²	Glc ³
F2S2		-	86,5	6,8	6,6
F2S2hp		65,0 ^a	81,8	7,8	10,4
FA	-*	- ^b	12,4	2,3	84,7
FB	0 – 0,1	3,7	68,1	15,5	16,4
FC	0,1 – 0,25	5,3	75,7	13,0	11,3
FD	0,25 – 0,5	6,3	88,8	2,4	8,8
FE	0,5 – 1,0	11,1	90,4	2,8	6,8

* fração obtida utilizando-se H₂O como eluente; ^a relativo a massa polissacarídica submetida a hidrólise reductiva parcial (240 mg), ^b relativo a massa submetida a cromatografia de troca iônica (190 mg); ^c de acordo com STEVENSON e FURNEAUX (1991) e FALSHAW e FURNEAUX (1994); ¹ galactose; ² 3,6-anidrogactose; ³ glucose.

TABELA 28 - ASSINALAMENTOS QUÍMICOS DE RMN DE C¹³ DAS SUB-FRAÇÕES OBTIDAS A PARTIR DE F2S2 POR CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA.

CARBONO	ASSINALAMENTOS DE C ¹³ (ppm)*					ESTRUTURA
	F2S2hp	FB	FC	FD	FE	
C1 β-D-Galp (4S) ¹	104,3	104,3	104,3	104,4	104,3	Mu-/gamma-
C1 β-D-Galp (4S) ^a	103,1	103,0	103,1	103,2		Kappa-/beta-
C1 β-D-Galp (4S) ^b	102,2		102,3	102,5		Kappa-/beta-
C1 α-D-Glcp ²	100,0		100,0	100,6	100,5	Amido
C1 α-D-Galp 6S ³	97,4	97,3	97,3	97,2	97,2	Mu-
C1 α-D-Galp 6S	95,4	95,2	95,4	95,5	95,5	Gamma-
C1 3,6-D-GalOH ⁴	62,7	62,6	62,7	62,7	62,9	Kappa-/beta-

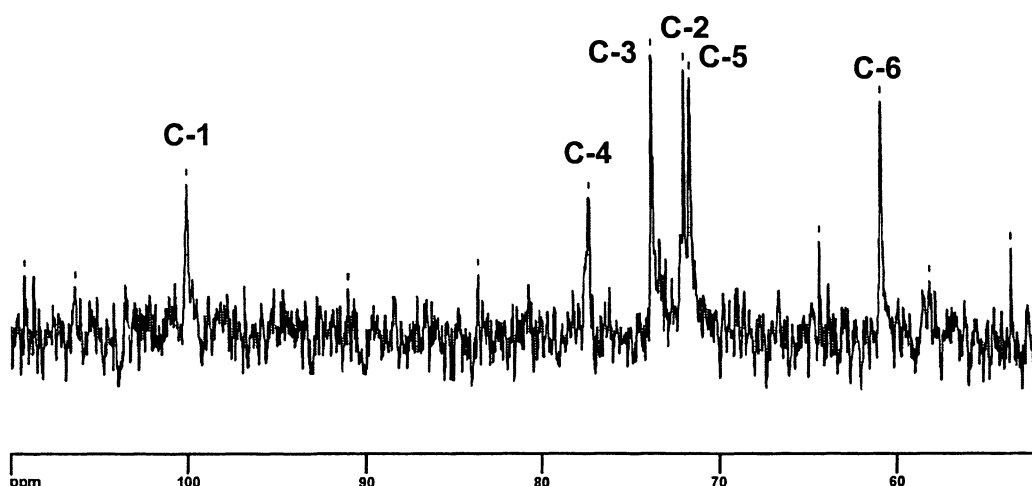
¹β-D-galactopiranoose ou β-D-galactopiranoose 4-sulfato; ²α-D-glucopiranoose; ³α-D-galactopiranoose 6-sulfato; ⁴3,6-anidro-D-galactitol; ^aβ-D-galactopiranoose ou β-D-galactopiranoose 4-sulfato ligado ao 3,6-anidro-D-galactitol; ^bβ-D-galactopiranoose ou β-D-galactopiranoose 4-sulfato ligado a 3,6-anidro-α-D-galactopiranoose; * segundo GREER e YAPHE (1984); KNUTSEN e GRASDALEN (1987); VAN DE VELDE et al. (2002, 2004).

FIGURA 45 - ESPECTRO DE RMN DE C¹³ DA FRAÇÃO F2S2hp.

A: unidades 3-O-substituídas, B: unidades 4-O-substituídas; os carbonos de cada estrutura são identificados como μ -A_n e μ -B_n para mu-; κ -A_n e κ -B_n para kappa-; γ -A_n e γ -B_n para gamma- e β -A_n e β -B_n para beta-carragenana; ^a β -D-galactopiranosose ou β -D-galactopiranosose 4-sulfato ligado ao 3,6-anidro-D-galactitol; * experimento realizado à 30°C com os polissacarídeos dissolvidos em D₂O.

As cinco sub-frações foram submetidas a análise de RMN de C^{13} . FA, apresentou um espectro onde seis sinais de elevada intensidade foram observados (FIGURA 46). O sinal anomérico em 100,0 ppm, já se mostrava presente na fração F2S2hp e foi atribuído ao carbono 1 das unidades de β -D-glucopiranoose (KNUTSEN; GRASDALEN, 1987), enquanto o sinal em 77,3 ppm ao carbono 4 substituído glicosidicamente, desta mesma unidade (FIGURA 46, TABELA 29). Estes resultados demonstram que nesta sub-fração concentrou-se o amido das florídeas. A composição monossacarídica desta fração é coerente com esta afirmação uma vez que 84,7 mol% é composto de glucose (TABELA 27).

FIGURA 46 - ESPECTRO DE RMN DE C^{13} * DA FRAÇÃO FA.



as letras correspondem aos carbonos identificados; *experimento realizado à 30°C com os polissacarídeos dissolvidos em D_2O .

TABELA 29 - ASSINALAMENTOS QUÍMICOS* DE RMN DE C^{13} DAS UNIDADES DE α -D-GLUCOPIRANOSE (AMIDO DAS FLORÍDEAS) NA SUB-FRAÇÃO FA.

C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
100,0	71,9	73,8	77,3	71,6	60,9

* de acordo com KNUTSEN e GRASDALEN (1987).

Os espectros de RMN de C^{13} obtidos para as demais sub-frações (FB, FC, FD e FE), se mostraram semelhantes ao obtido para a fração F2S2hp (FIGURAS 45 e 47). Como mostrado na TABELA 29, o sinal referente ao C-1 das unidades de 3,6-anidro-D-galactitol (62,6 – 62,9 ppm) foi observado nas quatro sub-frações, e apresentou maior intensidade em FB e menor intensidade em FE (FIGURA 47), de maneira coerente com a concentração salina necessária para promover sua eluição da coluna de troca-iônica, mostrando que a massa molecular dos oligossacarídeos aumenta entre as frações.

Na região anomérica dos espectros foram identificados os sinais referentes aos C-1 das unidades de β -D-galactopiranosose e de α -D-galactopiranosose 6-sulfato constituintes do dissacarídeo repetitivo da gamma-carragenana em 104,4-3 e 95,5-2 ppm (TABELA 27) e das unidades de β -D-galactopiranosose 4-sulfato e de α -D-galactopiranosose 6-sulfato constituintes do dissacarídeo repetitivo da mu-carragenana em 104,3-2 e 97,4-2 ppm, respectivamente (TABELA 27 - GREER; YAPHE, 1984; KNUTSEN; GRASDALEN, 1987; VAN DE VELDE et al., 2002, 2004). Ainda, o sinal referente ao C-1 das unidades de β -D-galactopiranosose e de β -D-galactopiranosose 4-sulfato ligadas ao 3,6-anidro-D-galactitol, estava presente nas sub-frações FB, FC e FD, em torno de 103,1 ppm (TABELA 27), enquanto que o sinal referente ao C-1 destas mesmas unidades ligadas a 3,6-anidro- α -D-galactopiranosose (102,3-5 ppm) foi observado somente em FC e FD (TABELA 27).

A presença dos sinais em 104,4, 103,0, 97,3, 95,3 e 62,6 ppm (este último em elevada intensidade), bem como a ausência do sinal em torno de 102,0 ppm na sub-fração FB (FIGURA 47, TABELA 28) permitem afirmar que esta fração se encontra constituída por uma mistura de oligossacarídeos com baixo grau de polimerização. Dissacarídeos alditois: carrabiitol [β -D-galactopiranosose-(1 \rightarrow 4)-3,6-anidro-D-galactitol] e carrabiitol 4-sulfato [β -D-galactopiranosose 4-sulfato-(1 \rightarrow 4)-3,6-anidro-D-galactitol], assim como tetrassacarídeos alditois contendo unidades precursoras.

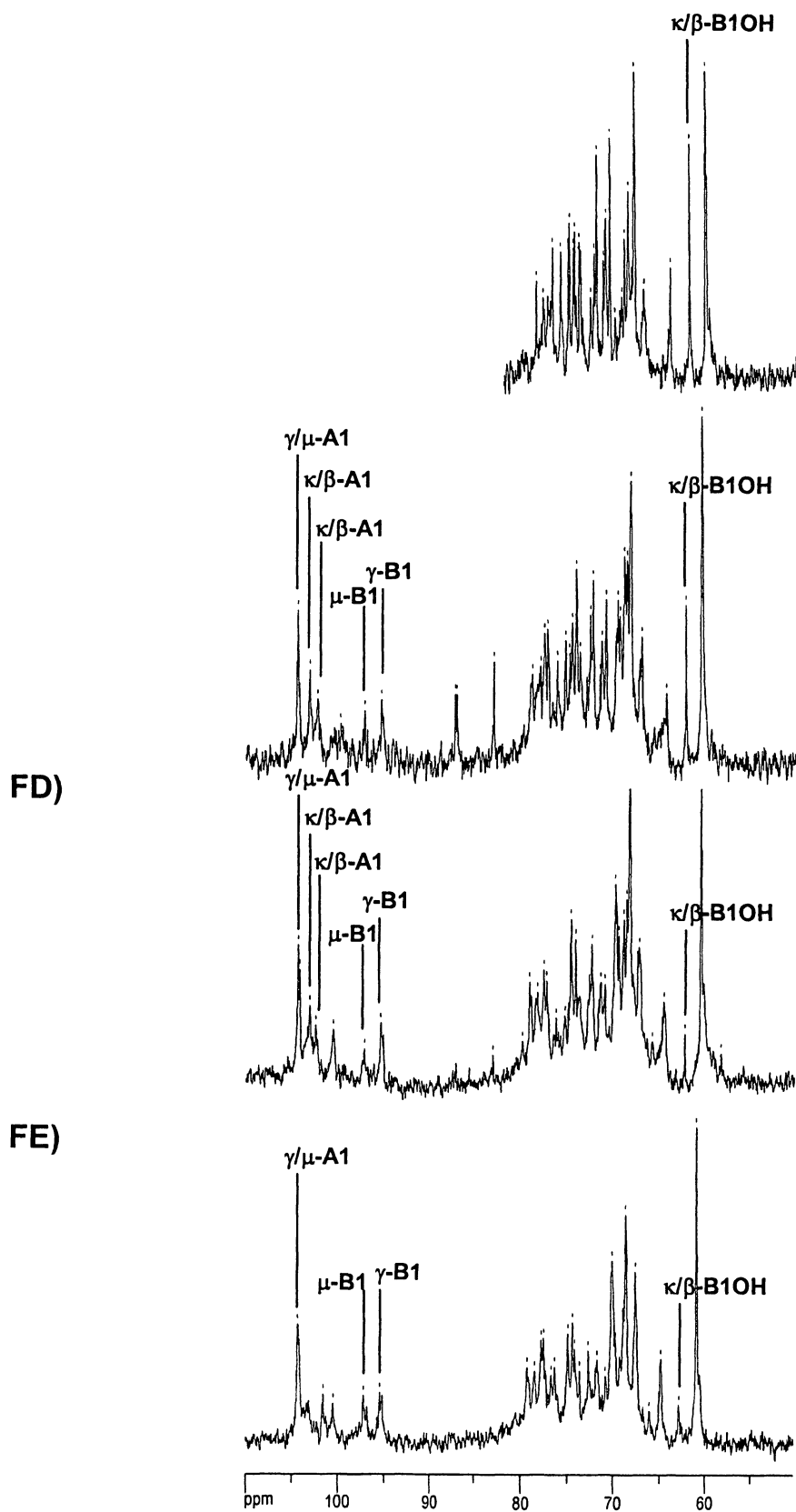
O conjunto de sinais anoméricos presentes em FE, bem como a baixíssima intensidade do sinal em 62,9 ppm (FIGURA 47, TABELA 28) permitem dizer que nesta sub-fração se encontram presentes oligossacarídeos de elevada massa molecular (ou polissacarídeos despolimerizados), constituídos por estruturas referentes a mu- e gamma-carragenana.

Por fim, a presença do mesmo grupo de sinais anoméricos nas sub-frações, FC e FD (FIGURA 47, TABELA 28) sugerem que seus oligossacarídeos constituintes apresentam estruturas extremamente semelhantes. Estruturas referentes a mu- e gamma-carragenana ocorrem juntamente com estruturas de kappa e beta-carragenana, estas últimas em menor proporção, sendo em média, os oligossacarídeos de FC menores que os FD, como sugerem as intensidades dos sinais em 62,7 ppm.

Com a finalidade de se confirmar às estruturas acima propostas, parte das sub-frações FC, FD e FE foram então submetidas a tratamento alcalino (NaOH 1M; 80°C; 1,5h). As sub-frações modificadas FC-TA, FD-TA e FE-TA, obtidas após tratamento alcalino, apresentaram, da mesma forma que as nativas, espectros de RMN de C¹³ muito similares (FIGURA 48), onde os sinais referentes às estruturas precursoras mu- e gamma-carragenana estavam ausentes, contendo somente os sinais referentes as estruturas de kappa- e beta-carragenana. O tratamento alcalino, portanto, eliminou os sinais em 104,4-3, 97,3-2 e 95,5-4 ppm, referentes as estruturas precursoras, presentes nas sub-frações nativas, sendo observados nas modificadas somente os sinais em 102,1-0, 94,2 e 93,9 ppm, referentes as estruturas ciclizadas (TABELA 30).

Os sinais em 102,0 e 94,2 ppm, bem como os sinais em 102,0 e 93,9 ppm, são atribuídos aos carbonos anoméricos das unidades dissacarídicas repetitivas da kappa- e beta-carragenana, respectivamente (GREER; YAPHE, 1984; KNUTSEN; GRASDALEN, 1987; VAN DE VELDE et al., 2002, 2004).

S SUB-FRAÇÕES FB, FC, FD E FE.



* siglas e condições de análise como na FIGURA 45.

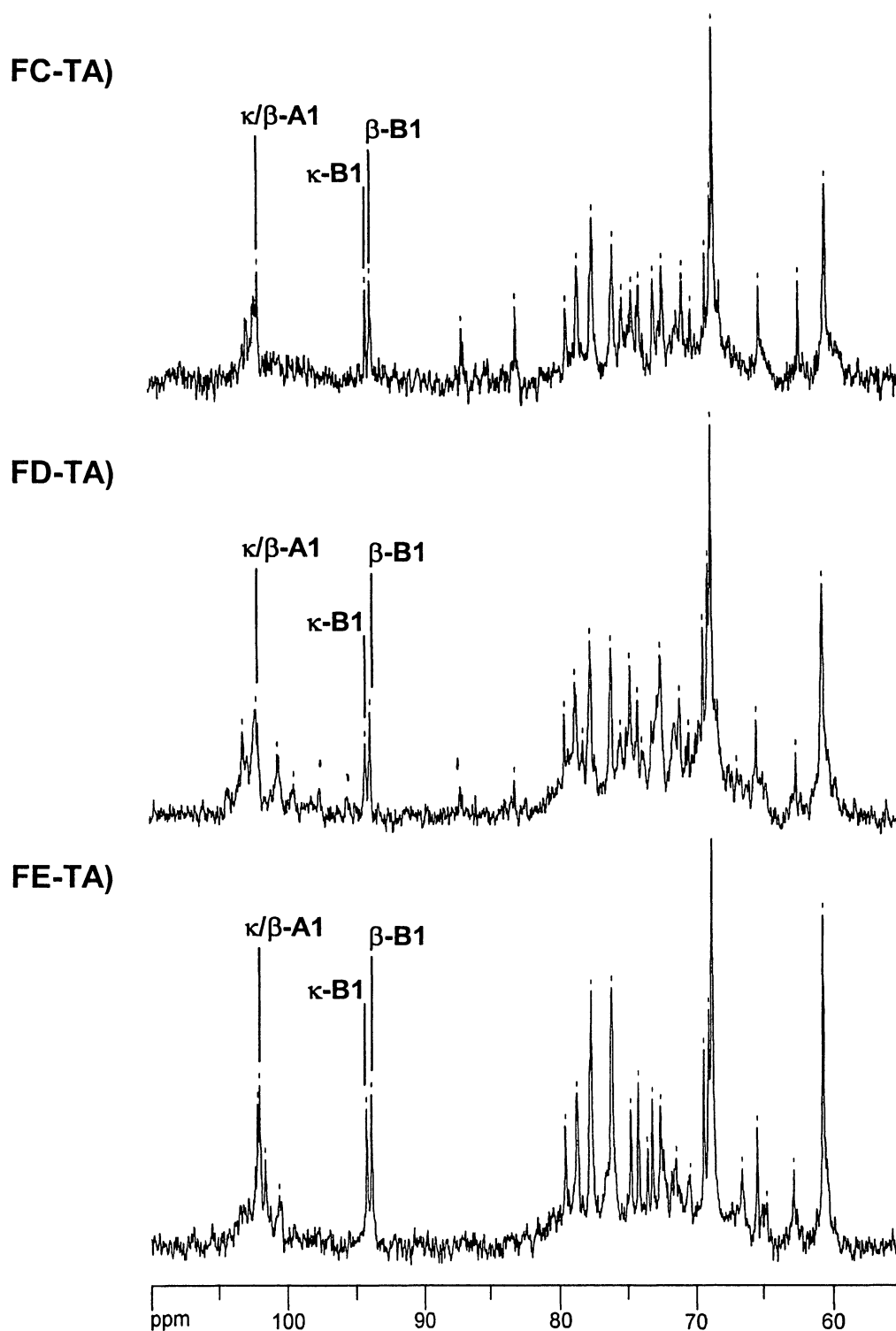
TABELA 30 - ASSINALAMENTOS QUÍMICOS DE RMN DE C¹³ DAS SUB-FRAÇÕES FC-TA, FD-TA E FE-TA.

C-1	ASSINALAMENTOS DE C ¹³ (ppm)			ESTRUTURA
	FC-TA	FD-TA	FE-TA	
β -D-Galp (4S) ¹	102,0	102,1	102,1	Kappa-/beta-
3,6- α -D-Gal ²	94,2	94,2	94,2	Kappa-
3,6- α -D-Gal	93,9	93,9	93,9	Beta-

¹ β -D-galactopiranosose e β -D-galactopiranosose 4-sulfato; ²3,6-anidro- α -D-galactopiranosose; * segundo GREER e YAPHE (1984); KNUTSEN e GRASDALEN (1987); VAN DE VELDE et al. (2002, 2004).

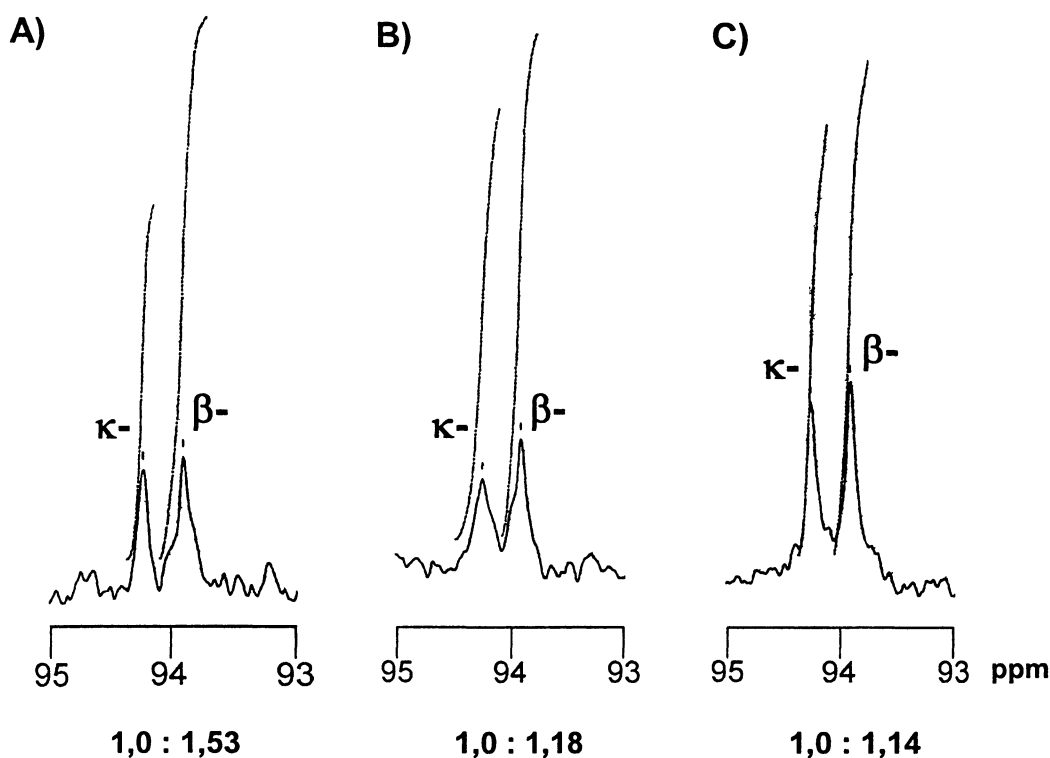
Desta maneira conclui-se que a partir da fração F2S2 não foi possível isolar nenhum oligossacarídeos representativo de uma única estrutura de carragenana, ou seja, todas as sub-frações obtidas continham tanto unidades precursoras que originaram kappa- como beta-carragenana. Sugerindo, assim que nos polissacarídeos da alga vermelha *Furcellaria lumbricalis* as estruturas de kappa- e beta-carragenana, bem como seus precursores mu- e gamma-, ocorrem aleatoriamente distribuídas e não organizadas em blocos.

Analisando-se porém os sinais anoméricos referentes as unidades de 3,6-anidro- α -D-galactopiranosose pertencentes a kappa- e a beta-carragenana nos espectros de RMN de C¹³ das frações modificadas FC-TA, FD-TA e FE-TA foi possível observar uma sutil diferença entre suas intensidades (FIGURA 48). Assim, estes sinais foram integrados e mostraram que o teor de unidades de 3,6-anidro- α -D-galactopiranosose pertencentes a beta-carragenana era maior na fração FC-TA (1,53 unidades para cada 1,0 unidade pertencente a kappa-carragenana), do que em FD-TA (1,18 unidades para cada 1,0 unidade pertencente a kappa-carragenana) e em FE-TA (1,15 unidades para cada 1,0 unidade pertencente a kappa-carragenana - FIGURA 49).

FIGURA 48 - ESPECTROS DE RMN DE C¹³ DAS SUB-FRAÇÕES FC-TA, FD-TA E FE-TA.

A: unidades 3-O-substituídas, B: unidades 4-O-substituídas; os carbonos de cada estrutura são identificados como κ-A_n e κ-B_n para kappa-; e β-A_n e β-B_n para beta-carragenana; *experimento realizado à 30°C com os polissacarídeos dissolvidos em D₂O.

FIGURA 49 – INTEGRAÇÃO DOS CARBONOS ANOMÉRICOS DAS UNIDADES DE 3,6-ANIDRO- α -D-GALACTOPIRANOSE PERTENCENTES A KAPPA- E A BETA-CARRAGENANA EM FC-TA (A), FD-TA (B) E FE-TA (C).



as letras gregas correspondem a kappa (κ) e beta-carragenana (β); * experimento realizado à 30°C com os polissacarídeos dissolvidos em D₂O.

4.2.2.2 ESTUDO CINÉTICO DA REAÇÃO DE CICLIZAÇÃO NOS OLIGOSSACARÍDEOS F-C E F-D

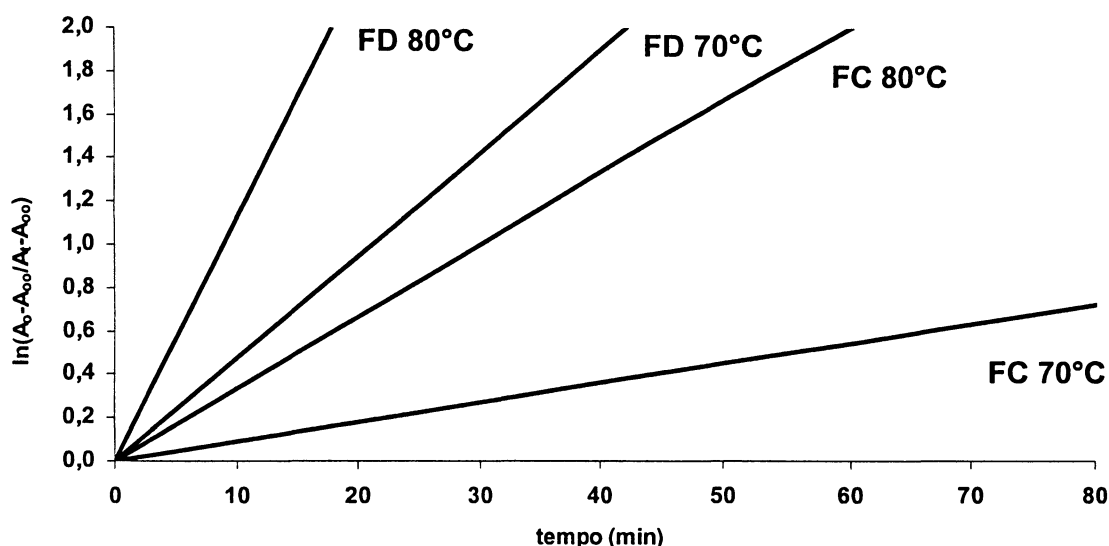
Uma vez determinada a estrutura dos oligossacarídeos presentes nas sub-frações FC e FD, estas foram escolhidas para serem utilizadas como modelo no estudo de cinética da reação de ciclização, baseado no fato da primeira apresentar um maior caráter de gamma-carragenana enquanto a segunda de mu-carragenana.

Os oligossacarídeos FC e FD foram então submetidos a tratamento alcalino analítico. Os experimentos foram realizados nas mesmas condições que as

utilizadas para os polissacarídeos ECW e F2S, porém somente sob as temperaturas de 70 e 80°C.

Como mostrado na TABELA 31 e na FIGURA 50, estas sub-frações também apresentaram aumento gradativo na velocidade da reação e diminuição no tempo de meia-vida, em função do aumento na temperatura de incubação.

FIGURA 50 – TRATAMENTO ALCALINO NAS CARRAGENANAS DAS FRAÇÕES FC E FD, SOB DIFERENTES TEMPERATURAS.



Quando comparadas a 70 e 80 °C, a velocidade de reação determinada para FC ($2,0 \times 10^{-4}$ e $6,0 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, respectivamente) se mostrou cerca de 4,0 e 3,3 vezes mais lenta do que a determinada para FD ($8,0 \times 10^{-4}$ e $19,0 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ - TABELA 31).

A diferença observada na cinética de ciclização entre estes oligossacarídeos, da mesma forma que para os polissacarídeos, esta relacionada ao padrão de sulfatação de cada estrutura. O oligossacarídeo FC, o qual apresenta um caráter gamma maior que o da fração FD, não sofre o efeito acelerador do grupo sulfato em C-4 das unidades de β -galactopiranosose. Desta forma apresenta uma cinética semelhante a da porfirana PC75. Já o oligossacarídeo FD, que apresenta um caráter

mu- ligeiramente maior, sofre o efeito acelerador do grupo sulfato, tendo assim um comportamento semelhante as carragenanas 1C₃ e ECW.

A velocidade em FD se mostrou ainda superior a determinada para o polissacarídeo FS2 (1,4 vezes), porém inferior a determinada para ECW (9,7 vezes) e para a mistura mu/nu-carragenana (1,6 vezes - CIANCIA et al., 1993), quando analisadas sob a temperatura de 70 °C (TABELA 31). Por sua vez, a velocidade de FC se mostrou cerca de 3,8 vezes mais lenta que a fração FS2, quando analisadas, também, sob a temperatura de 70 °C (TABELA 31).

O fato da velocidade da reação de ciclização na fração FS2 encontrar-se intermediária àquelas determinadas para as frações FC e FD (FIGURA 51), sugere que o caráter híbrido do polissacarídeo lhe confere uma cinética dupla, onde cada diferente padrão estrutural presente apresenta uma cinética própria, mais acelerada para mu- e mais lenta para gamma-carragenana, que em conjunto resultam em uma terceira de comportamento intermediário.

Por fim, as diferenças observadas entre as velocidades de ciclização nas sub-frações FC e FD se devem unicamente às diferenças observadas em relação ao padrão estrutural presente em cada uma e não ao fato de tratarem-se de oligossacarídeos de massas moleculares distintas, uma vez que como verificado previamente, oligossacarídeos obtidos a partir de auto-hidrólise de lambda-carragenana, não mostraram diferenças consideráveis em suas cinéticas quando comparadas a porfirana PC75 (NOSEDA et al., 2000).

FIGURA 51 - DETERMINAÇÃO DA VELOCIDADE DA REAÇÃO DE CICLIZAÇÃO NAS CARRAGENANAS DAS FRAÇÕES FS2, FC E FD A 70 °C.

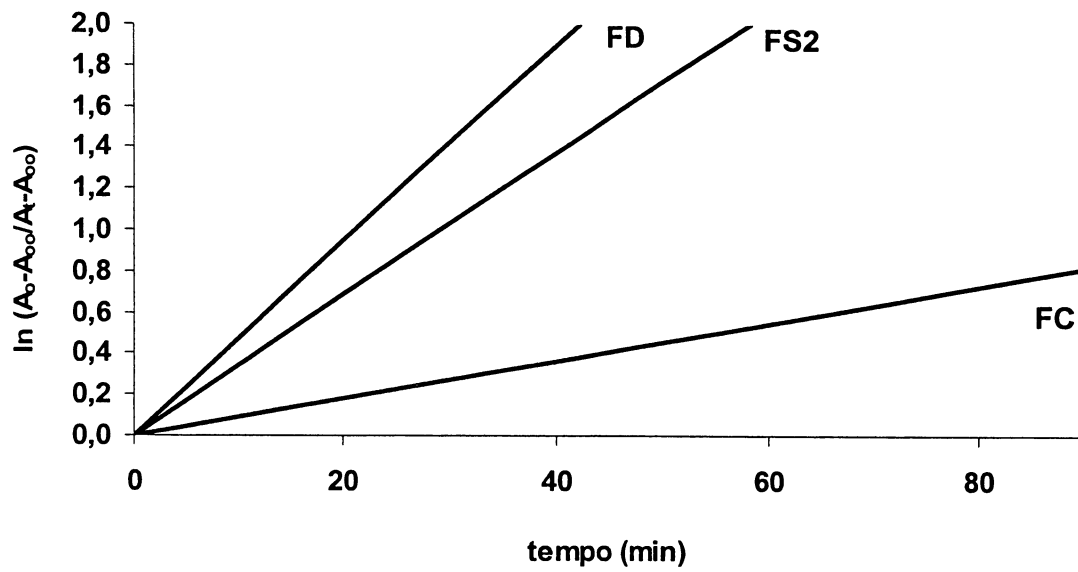


TABELA 31 - VELOCIDADE DE REAÇÃO (k) E TEMPO DE MEIA VIDA ($T_{1/2}$) PARA OS OLIGOSSACARÍDEOS CONSTITUINTES DAS FRAÇÕES FC E FD EM 1M DE NaOH, SOB DIFERENTES TEMPERATURAS, COMPARADOS A OUTRAS GALACTANAS SULFATADAS.

TEMP. (°C)	$K (x10^4 s^{-1})$							$t_{1/2}(\text{minutos})$						
	ECW	1C ₃ ^a	FD	FS2	FC	PC75 ^b	1T ₂ ^a	ECW	1C ₃ ^a	FD	FS2	FC	PC75 ^b	1T ₂ ^a
	v-	v-/μ-	μ-	μ/γ-	γ-	porfirana	λ-	v-	v-/μ-	μ-	μ/γ-	γ-	porfirana	λ-
40	2,0	-	-	-	-	-	-	69,4	-	-	-	-	-	-
50	7,0	2,3	-	-	-	-	0,04	15,8	49,9	-	-	-	-	3000
60	21,0	4,8	-	4,0	-	1,0	0,14	5,4	24,0		36,3	-	139,0	850
70	77,0	13,0	8,0	6,0	2,0	1,5	0,35	1,5	9,0	14,6	20,1	76,7	77,0	320
80	-	26,0	19,0	14,0	6,0	4,9	0,67	-	4,5	6,2	8,1	20,7	23,0	170

^a 1C₃: mu-/nu-carragenana parcialmente ciclizada e 1T₂: lambda-carragenana (CIANCIA et al., 1993).

^b PC75: porfirana (NOSEDA et al., 2000).

CONCLUSÕES

6.0. CONCLUSÕES

1 - A partir das algas vermelhas *Galaxaura marginata*, *G. obtusata*, *Tricleocarpa cylindrica*, *T. fragilis*, *Scinaia halliae* (Ordem Nemaliales) e *Palmaria palmata* (Ordem Palmariales) mediante extração aquosa à quente e tratamento com Cetavlon, foram obtidos dois grupos de polissacarídicas: um solúvel e outro insolúvel em Cetavlon;

2 - Análises químicas e espectroscópicas dos polissacarídeos solúveis permitiram caracteriza-los como β -D-xilanas lineares com ligações glicosídicas 1 \rightarrow 3 e 1 \rightarrow 4, encontradas sempre na relação molar de 1:5 entre os representantes da ordem Nemaliales e de 1:2 para o representante da ordem Palmariales;

3 - Os polissacarídeos insolúveis (precipitados com Cetavlon) isolados das algas *G. marginata* e *T. cylindrica* (Nemaliales) foram caracterizados, mediante análises químicas e espectroscópicas, como xilomananas sulfatadas dotadas de uma cadeia principal formada por unidades de α -D-manopiranosose 3-O-ligadas, esterificada por grupos sulfato em carbonos 2 e/ou 4 e glicosilada por unidades de 4-O-metil β -D-xilopiranosose e β -D-xilopiranosose em carbono 4;

5 - A partir da alga vermelha *Eucheuma denticulatum* (Ordem Gigartinales, Família Solieriaceae) foi isolada uma galactana sulfatada (ECW) do tipo nu/iota-carragenana pura, onde a forma ciclizada (iota-) representou 70% do polissacarídeo;

6 - A partir da alga vermelha *Furcellaria lumbricalis* (Ordem Gigartinales, Família Furcellariaceae) foram obtidas duas frações polissacarídicas (FS2 e F2S2), contendo uma kappa-carragenana parcialmente dessulfatada, correspondente a uma mu/gamma-carragenana;

7 - A nu/iota-carragenana (ECW), utilizada no estudo de cinética da reação de ciclização, apresentou a 60 e 70 °C, uma velocidade cerca de 7 e 13 vezes mais rápida do que a mu/gamma-carragenana (FS2). Esta diferença se mostrou

diretamente relacionada ao teor de grupos sulfato esterificando os C-4 das unidades de β -D-galactopiranosose em cada uma das estruturas estudadas e ao efeito acelerador apresentado por este padrão de sulfatação;

8 - A velocidade de ciclização determinada para a nu-carragenana ECW foi 4,5 e 6,0 vezes superior à determinada para a mistura nu/mu-carragenana 1C₃ (CIANCIA et al., 1993), diferença esta atribuída a presença de sulfato em C-2 da unidade precursora;

9 - A fração F2S2, submetida à hidrólise redutiva parcial, originou cinco sub-frações oligossacarídicas (FA - FE). Análises espectroscópicas das sub-frações FC e FD mostraram que o teor de unidades de 3,6-anidro- α -D-galactopiranosose pertencentes a beta-carragenana era maior na primeira do que na segunda sub-fração. Quando comparadas a 70 e 80 °C, as velocidades de reação determinadas para FC se mostraram cerca de 4,0 e 3,3 vezes mais lentas do que as calculadas para FD, sendo influenciadas pelo menor teor de grupos sulfato em C-4 na primeira. A velocidade em FD foi 1,4 vezes superior a determinada para FS2, a 70 °C, e 9,7 vezes inferior a determinada para ECW, enquanto que FC, se mostrou 3,8 vezes mais lenta que FS2, na mesma temperatura, confirmando o efeito acelerador da reação do grupo sulfato em C-4 nas unidades de β -D-galactopiranosose.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, N.M.; FURNEAUX, R.H.; MILLER, I.J. WHITEHOUSE, L.A. Xylan from *Leptosarca simplex* and carrageenans from *Iridaea*, *Cenacrum* and *Nemastoma* species from the subantarctic islands of New Zealand. **Bot. Mar.**, **31**: 9-14, 1988.

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

ANDERSON, N.S.; DOLAN, T.C.S.; LAWSON, C.J; PENMAN, A.; REES, D.A. Carrageenans. Part 5. The masked repeating structure of kappa- and mu-carrageenans. **Carbohydr. Res.**, **7**: 468-473, 1968.

ANDERSON, N.S.; DOLAN, T.C.S.; REES, D.A. Carrageenans. Part VII. Polysaccharides from *Eucheuma spinosum* and *Eucheuma cottonii*. The Covalent Structure of ι -Carrageenan. **J. Chem. Soc.**, **19**: 2173-2176, 1973.

ANDERSON, N.S.; REES, D.A. Porphyran: a polysaccharide with a masked repeating structure. **J. Chem. Soc.**: 5880-5887, 1965.

ANONYMOUS. Monograph Nr. 1. **Carrageenan**. FMC corporation, Marine colloids Division, p. 6, 1977.

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

ASPINALL, G.O. **The Polysaccharides**, Vol. 2, Academic Press, New York. pp 195-285, 1983.

BALDAN, B.; ANDOLFO, P.; CULOSO, F.; TRIPODI, G.; MARIANI, P. Polysaccharide localization in the cell wall of *Porphyra leucosticta* (Bangiophyceae, Rhodophyta) during the life cycle. **Bot. Mar.**, **38**: 31-36, 1995.

BELLION, C.; BRIGAND, G.; PROMÉ, J.C.; BOCIEK, D.W.S. Identification et caractérisation des précurseurs biologiques des carraghénanes par spectroscopie de R.M.N.-¹³C. **Carbohydr. Res.**, **119**: 31-48, 1983.

BRASCH, D.J.; CHANG, H.M.; CHUAH, C.T.; MELTON, L.D. The galactan sulfate from the edible, red alga *Porphyra columbina*. **Carbohydr. Res.**, **97**: 113-125, 1981.

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

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

CERREZO, A.S. The carrageenan system of *Gigartina skottsbergii* S. et G. Part I. Studies on a fraction of kappa-carrageenan. **J. Chem. Soc. Sect. C. Org. Chem.**: 992-997, 1967.

CERREZO, A.S. The fine structure of *Chaetangium fastigiatum* xylan: studies of the sequence and configuration of the (1→3)-linkages. **Carbohydr. Res.**, **22**: 209-211, 1972.

CHOPIN, T.; KERIN, B.F.; MAZEROLLE, R. Phycocolloid chemistry as a taxonomic indicator of phylogeny in the Gigartinales, Rhodophyceae. **Phycol. Res.** **47 (3)**: 167-188, 1999.

CIANCIA, M. **Estudio de los carragenanos de plantas cistocarpicas del alga roja *Gigartina skottsbergii***. Tesis de doutorado. Departamento de Química Orgánica, Universidad de Buenos Aires, 307p., 1994.

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

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

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

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

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

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

CRAIGIE, J. S. **Cell walls**. In COLE, K.M.; SHEATH, R.G. **Biology of the red algae**. Cambridge University Press, Cambridge, pp 221-257, 1990.

CROWE, J.; CROWE, L.; CARPENTER, J.; WISTROM, C. Stabilization of dry phospholipid bilayers and proteins by sugars. **Biochem. J.**, **242**: 1-10, 1987.

DENIAUD, E.; QUEMENER, B.; FLEURENCE, J. LAHAYE, M. Structural studies of the mixed-linked β -(1 \rightarrow 3)/ β -(1 \rightarrow 4)-D-xylans from the cell wall of *Palmaria palmata* (Rhodophyta). **Int. J. Biol. Macromol.**, **33**: 9-18, 2003.

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

DININNO, V.; MCCANDLESS, E.L.; BELL, R.A. Pyruvic acid derivative of a carrageenan from a marine red algae (*Petrocelis* species). **Carbohydr. Res.**, **71**: C1-C4, 1979.

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

DOLAN, T.C.S.; REES, D.A. The carrageenans. Part 2. The positions of the glycosidic linkages and the sulphate esters in lambda-carrageenan. **J. Chem. Soc.:** 3534-3539, 1965.

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

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

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

ESTEVEZ, J.M.; CIANCIA, M.; CERESO, A. The system of low-molecular-weight carrageenans and agaroids from the room-temperature-extracted fraction of *Kappaphycus alvarezii*. **Carbohydr. Res.**, **325**: 287-299, 2000.

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

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

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

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

FARIA, P.C. **Estrutura química de carragenanas e galactanas híbridas D/L isoladas de *Gymnogongrus griffithsiae* (Gigartinales, Rhodophyta)**. Dissertação de Mestrado, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Paraná, 96p, 2001

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

FURNEAUX, R.H.; MILLER, I.J. Isolation and ^{13}C -NMR spectral study of the water soluble polysaccharides from four South African red algae. **Bot. Mar.**, **29**: 3-10, 1986.

GRAHAM, L.E.; WILCOX, L.W. **Algae**. First edition. Prentice-Hall, Inc. Upper Saddle River. 640pp, 2000.

GREER, C.W.; YAPHE, W. Characterization of hybrid (Beta-Kappa-Gamma) carrageenan from *Eucheuma gelatinae* J. Agardh. (Rhodophyta, Sollieriaceae) using

carrageenases, infrared and ^{13}C nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Bot. Mar.**, **27**: 473-478, 1984.

GRETZ, M.R.; ARONSON, J.M.; SOMMERFELD, M.R. Cellulose in the cell wall of the Bangiophyceae (Rhodophyta). **Science**, **207**: 779-780, 1980.

HAWORTH, W.N. A new method of preparing alkylated sugars. **J. Chem. Soc.**: 8-16, 1915.

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

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

JEREZ, J.R.; MATSUHIRO, B.; URZÚA, C.C. Chemical modifications of the xylan from *Palmaria decipiens*. **Carbohydr. Polym.**, **32**: 155-159, 1997.

KANDLER, O.; HOPF, H. Occurrence, metabolism and function of oligosaccharides. In STUMPF, P.K.; CONN, E.E. (eds). **The biochemistry of plants a comprehensive treatise – Carbohydrates: structure and function**, New York: Academic Press, v.3: 221-226, 1980.

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

KATZENELLENBOGEN, E.; KOCHAROVA, N.A.; ZATONSKY, G.V.; KÜBLER-KIELB, J.; GAMIAN, A.; SHASHKOV, A.S.; KNIREL, Y.A.; ROMANOWSKA, E. Structural and serological studies on *Hafnia alvei* O-specific polysaccharide of α -D-

mannan type isolated from the lipopolysaccharide of strain PCM 1223. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, **30**: 223-227, 2001.

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

KNUTSEN, S.H.; GRASDALEN, H. Characterization of water-extractable polysaccharides from Norwegian *Furcellaria lumbricalis* (Huds.) Lamour. (Gigartinales, Rhodophyceae) by IR and NMR Spectroscopy. **Bot. Mar.**, **30**: 497-505, 1987.

KNUTSEN, S.H.; MYLABODSKY, D.E.; GRASDALEN, H. Characterization of carrageenan fractions from Norwegian *Furcellaria lumbricalis* (Huds.) Lamour. By ¹H-nmr spectroscopy. **Carbohydr. Res.**, **206**: 367-372, 1990.

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

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

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

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

LAHAYE, M.; MICHEL, C.; BARRY, J.L. Chemical, physicochemical and in-vitro fermentation characteristics of dietary fibres from *Palmaria palmata* (L.) Kuntze. **Food Chemistry**, **47**, 29-36, 1993.

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

LAWSON, C.J.; REES, D.A. An enzyme for the metabolic control of polysaccharide conformation and function. **Nature**, **227**: 392-393, 1970.

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

LENZ, R.W. Distribution of methoxyl groups in the methylation of the monosodio derivatives of methyl α -D-glucopyranoside and cellulose. **J. Am. Chem. Soc.**, **82**: 182-186, 1960.

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

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

MATULEWICZ, M.C.; CEREZO, A.S². Alkali-soluble polysaccharides from *Chaetangium fastigiatum*: structure of a xylan. **Phytochem.**, **26**: 1033-1035, 1987.

MATULEWICZ, M.C.; CEREZO, A.S, JARRET, R.M.; SYN, N. High resolution ¹³C-nmr spectroscopy of "mixed linkage xylans". **Int. J. Biol. Macromol.**, **14**: 29-32, 1992.

- MATULEWICZ, M.C.; CERREZO, A.S.¹ Water-soluble sulfated polysaccharides from the red seaweed *Chaetangium fastigiatum*. Analysis of the system and the structure of the α -D-(1 \rightarrow 3)-linked mannans. **Carbohydr. Polym.**, **7**: 121-132, 1987.
- MATULEWICZ, M.C.; HAINES, H.H.; CERREZO, A.S. Sulphated xylogalactans from *Nothogenia fastigiata*. **Phytochem.**, **36**: 97-103, 1994.
- McCANDLESS, E.L.; CRAIGIE, J.S. Sulfated polysaccharides in red and brown algae. **Annual Rev. Plant Physiology**, **30**: 41-53, 1979.
- MILLER, I.J. The chemotaxonomic significance of the water-soluble red algal polysaccharides. **Recent. Devel. In Phytochem.**, **1**: 531-565, 1996.
- MOLLION, J.; MOREAU, S.; CHRISTIAEN, D. Isolation of a new type of carrageenan from *Rissoella verruculosa* (Bert.) J. Ag. (Rhodophyta, Gigartinales). **Bot. Mar.**, **29**: 549-552, 1986.
- MORRICE, L.M.; McLEAN, M.W. LONG, W.F.; WILLIAMSON, F.B. Porphyrin primary structure: An investigation using β -agarase I from *Pseudomonas atlantica* and ¹³C-NMR spectroscopy. **European Journal of Biochemistry**, **133**: 673-684, 1983.
- MU, X.; RIDING, R. Skeletal ultrastructure of the calcified red alga *Galaxaura oblongata*, Hainan Island, China. **Review of Palaeobotany and Palynology**, **104**: 205-212, 1999.
- MUKAI, L.S.; CRAIGIE, J.S.; BROWN, R.G. Chemical composition and structure of the cell walls of the conchocelis and thallus phases of *Porphyra tenera* (Rhodophyceae). **J. Phycol.**, **17**: 192-198, 1981.
- NAGASAWA, K.; INOUE, Y.; TOKUYASU, T. An improved method for the preparation of the chondroitin by solvolytic desulfation of chondroitin sulfates. **J. Biol. Chem.**, **86**: 1323-1327, 1979.

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

NOSEDA, M.D.; CEREZO, A.S. Alkali modification of carrageenans-II. The cyclization of model compounds containing non-sulfated β -D-galactose units. **Carbohydr. Polym.**, **26**: 1-3, 1995.

NOSEDA, M.D. **Polissacarídeos sulfatados isolados da fase tetrasporofítica de *Gigartina skottisbergii* (Rhodophyta, Gigartinales)**. Tese de doutorado, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Paraná. 173p, 1994.

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

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

OKAZAKI, M.; ICHIKAWA, K.; FURUYA, K. Studies on the calcium carbonate deposition of algae – IV. Initial calcification site calcareous red algae *Galaxaura fastigiata* Decaisne. **Bot. Mar.**, **25**: 511-517, 1982.

O'NEILL, A.N. Derivatives of 4-O- β -D-galactopyranosyl-3,6-anhydro-D-galactose from kappa-carrageenin. **J. Am. Chem. Soc.**, **77**: 6324-6326, 1955.

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

PARK, J.T.; JOHNSON, M.J. A Submicrodetermination of glucose. **J. Biol. Chem.**, **181**, 1949.

PENNAN, A.; REES, D.A. Carrageenans. Part 9. Methylation analysis of galactan sulphates from *Furcellaria fastigiata*, *Gigartina canaliculata*, *Gigartina chamissoi*, *Gigartina atropurpurea*, *Ahnfeltia durvillaei*, *Gymnogongrus furcellatus*, *Eucheuma isiforme*, *Eucheuma uncinatum*, *Aghardiella tenera*, *Pachymenia hymantophora* and *Gloiopeltis cervicornis*. Structure of xi-carrageenan. **J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1:** 2182-2187, 1973.

PERCIVAL, E.J.V. Carbohydrate sulfates. **Quart. Rev.** 3: 369-384, 1949.

PRADO-FERNÁNDEZ, J.; RODRÍGUEZ-VÁSQUEZ, J.A.; TOJO, E.; ANDRADE, J.M. Quantitation of κ -, ι - and λ -carrageenans by mid-infrared spectroscopy and PLS regression. **Analytica Chimica Acta**, 480: 23-37, 2003.

RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E. **Biologia Vegetal**, Quinta edição. Guanabara/Koogan, Rio de Janeiro. p 248-259, 1996.

REES, D.A. Structure, conformation and mechanism in the formation of polysaccharide gels and networks. **Adv. Carbohydr. Chem.**, 24: 267-332, 1965.

SANTOS, G.A. Carrageenans of species of *Eucheuma* J. Agardh and *Kappaphycus* Doty (Solieriaceae, Rhodophyta). **Aquatic Botany**, 36: 55-67, 1989.

SOUTH, G.R.; WHITTICK, A. **Introduction to Phycology**, First publication. Blackwell Scientific Publications, Oxford. 341pp, 1987.

STANCIOFF, D.J.; STANLEY, N.F. Infrared and chemical studies on algal polysaccharides. **Proc. Int. Seaweed Symp.** 6: 595-609, 1969.

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

STORTZ, C.A.; BACON, B.E.; CHERNIAK, R.; CEREZO, A.S. High-field NMR spectroscopy of cystocarpic and tetrasporic carrageenans from *Iridaea undulosa*. **Carbohydr. Res.**, **261**: 317-326, 1994.

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

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

STORTZ, C.A.; CEREZO, A.S. The system of carrageenans from cystocarpic and tetrasporic stages from *Iridaea undulosa*: fractionation with potassium chloride and methylation analysis of the fractions. **Carbohydr. Res.**, **242**: 217-227, 1993.

SUGIHARA, J.M. Relative reactivities of hydroxyl groups of carbohydrates. **Adv. Carbohydr. Chem.**, **8**: 1-44, 1953.

TAKANO, R.; HAYASHI, K.; HARA, S.; HIRASE, S. Funoran from red seaweed, *Gloiopeltis complanata*: polysaccharides with sulphated agarose structure and their precursor structure. **Carbohydr. Polym.**, **35**: 81-87, 1994.

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

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

TURVEY, J.R. sulfates of the simple sugars. **Adv. Carbohydr. Chem.**, **20**: 183-218, 1965.

TURVEY, J.R.; WILLIAMS, E.L. The structure of some xylans from red algae. **Phytochem.**, **9**: 2383-2388, 1970.

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

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

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

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

USOV, A. I.; ELASHVILI, Y.A. Polysaccharides of Algae: 44. Investigation of Sulfated Galactan from *Laurencia nipponica* Yamada (Rhodophyta, Rhodomelaceae) Using Partial Reductive Hydrolysis. **Bot. Mar.**, **34**: 553-560, 1991.

USOV, A.I.; IVANOVA, E.G. Polysaccharides of Algae XXXVII: Characterization of Hybrid Structure of Substituted Agarose from *Polysiphonia morrowii* (Rhodophyta, Rhodomelaceae) Using β -Agarase and ^{13}C -NMR Spectroscopy. **Bot. Mar.**, **30**: 365-370, 1987.

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

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

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

USOV, A.I.; YAROTSKII, S.V. Polysaccharides of algae. XXI. Alkaline degradation of sulfated mannan from the red alga *Nemalion vermiculare* Sur. **Bioorg. Khim.** **1**: 919-922.

USOV, A.I.; YAROTSKII, S.V.; SHASHKOV, A.S. ¹³C-NMR spectroscopy of red algal galactans. **Biopolymers**, **19**: 977-990, 1980.

VAN DE VELDE, F.; KNUTSEN, S.H.; USOV, A.I.; ROLLEMA, H.S.; CEREZO, A.S. ¹H and ¹³C high resolution NMR spectroscopy of carrageenans: application in research and industry. **Trends in Food Science & Technology**, **13**: 73-92, 2002.

VAN DE VELDE, F.; PEREIRA, L.; ROLLEMA, H.S. The revised NMR chemical shift data of carrageenans. **Carbohydr. Res.**, **339**: 2309-2313, 2004.

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

VIANA, A.G. **Estudo de uma porfirana com estrutura não usual obtida da alga vermelha *Porphyra columbina* Montagne (Bangiales, Rhodophyta)**. Dissertação de Mestrado. Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Paraná. 97p, 2000.

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

VILLARROEL, L.H.; ZANLUNGO, A.B. Structural studies on the porphyran from *Porphyra columbina* (Montagne). **Carbohydr. Res.**, **88**: 139-145, 1981.

WHISTLER, R.L.; DURSO, D.F. Chromatographic separation of sugars on charcoal. **J. Am. Chem. Soc.**, **72**: 677-679, 1950.

WONG, K.F.; CRAIGIE, J.C. Sulfohydrolase Activity and Carrageenan Biosynthesis in *Chondrus crispus* (Rhodophyceae). **Plant. Physiol.**, **61**: 663-666, 1978.

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

YAPHE, W.; ARSENAULT, G.P. Improved resorcinol reagent for determination of fructose and 3,6-anhydrogalactose in polysaccharides. **Anal. Biochem.**, **13**: 143-148, 1965.

ZABLACKIS, E.; SANTOS, G.A. The carrageenan of *Catenella nipae* Zanard., a marine red alga. **Bot. Mar.**, **29**: 319-322, 1986.

ZIBETTI, R.G.M. **Determinação da estrutura química de galactanas híbridas D/L isoladas da alga vermelha *Cryptonemia crenulata* (Cryptonemiales, Rhodophyta)**. Dissertação de Mestrado. Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Paraná. 68p, 2000.

ZINOUN, M.; DIOURIS, M.; POTIN, P.; FLOC'H, J.Y.; DESLANDES, E. Evidence of Sulfohydrolase Activity in the Red Alga *Calliblepharis jubata*. **Bot. Mar.**, **40**: 49-53, 1997.

ANEXOS



Alkali modification of carrageenans. Part V. The iota–nu hybrid carrageenan from *Eucheuma denticulatum* and its cyclization to iota-carrageenan[☆]

Adriano G. Viana^a, Miguel D. Nosedá^{a,*}, Maria Eugênia R. Duarte^a, Alberto S. Cerezo^{b,*}

^aDepartamento de Bioquímica e Biología Molecular, Universidade Federal do Paraná. P.O. Box 19046, CEP 81531-990 Curitiba, Paraná, Brasil

^bDepartamento de Química Orgánica (CIHIDECAR-CONICET), Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Pabellón 2, Ciudad Universitaria, 1428, Buenos Aires, Argentina

Received 6 May 2004; revised 20 July 2004; accepted 9 August 2004

Abstract

A homogeneous iota/nu-hybrid carrageenan (71% iota- and 21% nu-) isolated from *Eucheuma denticulatum* was used as a model compound to study the cyclization reaction of α -D-galactose 2,6-disulfate units to 3,6-anhydro- α -D-galactose 2-sulfate. The rate of cyclization, at 70 °C, of this carrageenan is about 50 times faster than that of a porphyran (non-sulfated β -D-galactose linked to α -L-galactose 2,6-disulfate) and 210 times faster when compared with a lambda-carrageenan (2-sulfated β -D-units linked to α -D-galactose 2,6-disulfate). The results of this model compound confirms the previous hypothesis of the accelerating effect of the β -D-4-sulfate group as well as suggests the importance of the 2-sulfate of the α -D-galactose units on the ${}^4C_1 \rightarrow {}^1C_4$ chair forms interchange. The easy of cyclization indicates that to produce commercial iota-carrageenans milder alkaline treatments could be used, avoiding degradation and increasing the gel strength.

© 2004 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Alkaline treatment; Cyclization rate, Iota-carrageenan; *Eucheuma denticulatum*

Introduction

The formation of 3,6-anhydro- α -D-galactopyranose units from α -D-galactopyranose 6-sulfate residues by alkaline treatment is an important and well-known reaction underlying the modification of carrageenans (Percival, 1949; Turvey, 1965). We have studied the kinetics of this reaction in lambda- and iota-carrageenans (Ciancia, Nosedá, Matulewicz, & Cerezo, 1993), lambda-derived oligosaccharides (Nosedá & Cerezo, 1995) and porphyrans (Nosedá, Viana, Duarte, & Cerezo, 2000). These works show the influence that the sulfate groups have on the cyclization rates. The presence of

sulfate at C-2 of β -D-galactose unit as in lambda-carrageenans has a decelerating effect, whereas at C-4 as in carrageenans of the kappa family accelerates the cyclization reaction. Fig. 1 shows the disaccharide repeating units of the before mentioned polysaccharides.

In this paper we extended these studies to an iota-carrageenan that was extracted from the commercially cultivated algae *Eucheuma denticulatum*. Alkaline extraction of this red seaweed is commonly used for the industrial production of the gel forming polysaccharide iota-carrageenan (Van de Velde, Knutsen, Usov, Rollema, & Cerezo, 2002; Aguilan et al., 2003). Nevertheless, in spite of the high commercial value of the seaweed and of its polysaccharide, detailed studies have not been carried out on the structure of the biosynthesized carrageenan and on the best conditions for the alkaline cyclization of its 'precursor units' to produce a 'nearly pure' iota-carrageenan. Thus, in this paper the iota/nu hybrid carrageenan extracted from the seaweed with water at room temperature was worked out with modern techniques and used

[☆]For Part IV, see Nosedá et al. (2000).

*Corresponding authors. Tel.: +55-413611663, fax: +55-412662042.

E-mail addresses: nosedaeu@ufpr.br (M.D. Nosedá), cerezo@qo.fcen.unicor.br (A.S. Cerezo).

M.D. Nosedá is a research member of the National Research Council of Brazil (CNPq).

A.S. Cerezo is a research member of the National Research Council of Argentina (CONICET).

Tel./fax: +54-11-45763346.

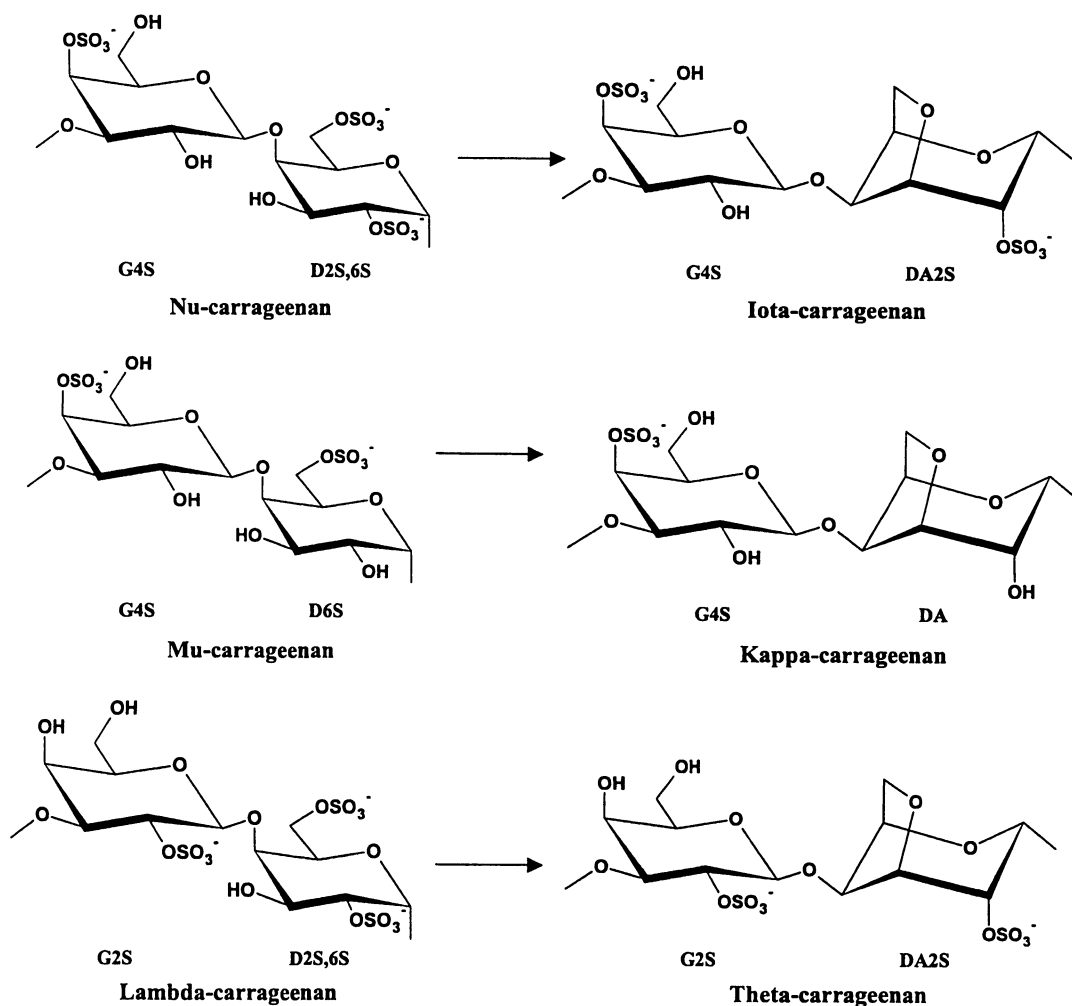


Fig. 1. Disaccharide repetitive structures of carrageenans.

a model compound to study the kinetics of the cyclization of the (1→4)-linked α -D-galactopyranose 2,6-disulfate units to (1→4)-linked 3,6-anhydro- α -D-galactopyranose 2-sulfate residues, in a 'pure' nu-structure and to determine its rate constant and half-life.

Material and methods

1. Material

Commercial samples of *E. denticulatum* (N.L. Burman) S. Collins & Hervy from Philippines were obtained from Fyffes S.A. (Puerto Montt, Chile).

2. Extraction of polysaccharides

The milled seaweed was extracted with water (5 g% w/v) at room temperature (25 °C), with mechanical stirring, for 24 h. The residue was removed by centrifugation and the supernatant was poured into ethanol (three volumes) to precipitate the polysaccharide fraction ECW. This fraction

was purified by redissolution in water, dialysis, centrifugation and lyophilization (yield 24%).

2.3. Alkaline treatment

The analytical alkaline treatment was carried out as described by Ciancia et al. (1993). 3 M sodium hydroxide (1 ml) was added to the sample (4 mg), previously dissolved in water (2 ml) and reduced with sodium borohydride (10% w/w), reaching the final concentration of 0.1 M sodium hydroxide. This solution was then heated at 40, 50, 60 and 70 °C. Samples were taken at regular intervals, the reaction stopped by cooling in an ice bath and neutralized with 1 M hydrochloric acid. 3,6-anhydrogalactose content was determined by resorcinol method (Yaphe, 1960). From these results, the rate constants and half-life were determined at each temperature. The preparative alkaline treatment of ECW was carried out at 80 °C in 0.1 M sodium hydroxide. After 0.5 h of treatment the solution was cooled, neutralized, dialyzed and freeze-dried rendering the alkali-modified polysaccharide ECW-m (yield 80%).

Chemical analyses

The monosaccharide composition of ECW and ECW-m were determined after reductive hydrolysis (Stevenson & Furneaux, 1991; Falshaw & Furneaux, 1994) by GC. The sulfate content was determined as described by Dodgson & Price (1962).

Optical rotation analysis

Optical rotation of aqueous solution of polysaccharide samples (0.2%), were measured at 20 °C, using a 10 cm cell sodium D line (589.3 nm) with a Rudolph Autopol III automatic polarimeter.

Fourier-transform infrared analysis (FT-IR)

The FTIR spectra of KBr pellets of polysaccharides (100 mg KBr) were recorded in a Perkin–Elmer Series 200 FTIR spectrophotometer (eight scans, at a resolution of 4 cm⁻¹) scanning between 4000 and 400 cm⁻¹.

Methylation analysis

Methylation analysis was carried out by the method of Danby and Kerek (1984) on the triethylammonium salts of carrageenans (Stortz & Cerezo, 1993) using methyl iodide. The permethylated polysaccharides were hydrolyzed following the reductive hydrolysis procedure (Stevenson & Furneaux, 1991; Falshaw & Furneaux, 1994) and analyzed by GC and MS as partially methylated alditol acetates. Iota- and kappa-structure percentages were calculated from the amount of 3,6-anhydrogalactose and 3-O-methyl galactose, respectively, in ECW and from 2,6-di-O-methyl galactose (iota-) in ECW-m.

Gas chromatography (GC) and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) analysis

GC analyses were carried out with a HP-5890 gas chromatograph equipped with a flame ionization detector (FID), using a fused silica capillary column (30 m × 0.25 mm) coated with DB-225. Chromatography was run

isothermally at 210 °C. Both injector and FID temperature were at 250 °C. Nitrogen was used as carrier gas at a flow rate of 1 ml/min and a split ratio of 100:1. GC-MS analyses were performed using a Varian 3300 chromatograph and a Finnigan Mat ITD spectrometer. The chromatograph was programmed to run at 50 °C for 1 min, then 50–220 °C at 40 °C/min. Helium was used as the carrier gas at 1 ml/min.

2.9. Nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR) analysis

For NMR spectroscopic analysis the lyophilized sample was dissolved in D₂O (20 mg/0.6 ml). The NMR spectrum of the solution was recorded at 70 °C using a Bruker Avance DRX400 NMR spectrometer. ¹³C NMR spectra of ECW and ECW-m were obtained using a multinuclear inverse detection 5 mm probe. Chemical shifts are expressed in ppm using acetone as internal standard at 30.2 ppm.

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

HPSEC analysis was carried out with a 2 mg/ml solution of polysaccharide, using a multidetection equipment with a Waters 2410 differential refractometer (RI) and a Wyatt Technology Dawn F multiangle laser light scattering (MALLS) detector adapted on-line. Four Waters Ultrahydrogel 2000/500/250/120 columns were connected in series and coupled to the multidetection equipment. A 0.1 M NaNO₃ solution, containing NaN₃ (0.5 g/l), was used as eluent.

3. Results

The seaweed was extracted with water at room temperature and the polysaccharide was recovered by precipitation with ethanol and purified by redissolution and dialysis. The polysaccharide fraction (ECW), homogeneous as determined by HPSEC-MALLS, was obtained with 24% yield, containing 30.7% of sulfate (2.2 mol of sulfate every disaccharide unit), galactose and 3,6-anhydrogalactose as monosaccharide constituents (Table 1).

Table 1
Yield, analysis and monosaccharide compositions of native and permethylated ECW and ECW-m

Sample	Yield ^a (%)	[α] _D ²⁰ (°)	SO ₃ Na (%)	Monosaccharide (mol%)		Methylation analysis (mol%)				
				AnGal ^b	Gal ^c	2,6-MGal ^d	6-MGal ^e	3-MGal ^f	2-MGal ^g	AnGal
ECW	24	+29.0	30.7	36.1	63.9	46.9	2.3	10.3	5.1	35.4
ECW-m	80	+16.5	24.3	49.0	51.0	46.8	0.8	1.3	2.8	48.3

^a Related to milled seaweed submitted to extraction (ECW) and polysaccharide mass initially submitted to preparative alkaline treatment (ECW-m).

^b 6-Anhydrogalactose

^c Galactose.

^d 6-Di-O-methyl galactose

^e 3-O-Methyl galactose

^f 6-O-Methyl galactose.

^g 2-O-Methyl galactose.

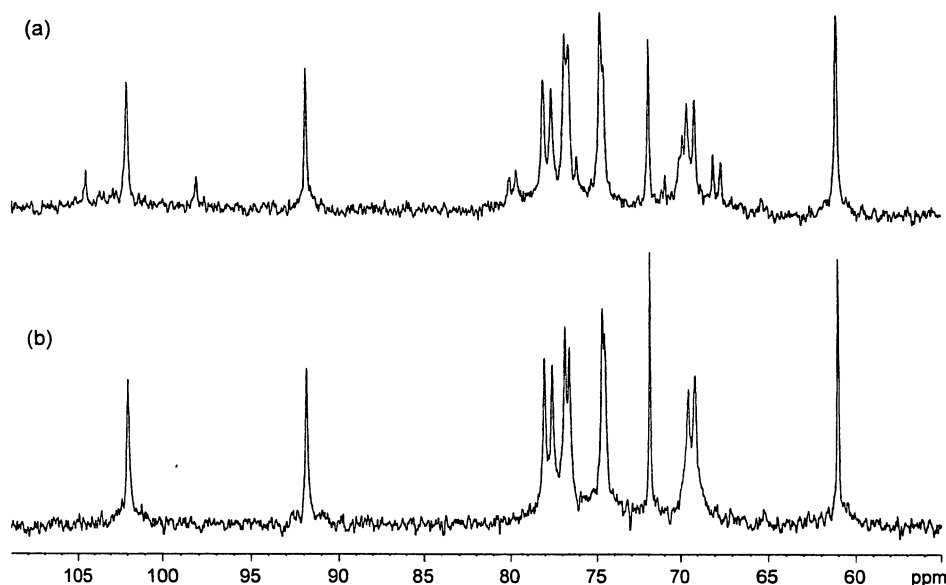


Fig. 2. ^{13}C NMR spectra of partially cyclized nu-carrageenan (ECW) before (a) and after (b) alkaline treatment (ECW-m).

This product was submitted to a preparative alkaline treatment for 0.5 h, giving a homogeneous fraction ECW-m with 80% yield and 24.3% of sulfate. Its ^{13}C NMR spectrum (Fig. 2b) showed 12 absorption peaks typical of an alpha-carrageenan (Usov & Shashkov, 1985) different from the original one (ECW, Fig. 2a), in which this pattern of absorption was shown together with a minor one of a nu-carrageenan (Stortz, Bacon, Cherniak, & Cerezo, 1994).

Both FTIR spectra were very similar, with an increase in $\nu_{\text{C-S}}$ absorptions at 928.7 and 805.1 cm^{-1} in the alkali-treated derivative corresponding to the 3,6-anhydro ring and sulfate linked to C-2 of 3,6-anhydrogalactose, respectively (Mellion, Brigand, Prone, & Bociek, 1983; Prado-Fernández, Rodríguez-Vásquez, Tojo, & Andrade, 2003). No signals corresponding to nu-carrageenan (absorptions of equatorial and primary sulfate groups) were detected in the spectrum of the original product in spite of the 10.3% of 2,6-disulfated beta-galactopyranosyl units, determined by methylation analysis (Table 1). Comparison of the percentages of 3,6-anhydrogalactose in the original and methylated products indicates that no cyclization was produced during methylation. Methylation analysis of both, original and alkali-treated products (ECW and ECW-m) also indicate the presence of 46.9–46.8% of 2,6-di-*O*-methyl galactose and 44 and 48.3%, respectively, of 3,6-anhydrogalactose (Table 1), showing that the original one contained about 72% of iota-structure (compositional analysis showed 72% of iota-structure, Table 1) together with approximately 21% of nu-backbone while the treated one contained 94% of alpha-structure. The alkaline derivative showed together with an increase in 3,6-anhydrogalactose, indicative of the cyclization of the 4-linked 2,6-disulfated alpha-D-galactose units into the 2-sulfate 3,6-anhydrogalactose, traces of 2-*O*-methyl galactose (1.3%), compatible with a slightly incomplete cyclization (Table 1). Small amounts of

6-*o*-methyl galactose (2.3–0.8%) and 2-*O*-methyl galactose (5.1–2.8%) detected for both fractions could suggest the presence of unusual units such as 3-linked 2,4-disulfate beta-D-galactose (alternatively 4-linked 2,3-disulfate alpha-D-galactose residues) and 4-linked 3,6-disulfate alpha-D-galactose (alternatively 3-linked 4,6-disulfate beta-D-galactose), respectively.

The cyclization reaction of ECW follows, as the previous ones (Ciancia et al., 1993), a pseudo first-order kinetics as determined by the plot $\ln(A_0 - A_\infty)/(A_t - A_\infty)$ as a function of time (Fig. 3). Table 2 shows the rate constant and half-life for ECW in M sodium hydroxide, at different temperatures, compared with those previously reported for different carrageenans (Ciancia et al.), carrageenan derivatives (Noseda & Cerezo, 1995) and porphyran (Noseda et al., 2000). The cyclization was too fast to be measured at 80°C . At 60 and 70°C (Table 2) the reaction constants are about 25 and 50 times higher than that of porphyran PC75, an agaran without sulfation on the beta-D-unit and 6-sulfation on the alpha-L-residue. Table 2 also shows that the cyclization of ECW is about 160–210 times faster than that of a lambda-carrageenan (1T₂) with non-sulfated and 2-sulfated beta-D-units and 2,6-disulfated alpha-D-residues (Ciancia et al.).

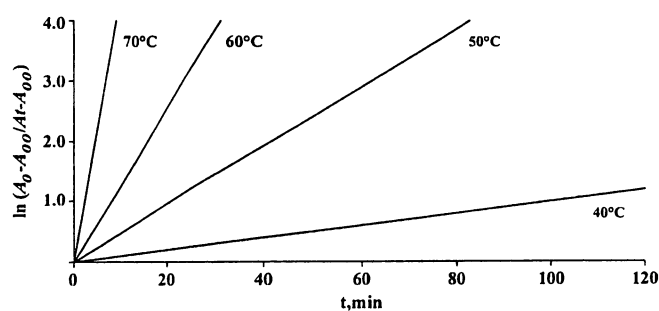


Fig. 3. Determination of the rate constants of the cyclization reaction for nu-carrageenan ECW, at 40, 50, 60 and 70°C .

Table 2
Cyclization reactions for nu-carrageenan ECW in M NaOH, at different temperatures

Temperature (°C)	Rate constant k (10^4 s^{-1})				$t_{1/2}$ (min)			
	ECW	1C ₃ ^a	PC75 ^b	1T ₂ ^a	ECW	1C ₃	PC75	1T ₂
2.0	–	–	–	–	69.4	–	–	–
7.0	2.3	–	–	0.04	15.8	49.9	–	3000
21.0	4.8	1.0	–	0.14	5.4	24.0	139.0	850
77.0	13.0	1.5	–	0.35	1.5	9.0	77.0	320
–	26.0	4.9	–	0.67	–	4.5	23.0	170
–	59.0	11.0	–	1.11	–	2.0	10.5	130

^a 1C₃, Partially cyclized mu/nu-carrageenan and 1T₂, lambda-carrageenan (Ciancia et al., 1993).

^b PC75 Porphyran (Nosedá et al., 2000).

Discussion

The carrageenan from *E. denticulatum* (former *E. possum*) was studied firstly by Anderson, Dolan, and Salsbery (1973). They obtained, by hot water extraction, an iota/nu-hybrid carrageenan (using the current nomenclature) with about 8–9% of precursor, 2,6-disulfate α -D-galactose units and small amounts (6 and 4%, respectively) of non-sulfated (1 \rightarrow 3)- and (1 \rightarrow 4)-linked residues.

The carrageenan from *E. denticulatum* has become most valuable to industry since it produces a 'nearly ideal' iota-carrageenan upon alkali modification, and the seaweed is currently farmed in the Philippines and other countries in the Far East. Its high commercial value has promoted studies on the alkali-treated modification (Santos, 1989; Aguilan et al., 2003) but they did not deepen into the structure of the original product.

Thus, extraction of the seaweed with water at 115–120 °C yields a polysaccharide (40–50% yield), which was worked out as a high alkali-treated derivative (Aguilan et al., 2003). The alkaline-modified product contains not only galactose and 3,6-anhydrogalactose but also a small amount of xylose, which is not usual in carrageenans. Methylation analysis revealed the expected iota-structural units but also small amounts of 3,6-anhydrogalactose, (1 \rightarrow 4) linked α -D-galactose, a disulfated unit and non-reducing end-chain galactose. The carrageenans are non-branched linear polysaccharides with a 4-OH end residue (3.5%), indicating a molecular weight about 100 kDa, suggests degradation during the extraction or the alkaline treatment of the original carrageenan.

The extraction of the carrageenan from *E. denticulatum* was carried out different from previous works this time at different temperatures on the basis that the distribution of the precursor unit in the carrageenan molecules would produce, even if with lower yield, a sample with higher amounts of disulfate α -D-galactopyranosyl units and, as a consequence, higher solubility.

The product obtained was 92% an iota/nu-hybrid carrageenan with approximately 21% of nu-structure (see experimental) and only 7% of 'unusual units'. Thus, it was a natural model to study the cyclization rate of the 2,6-disulfated α -D-galactopyranosyl units linked to β -D-galactose-4-sulfate residues. The cyclization of the nu-structure in

the carrageenan from *E. denticulatum* was the fastest determined (Table 2). Comparison of its rate constant with that obtained in the cyclization of 1C₃ (the nearest value, Table 2) is not straightforward due to the structural complexity of 1C₃ (it contains non-sulfated and 4-sulfated β -D-units together with 6- and 2,6-sulfated α -D-residues (Ciancia et al., 1993)) but a rough appreciation of the data (Table 2) suggests that the cyclization of a 'pure' nu-carrageenan should be slower than that of a 'pure' mu-carrageenan. This difference could be rationalized supposing that the ionization of the C-3–OH in the α -units (the repulsive interaction between the negative charges in the C-2 and C-3 groups of the pyranose cycle is the driven force for the exchange of the ⁴C₁ \rightarrow ¹C₄ chair forms, for the mechanism of the alkaline cyclization, see refs. Percival, 1949; Turvey, 1965) could be suppressed more efficiently by the C-2 hydroxide anion (C-2–O[–]) in a mu-carrageenan (the C-2 hydroxyl of the same unit would ionize first due to its higher acidity (Lenz, 1960; Sugihara, 1953)) than by the C-2 sulfate anion (C-2–O–SO₃[–]) in a nu-carrageenan, considering that this last group would situate the negative charge farther apart.

The extraction from *E. denticulatum* of an iota/nu-hybrid carrageenan with a higher percentage of nu-precursor units, and therefore more adequate for the kinetic studies, by choosing the conditions of the extractions exemplify the importance of this step in the study of the structurally dispersed polysaccharides. Alkaline extractions of seaweeds producing carrageenans of the kappa family must be avoided, even at room temperature, as the products obtained could be different of the native ones. The ease with which the cyclization reaction takes place in the carrageenans of the kappa family (this paper and Ciancia et al., 1993) indicates that the alkaline treatments used industrially to increase the gelling properties of crude carrageenans could be carried out under milder conditions giving products with lower degradation and, consequently, higher gel strengths.

Acknowledgements

The authors are indebted to Mr Jaime Zamorano from Gelymar S.A. for the algal material. The work was

supported by grants from Pronex-Carbohidratos (CNPq), CONICET and University of Buenos Aires. One of the authors (AGV) also acknowledges the financial support from CNPq (PhD fellowship).

References

- Aguilan, J. T., Broom, J. E., Hemmingson, J. A., Dayrit, F. M., Montañó, M. N. E., Dancel, M. C. A., Niñonuevo, M. R., & Furneaux, R. H. (2003). Structural analysis of carrageenan from farmed varieties of Philippine seaweed. *Botanica Marina*, *46*, 179–192.
- Anderson, N. S., Dolan, T. C. S., & Rees, D. A. (1973). Carrageenans. Part VII. Polysaccharides from *Eucheuma spinosum* and *Eucheuma cottonii*. The covalent structure of ι-carrageenan. *Journal of Chemical Society*, *19*, 2173–2176.
- Bellion, C., Brigand, G., Prome, J. C., & Bociek, D. W. S. (1983). Identification et caractérisation des précurseurs biologiques des carraghénanes par spectroscopie de R.M.N.-¹³C. *Carbohydrate Research*, *119*, 31–48.
- Ciancia, M., Nosedá, M. D., Matulewicz, M. C., & Cerezo, A. S. (1993). Alkali-modification of carrageenans: mechanism and kinetics in the kappa/iota, mu/nu and lambda-series. *Carbohydrate Polymers*, *20*, 95–98.
- Ciucanu, I., & Kerek, F. (1984). A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. *Carbohydrate Research*, *131*, 209–217.
- Dodgson, K. S., & Price, R. G. (1962). A note on the determination of the sulphate ester of sulphated polysaccharide. *Biochemical Journal*, *84*, 106–110.
- Falshaw, R., & Furneaux, R. H. (1994). Carrageenan from the tetrasporic stage of *Gigartina decipiens* (Gigartinales Rhodophyta). *Carbohydrate Research*, *252*, 171–182.
- Lenz, R. W. (1960). Distribution of methoxyl groups in the methylation of the monosodio derivative of methyl alpha-D-glucopyranose and cellulose. *Journal of American Chemical Society*, *82*, 182–186.
- Nosedá, M. D., & Cerezo, A. S. (1995). Alkali modification of carrageenans-II. The cyclization of model compounds containing non-sulfated β-D-galactose units. *Carbohydrate Polymers*, *26*, 1–3.
- Nosedá, M. D., Viana, A. G., Duarte, M. E. R., & Cerezo, A. S. (2000). Alkali modification of carrageenans. Part IV. Porphyrans as model compounds. *Carbohydrate Polymers*, *42*, 301–305.
- Percival, E. J. V. (1949). Carbohydrate sulfates. *Quarterly Reviews*, *3*, 369–384.
- Prado-Fernández, J., Rodríguez-Vásquez, J. A., Tojo, E., & Andrade, J. M. (2003). Quantitation of κ-, ι- and λ-carrageenans by mid-infrared spectroscopy and PLS regression. *Analytica Chimica Acta*, *480*, 23–37.
- Santos, G. A. (1989). Carrageenans of species of *Eucheuma* J. Agardh and *Kappaphycus* Doty (Solieriaceae, Rhodophyta). *Aquatic Botany*, *36*, 55–67.
- Stevenson, T. T., & Furneaux, R. H. (1991). Chemical methods for the analysis of sulfated galactans from red algae. *Carbohydrate Research*, *210*, 277–298.
- Stortz, C. A., Bacon, C. F., Cherniak, R., & Cerezo, A. S. (1994). High field NMR spectroscopy of cystocarpic and tetrasporic carrageenans from *Iridaea undulosa*. *Carbohydrate Research*, *261*, 317–326.
- Stortz, C. A., & Cerezo, A. S. (1993). The system of carrageenans from cystocarpic and tetrasporic stages from *Iridaea undulosa*: fractionation with potassium chloride and methylation analysis of the fractions. *Carbohydrate Research*, *242*, 217–227.
- Sugihara, M. J. (1953). Relative reactivities of hydroxyl groups in carbohydrates. *Advances in Carbohydrate Chemistry*, *8*, 1–44.
- Turvey, J. R. (1965). Sulfates of the simple sugars. *Advances in Carbohydrate Chemistry*, *20*, 183–218.
- Usov, A., & Shashkov, A. S. (1985). Polysaccharides of algae. 34. Detection of iota-carrageenan in *Phyllophora brodiaei* (Turn.) J. Ag. (Rhodophyta) using ¹³C-NMR spectroscopy. *Botanica Marina*, *28*, 367–373.
- Van de Velde, F., Knutsen, S. H., Usov, A. I., Rollema, H. S., & Cerezo, A. S. (2002). ¹H and ¹³C high resolution NMR spectroscopy of carrageenans: application in research and industry. *Trends in Food and Technology*, *13*, 73–92.
- Yaphe, W. (1960). Colorimetric determination of 3,6-anhydrogalactose and galactose in marine algal polysaccharides. *Analytical Chemistry*, *32*, 1327–1330.