

LUCIANA GARCIA FERREIRA

**ESTRUTURA QUÍMICA E ATIVIDADE ANTIVIRAL DE
POLISSACARÍDEOS SULFATADOS OBTIDOS DE ALGAS
DO COMPLEXO LAURENCIA (CERAMIALES,
RHODOPHYTA).**

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

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

Co-Orientador: Prof. Dr. Miguel Daniel Nosedá

CURITIBA
2011

Aos meus pais Adelino e Elizama,
pelo apoio, confiança e por serem
os melhores pais do mundo.

AGRADECIMENTOS

A Deus.

À professora Maria Eugênia e ao professor Miguel pela orientação, ensinamentos, amizade e paciência ao longo de todos esses anos. Obrigada também pelas ótimas conversas e pelas boas risadas. Além do grande aprendizado foi, também, muito divertido.

À professora Mutue e sua aluna Érica pela coleta das algas.

À professora Maria Teresa Villela Romanos pelas análises antivirais.

À Eliz (Elizângela) e à Ro (Rosane) pelas análises, pela amizade, pela disponibilidade para ajudar sempre, pela agradável convivência e ótimas conversas

Aos professores e alunos que dedicam tempo e atenção para o bem de todos: Muito obrigada.

Às amigas que eu conheci na iniciação científica, que eu amo de paixão e quero levar prá vida toda, Ju Cassolato e Fer Simas.

Ao pessoal que fazia parte do laboratório quando eu iniciei na área da pesquisa e que, cada um deles, me ensinou alguma coisa que eu carrego até hoje: Adriano, Alan, Alexandre, Diogo, Fran, Ju Cassol (de novo!), Marco André, Paula, Rosiane, Sérgio: Vocês são muito legais; foi (é) muito legal “conviver e aprender” com vocês!

Às meninas do lab que já “passaram” por aqui, e às que ainda estão na batalha: Camila, Gilda, Jenifer, Ju Rizzi, Ju Ropelatto, Louise, Pauline, Siliane, Taline, Tati e a todos os outros colegas e amigos de laboratório pela agradável convivência.

Aos colegas e amigos de laboratórios vizinhos: Heide, Ana Helena, Lauro, Thales, Nessana, Arquimedes, Daniel, Andréia. Obrigada pela agradável convivência, momentos de descontração, conselhos e casuais empréstimos pelo bem da ciência.

À minha companheira de sempre Fran, pela convivência sempre agradável de manhã, de tarde e à noite, durante a semana e fins de semana... Franzoca, você é tudo de muito bom. Sem você teria sido tudo bem mais difícil! Obrigada por fazer parte da minha vida.

Aos meus amigos queridos, companheiros de ótimas conversas, risadas, teatros, jantares, cafés, etc...: Andréia, Rafael, Nicole, Gustavo, Mariana Maia, Juliana, João, Danilo, Gabriel, Rebeca, Paulo. Vocês fazem com que minha vida seja mais feliz!

À minha família maravilhosa, obrigada pai, mãe, Ton (*in memoriam*) e Lali, POR TUDO!!!

Ao Alexandre, por todo apoio, companheirismo e paciência. Você é dez!

Ao curso de pós-graduação em Ciências - Bioquímica e aos órgãos financiadores de pesquisa no Brasil pelo suporte financeiro: CNPQ, CAPES, REUNI e Fundação Araucária.

RESUMO

A extração sequencial realizada nas algas vermelhas *Palisada flagellifera*, *Laurencia filiformis* e *Laurencia aldingensis* (Complexo *Laurencia*, Rhodomelaceae, Ceramiales) com água a 25°C e 80°C, seguido de tratamento com KCl e cromatografia de troca iônica deu origem a frações polissacarídicas homogêneas obtidas a partir dessas espécies. A análise estrutural da agarana homogênea obtida de *P. flagellifera* (FCS-3) mostrou uma estrutura complexa, com pelo menos 18 diferentes tipos de derivativos. As unidades A são principalmente piruviladas 2-sulfatadas (~34%) e metiladas em C-6 (~34%), sendo estas últimas parcialmente 2- e 2,4-sulfatadas. Menores quantidades de unidades β-D-galactopiranosídicas sulfatadas (em C-2, C-6 e C-2 e C-6), glicosiladas em C-6 e não substituídas estão também presentes. As unidades B são compostas predominantemente por seus derivativos ciclizados 3,6-anidrogactose e 2-O-metil-3,6-anidrogactose (~56%). As primeiras se encontram ligadas a unidades de β-D-galactose (6-metil), bem como a unidades de 4,6-O-carboxietilideno)-β-D-galactose 2-sulfato, em uma proporção de 3:1,8, respectivamente. Adicionalmente, ~18% das unidades de α-L-galactopiranosose são ligadas a unidades de β-D-galactose 2-sulfato piruvatadas. Significativas quantidades das unidades B (20%) são representadas por unidades de α-L-galactose 6-sulfato substituídas no C-3 por unidades glicosídicas ou por grupos sulfato, o que impede a ciclização destas unidades para o derivativo 3,6-anidrogactosídico. As unidades precursoras estão presentes em percentagens relativamente baixas. Estudos cinéticos de ciclização sugerem que em *P. flagellifera* as unidades precursoras estão ligadas a unidades de 6-O-metil-β-D-galactose e/ou β-D-galactose (6-substituídas por galactose, 2,3-di-O-metilgalactose e/ou xylose). A complexidade estrutural deste polissacarídeo é aumentada pela presença de unidades de α-L-galactose 2- e 3,6-sulfatadas, sendo as últimas adicionalmente 2-O-metiladas. Deste modo, a fração majoritária de *P. flagellifera* obtida da extração a frio contém uma galactana sulfatada com uma complexa estrutura química, sendo esta uma agarana sulfatada, metilada e piruvatada. A análise estrutural das frações de galactanas homogêneas obtidas das algas *L. aldingensis* (AHS-0,75) e *L. filiformis* (LHS-0,7) mostrou que estas são do tipo agaranas naturalmente 6-O-metiladas e, diferentemente de *P. flagellifera*, não apresentam acetal de ácido pirúvico. Estudos de ciclização mostraram que em ambas as galactanas, as unidades precursoras se encontram ligadas a unidades de G(6M)(6S)(6R). As agaranas obtidas de *L. aldingensis* são compostas principalmente pelas díades G(6M)→LA, G2S→LA G(6M)→L(6S). A presença de LA2S também foi observada para esta agarana, bem como uma pequena quantidade de LA2M. Unidades terminais de xilose e galactose glicosilando os C-3 e C-6 das unidades de α-L-galactose e β-D-galactose, respectivamente, também foram observadas para as galactanas de *L. aldingensis*. As agaranas presentes na fração LHS-0,7 (*L. filiformis*) apresentaram uma estrutura mais simples, sendo constituídas principalmente pelas díades de G(6M)→L(6S) e G2S→LA. Menores quantidades da díade G(6M)→L6S3X também foram observadas. A fração FCS-3 (*P. flagellifera*) apresentou atividade nula contra o HSV-1, mas se mostrou eficaz contra o HSV-2. As frações AHS-0,75 e LHS-0,7 apresentaram atividade contra HSV-1 e HSV-2, mas as respostas foram diferentes para cada uma destas frações, sendo LHS a mais efetiva contra ambos os tipos de HSV. A fucana Q2-0,6 obtida da alga parda *Lobophora variegata* foi a que apresentou as melhores atividades contra o HSV tipos 1 e 2.

ABSTRACT

Sequential extraction of the red seaweeds *Palisada flagellifera*, *Laurencia filiformis* and *Laurencia aldingensis* (*Laurencia* Complex, Rhodomelaceae, Ceramiales) with water at room temperature and then at 80° C, followed by KCl treatment and anion exchange chromatography led to the isolation of some homogeneous fractions from these species. Structural analysis of the homogeneous agarans obtained from *Palisada flagellifera* (FCS-3) showed a complex structure, with at least 18 different types of derivatives. The A units are mostly C-2 sulfated with pyruvic acid acetal (~34%) and methylated on C-6 (~34%), being the latter partially 2- and 2,4-sulfated. Minor amounts of β -D-galactopyranosyl units sulfated on C-2, C-6 and C-2 and C-6, glycosylated on C-6 and non-substituted are also present. The B units are composed predominantly by their cyclized derivatives 3,6-anhydrogalactose and 3,6-anhydro-2-O-methylgalactose (~56%). The former are linked to β -D-galactosyl (6-O-methyl) units, as well as to 4,6-(O-carboxyethylidene)- β -D-galactose 2-sulfate in the proportion of 3:1.8, respectively. Besides this, ~18% of the α -L-galactopyranosyl units are linked to pyruvylated β -D-galactose 2-sulfate residues. Significant amounts of the B units (20%) are represented by α -L-galactose 6-sulfate substituted on C-3 by glycosyl units or sulfate groups that preclude their cyclization to 3,6-anhydrogalactosyl derivative. The precursor units are present in relatively low percentages. Kinetic studies suggest that in *P. flagellifera* agarans the cyclizable units are linked to 6-O-methyl- β -D-galactosyl and/or β -D-galactosyl units (6-substituted by galactosyl, 2,3-di-O-methylgalactose and/or xylose). The structural complexity of this polysaccharide is increased by the presence of α -L-galactoses 2- and 3,6-sulfated being the latter additionally 2-di-O-methylated. Therefore the major subfraction, obtained from the cold extract contains structurally complex sulfated, methylated and pyruvylated agarans. Structural analysis of the homogeneous fractions obtained from *L. aldingensis* (AHS-0,75) and *L. filiformis* showed that these species produce agarans type polysaccharides naturally 6-O-methylated, and, differently from *P. flagellifera*, no pyruvic ketal was observed. Kinetic studies suggest that in *L. aldingensis* and *L. filiformis* agarans the cyclizable units are linked to 6-O-methyl- β -D-galactosyl and/or β -D-galactosyl units (6-substituted by galactosyl and/or xylose). The agarans from *L. aldingensis* are composed principally by G(6M) \rightarrow LA, G2S \rightarrow LA and G(6M) \rightarrow L(6S) diads. The presence of LA2S and LA2M was also observed to this agarans. Single stubs of xylosyl and galactosyl units are present in C-3 and C-6 of the α -L-galactose and β -D-galactose units, respectively. The agarans LHS-0,7 (*L. filiformis*) has a relatively simple structure, being constituted principally by G(6M) \rightarrow L(6S) and G2S \rightarrow LA diads. Minor amounts of the diad G(6M) \rightarrow L6S3X were also observed to this galactan. FCS-3 fraction (*Palisada flagellifera*) was able to inhibit the propagation of HSV-2, while no inhibitory activity was observed to HSV-1. AHS and LHS fractions showed activity against HSV-1 and HSV-2, but LHS fraction was more effective against both HSV types when compared to AHS. The fucoidan Q2-0,6 obtained from the brown seaweed *Lobophora variegata* showed the best activity against HSV types 1 and 2.

LISTA DE ESQUEMAS

ESQUEMA 1 - EXTRAÇÃO AQUOSA A 25 °C E 80 °C DAS ALGAS <i>P. flagellifera</i> , <i>L.filiformis</i> e <i>L. aldingensis</i>	83
ESQUEMA 2 – TRATAMENTO COM KCl 2,0M DAS FRAÇÕES FC, FH, AC, AH LC e LH.....	84

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - UNIDADES REPETITIVAS PRESENTES NAS GALACTANAS ...	31
FIGURA 2 - ESTRUTURA BÁSICA REPETITIVA DAS AGARANA	32
FIGURA 3 - ESTRUTURAS EXTREMAS ENCONTRADAS EM AGARANAS: AGAROSE (a); PRECURSOR DA AGAROSE (b)	33
FIGURA 4 - ESTRUTURA BÁSICA DAS PORFIRANAS	34
FIGURA 5 – GALACTOSE: PAR DE ENANTIÔMEROS “D” E “L”.	47
FIGURA 6 – ISÔMEROS: ENANTIÔMEROS E DIASTEREISÔMEROS	48
FIGURA 7 – AMINOPROPANOL (a) E METILBENZILAMINA (b).....	49
FIGURA 8 – MECANISMO DA REAÇÃO DE AMINAÇÃO REDUTIVA.	49
FIGURA 9 - FORMAÇÃO DAS UNIDADES DE 3,6-ANIDROGALACTOSE (a) E FORMAÇÃO DO GEL EM GALACTANAS SULFATADAS (b).....	51
FIGURA 10 - CONFORMAÇÕES ${}_{4}C^{1}$ (a) E ${}_{1}C^{4}$ (b) DE UNIDADES HEXOPIRANOSÍDICAS.....	52
FIGURA 11 - INTERAÇÃO DO GRUPO SULFATO EM C-2 DE β -D- GALACTOSE 2-SULFATO E A HIDROXILA EM C-3 DE α -D-GALACTOSE 2,6- SULFATO EM λ -CARRAGENANA.....	54
FIGURA 12 - INTERAÇÃO ENTRE O SULFATO EM C-4 DE β -D-GALACTOSE 4-SULFATO COM O SULFATO EM C-2 (a) OU C-6 (b) DE α -D-GALACTOSE EM ν -CARRAGENANAS E COM O SULFATO EM C-6 DE α -D-GALACTOSE EM μ -CARRAGENANAS (c).....	55
FIGURA 13 - TESTE DE SELIWANOFF	56
FIGURA 14 - ETAPA INICIAL DA INFECÇÃO DA CÉLULA PELO VÍRUS HSV	58
FIGURA 15 - FOTOGRAFIAS DAS ESPÉCIES ESTUDADAS: <i>P. flagellifera</i> (a), <i>Laurencia aldingensis</i> (b) e <i>Laurencia filiformis</i> (c).....	63
FIGURA 16 - ESPECTRO DE RMN DE ${}^{13}C$ DA FRAÇÃO PRECIPITADA EM KCl 2,0M FCP (<i>P. flagellifera</i>).....	90
FIGURA 17 - ESPECTRO DE RMN DE ${}^{13}C$ DA FRAÇÃO SOLÚVEL EM KCl 2,0M FCS (<i>P. flagellifera</i>)	91
FIGURA 18 - ANÁLISE DA MASSA MOLECULAR POR HPSEC DAS FRAÇÕES SOLÚVEIS EM KCl 2,0M FCS (a) e FHS (b) de <i>P. flagellifera</i>	93

FIGURA 19 – ANÁLISE DA MASSA MOLECULAR POR HPSEC DAS FRAÇÕES FCS-3 E FHS-3 de <i>P. flagellifera</i>	96
FIGURA 20 - ESPECTROS DE RMN DE ^{13}C DAS AGARANAS FCS-3 E FHS-3 OBTIDAS DE <i>P. flagellifera</i>	102
FIGURA 21 - PERFIL DE FRAGMENTAÇÃO DO DERIVADO 2,6-GAL	113
FIGURA 22 - PERFIL DE FRAGMENTAÇÃO DO DERIVADO 2-GAL	114
FIGURA 23 - ACOMPANHAMENTO DA CICLIZAÇÃO DAS UNIDADES PRECURSORAS DE 3,6-AG EM FUNÇÃO DO TEMPO NA AGARANA FCS-3	116
FIGURA 24 - DETERMINAÇÃO DA CONSTANTE DE VELOCIDADE DA REAÇÃO DE CICLIZAÇÃO DA FRAÇÃO FCS-3 A 80 °C.....	117
FIGURA 25 – ESPECTRO DE RMN DE ^1H DA FRAÇÃO FCS-3 NATIVA (a), DESSULFATADA (FCS-3D) (b) E ÁLCALI-TRATADA (FCS-3T) (c) OBTIDA DE <i>P. flagellifera</i>	121
FIGURA 26 – ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DA AGARANA NATIVA FCS-3 OBTIDA DE <i>P. flagellifera</i>	123
FIGURA 27 – ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DA AGARANA DESSULFATA FCS-3D OBTIDA DE <i>P. flagellifera</i>	124
FIGURA 28 – REGIÃO ANOMÉRICA DO ESPECTRO DE HSQC DA AGARANA NATIVA FCS-3 E DESSULFATADA FCS-3D OBTIDA DE <i>P. flagellifera</i>	125
FIGURA 29 – REGIÕES DOS ESPECTROS DE HSQC (a) E HMBC (b) DA AGARANA DESSULFATADA FCS-3D	128
FIGURA 30 – ESPECTRO DE RMN DE DEPT DA AGARANA NATIVA FCS-3 OBTIDA DE <i>P. flagellifera</i>	131
FIGURA 31 – ESPECTRO DE RMN DE DEPT DA AGARANA DESSULFATADA FCS-3D (<i>P. flagellifera</i>).....	132
FIGURA 32 – FIGURA 32 – ANÁLISE DE RMN DE ^{13}C DA AGARANA NATIVA FCS-3 E APÓS TRATAMENTO ALCALINO FCS-3T OBTIDA DE <i>P. flagellifera</i>	135
FIGURA 33 – ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DA FRAÇÃO PRECIPITADA COM KCL 2,0M ACP DE <i>L. aldingensis</i>	141
FIGURA 34 - ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DA FRAÇÃO PRECIPITADA COM	

KCL 2,0M LHP de <i>L. filiformis</i>	142
FIGURA 35 – ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DA FRAÇÃO SOLÚVEL EM KCL 2,0M AHS OBTIDA DE <i>L. aldingensis</i>	144
FIGURA 36 – ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DA FRAÇÃO SOLÚVEL EM KCL 2,0M LHS OBTIDA DE <i>L. filiformis</i>	145
FIGURA 37 – ANÁLISE DA MASSA MOLECULAR POR HPSEC-IR DAS FRAÇÕES SOLÚVEIS EM KCl 2,0M OBTIDAS DE <i>L. aldingensis</i> (ACS e AHS) E <i>L. filiformis</i> (LCS e LHS).....	147
FIGURA 38 – ANÁLISE DE HPSEC-MALLS DAS SUBFRAÇÕES AHS-0,75 E AHS-1,0 OBTIDAS DE <i>L. aldingensis</i>	151
FIGURA 39 – ANÁLISE DE HPSEC-IR DA FRAÇÃO LHS-0,75 OBTIDA DE <i>L. filiformis</i>	154
FIGURA 40 – ANÁLISE DE HPSEC-IR DAS SUBFRAÇÕES LHS2-0,5, LHS-0,6 E LHS-0,7.....	156
FIGURA 41 - REGIÕES ANOMÉRICAS DOS ESPECTROS DE RMN DE ^{13}C DAS AGARANAS HOMOGÊNEAS NATIVAS E DESSULFATADAS OBTIDAS A PARTIR DE <i>L. aldingensis</i> E <i>L. filiformis</i>	160
FIGURA 42 – ESPECTROS DE RMN DE ^1H (REGIÃO α -ANOMÉRICA) DE PORFIRANA E LAMBDA-CARRAGENANA EM FUNÇÃO DO TEMPO DA REAÇÃO DE CICLIZAÇÃO POR TRATAMENTO ALCALINO	169
FIGURA 43 – ESPECTROS DE RMN DE ^1H (REGIÃO α -ANOMÉRICA) DE AHS-0,75 (<i>L. aldingensis</i>) E LHS-0,7 (<i>L. filiformis</i>) EM FUNÇÃO DO TEMPO DA REAÇÃO DE CICLIZAÇÃO POR TRATAMENTO ALCALINO.....	170
FIGURA 44 – REGIÃO α -ANOMÉRICA DOS ESPECTROS DE RMN DE ^1H DAS AGARANAS AHS-0,75 (<i>L. aldingensis</i>), LHS-0,7 (<i>L. filiformis</i>) (a) E SEUS CORRESPONDENTES PRODUTOS DESSULFATADOS (b) E ÁLCALI-TRATADOS (c).....	173
FIGURA 45 – ESPECTROS DE RMN DE ^{13}C DAS AGARANAS AHS-0,75 DE <i>L. aldingensis</i> (a) E AHS-0,75D DE <i>L. aldingensis</i> (b).....	176
FIGURA 46 – ESPECTROS DE RMN DE ^{13}C DAS AGARANAS AHS-0,75 (a) E AHS-0,75T (b) DE <i>L. aldingensis</i>	177
FIGURA 47 – REGIÃO DO ESPECTRO DE RMN DE DEPT DA AGARANA AHS-0,75 E AHS-0,75D DE <i>L. aldingensis</i>	178

FIGURA 48 – REGIÃO ANOMÉRICA DOS ESPECTROS DE HSQC DA AGARANA NATIVA AHS-0,75 (a) E DESSULFATADA AHS-0,7D (b) DE <i>L. aldingensis</i>	180
FIGURA 49 – ASSINALAMENTOS NA REGIÃO ANOMÉRICA NOS ESPECTROS DE RMN DA AGARANA NATIVA LHS-0,7 E DESSULFATADA LHS-0,7D.....	182
FIGURA 50 - ESPECTRO DE RMN DE ¹³ C DAS AGARANAS LHS2-0,7 (a) E LHS2-0,7D (b) DE <i>L. filiformi</i>	183
FIGURA 51- ESPECTROS DE RMN DE ¹³ C DAS FRAÇÕES LHS-0,7 (a) E LHS-0,7T (b) DE <i>L. filiformis</i>	185
FIGURA 52 – ESPECTROS DE RMN DE DEPT DA AGARANA NATIVA LHS-0,7 (a) E DESSULFATADA LHS-0,7D (b) DE <i>L. filiformis</i>	187
FIGURA 53 – MAPA DE ASSINALAMENTO DA REGIÃO ANOMÉRICA DO ESPECTRO DE HSQC DE LHS-0,7 E LHS-0,7D.....	188
FIGURA 54 – MAPA DE ASSINALAMENTO DA REGIÃO DO ANEL DO ESPECTRO DE HSQC DE LHS-0,7D.....	189
FIGURA 55 – PRINCIPAIS DÍADES PRESENTES NA AGARANA FCS-3.....	190
FIGURA 56 – MECANISMO DE AÇÃO ANTIVIRAL DA GALACTANA SULFATADA DE <i>P. flagellifera</i> MEDIANTE O HSV-2.....	195

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – RENDIMENTO DAS FRAÇÕES OBTIDAS APÓS EXTRAÇÕES AQUOSAS A 25 °C E 80 °C	84
TABELA 2 – RENDIMENTO DAS FRAÇÕES PRECIPITADAS E SOLÚVEIS APÓS TRATAMENTO COM KCl 2,0M	85
TABELA 3 - COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES PRECIPITADAS (FCP; FHP) E SOLÚVEIS (FCS; FHS) EM KCl 2,0M OBTIDOS DE <i>P. flagellifera</i>	87
TABELA 4 – RENDIMENTOS DAS SUBFRAÇÕES OBTIDAS A PARTIR DAS FRAÇÕES SOLÚVEIS EM KCl 2,0M (FCS E FHS DE <i>P. flagellifera</i>) POR CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA.	94
TABELA 5 – RENOMEAÇÃO DAS FRAÇÕES MAJORITÁRIAS OBTIDAS A PARTIR DE FCS E FHS (<i>P. flagellifera</i>) POR CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA.....	95
TABELA 6 – ANÁLISE DE COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DE FCS, FHS E DAS SUBFRAÇÕES OBTIDAS POR CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA	98
TABELA 7 – ANÁLISES QUÍMICAS DE FCS, FHS E DAS SUBFRAÇÕES OBTIDAS POR CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA	100
TABELA 8 – ANÁLISE DE METILAÇÃO DAS AGARANAS FCS-3 E FHS-3 de <i>P. flagellifera</i>	105
TABELA 9 - ANÁLISE DE COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DA AGARANA NATIVA FCS-3 E DESSULFATADA FCS-3D DE <i>P. flagellifera</i>	107
TABELA 10 – ANÁLISE DE TRIDEUTEROMETILAÇÃO DA AGARANA NATIVA (FCS-3) E DESSULFATADA (FCS-3D) DE <i>P. flagellifera</i>	111
TABELA 11 – TEMPO DE MEIA-VIDA DA REAÇÃO DE CICLIZAÇÃO DE DIFERENTES GALACTANAS A 80° ..	117
TABELA 12 – ANÁLISE DE COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DA AGARANA NATIVA (FCS-3) E APÓS TRATAMENTO ALCALINO (FCS-3T) OBTIDA DE <i>P. flagellifera</i>	118

TABELA 13 – DESLOCAMENTOS QUÍMICOS (ppm) NA REGIÃO ANOMÉRICA DOS ESPECTROS DE RMN DA AGARANA NATIVA FCS-3 E DESSULFATADA FCS-3D OBTIDA DE <i>P. flagellifera</i>	129
TABELA 14 - ANÁLISE DE COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES PRECIPITADAS E SOLÚVEIS EM KCl 2,0 M.....	137
TABELA 15 – RENDIMENTO, ANÁLISES E ROTAÇÃO ESPECÍFICA DAS FRAÇÕES OBTIDAS DE <i>L. aldingensis</i> E <i>L. filiformis</i> POR EXTRAÇÃO AQUOSA (25 °C E 80 °C) E APÓS TRATAMENTO COM KCl 2,0M	138
TABELA 16 – RENDIMENTO, ANÁLISES QUÍMICAS E ROTAÇÃO ESPECÍFICA DAS SUBFRAÇÕES OBTIDAS A PARTIR DE AHS (<i>L. aldingensis</i>) POR CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA.....	149
TABELA 17 – COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS SUBFRAÇÕES OBTIDAS A PARTIR DE AHS POR CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA.	150
TABELA 18 – RENDIMENTO, ANÁLISES QUÍMICAS E ROTAÇÃO ESPECÍFICA DAS SUBFRAÇÕES OBTIDAS A PARTIR DE LHS POR CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA.....	152
TABELA 19 – COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS SUBFRAÇÕES OBTIDAS A PARTIR DE LHS POR CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA.....	153
TABELA 20 – RENDIMENTO E ANÁLISES QUÍMICAS DAS SUBFRAÇÕES OBTIDAS A PARTIR DO REFRACIONAMENTO DE LHS-0,75 (<i>L. filiformis</i>) POR CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA.....	155
TABELA 21 – COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS SUBFRAÇÕES OBTIDAS A PARTIR DO REFRACIONAMENTO DE LHS-0,75 POR CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA.	155
TABELA 22 – COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES HOMOGÊNEAS NATIVAS E DESSULFATADAS OBTIDAS DAS ALGAS <i>L. aldingensis</i> E <i>L. filiformis</i>	158
TABELA 23– ANÁLISE DE TRIDEUTEROMETILAÇÃO DA FRAÇÃO AHS-0,75 (<i>L. aldingensis</i>).....	164
TABELA 24 - ANÁLISE DE TRIDEUTEROMETILAÇÃO DA AGARANA NATIVA LHS-0,7 E DESSULFATADA LHS-0,7D DE <i>L. filiformis</i>	166

TABELA 25 – PERCENTAGEM DE 3,6-ANIDROGALACTOSE EM PORFIRANA, LAMBDA-CARRAGENANA, AHS (<i>L. aldingensis</i>) E LHS (<i>L. filiformis</i>) DETERMINADA POR RMN DE ¹ H EM FUNÇÃO DO TEMPO DA REAÇÃO DE CICLIZAÇÃO POR TRATAMENTO ALCALINO	171
TABELA 26 – ANÁLISE DE COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS AGARANAS AHS-0,75 E LHS-0,7 E SEUS RESPECTIVOS PRODUTOS OBTIDOS APÓS TRATAMENTO ALCALINO.....	172
TABELA 27 – DESLOCAMENTOS QUÍMICOS (ppm) DOS ESPECTROS DE RMN DA AGARANA PRESENTE NA FRAÇÃO AHS-0,75 E SUA DERIVADA DESSULFATADA AHS-0,75D.....	179
TABELA 28 - PRINCIPAIS MONOSSACARÍDEOS CONSTITUINTES DAS AGARANAS OBTIDAS DO COMPLEXO <i>Laurencia</i>	191
TABELA 29 - CITOTOXICIDADE E ATIVIDADE ANTIVIRAL DA GALACTANA SULFATADA OBTIDA DA ALGA <i>Palisada flagellifera</i>	194
TABELA 30 – CONCENTRAÇÃO EFETIVA PARA REDUZIR O TÍTULO VIRAL EM 50% (CE ₅₀) E ÍNDICE DE SELETIVIDADE (IS) DA GALACTANA SULFATADA OBTIDA DE <i>Palisada flagellifera</i>	195
TABELA 31 - CITOTOXICIDADE E ATIVIDADE ANTIVIRAL DAS GALACTANAS SULFATADAS OBTIDAS DAS ALGAS VERMELHAS <i>L. aldingensis</i> (AHS) e <i>L. filiformis</i> (LHS) E DA ALGA PARDA <i>L. variegata</i> (Q2-0,6).....	196
TABELA 32 – CONCENTRAÇÃO EFETIVA PARA REDUZIR O TÍTULO VIRAL EM 50% (CE ₅₀) E ÍNDICE DE SELETIVIDADE (IS) DAS GALACTANAS SULFATADAS OBTIDAS DAS ALGAS VERMELHAS <i>L. aldingensis</i> (AHS) e <i>L. filiformis</i> (LHS) E DA ALGA PARDA <i>L. variegata</i> (Q2-0,6).....	196

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AC:** fração obtida da alga *L. aldidensis* por extração aquosa a frio;
- ACS:** fração obtida da alga *L. aldidensis* por extração aquosa a frio e solúvel em KCl-2,0M;
- AH:** fração obtida da alga *L. aldidensis* por extração aquosa a 80 °C;
- AHS:** fração obtida da alga *L. aldidensis* por extração aquosa a 80 °C e solúvel em KCl-2,0M;
- AHS-0,75:** fração homogênea obtida a partir de AHS por cromatografia em DEAE-Sephacel (eluída com 0,75M de NaCl);
- AHS-0,75D:** fração obtida após a dessulfatação da fração AHS-0,75;
- AHS-0,75T:** fração obtida após o tratamento alcalino da fração AHS-0,75;
- AHS-1,0:** fração homogênea obtida a partir de AHS por cromatografia em DEAE-Sephacel (eluída com 1,0M de NaCl);
- AHS-1,0D:** fração obtida após a dessulfatação da fração AHS-1,0;
- AIDS:** Síndrome da Imunodeficiência Humana Adquirida (SIDA);
- AP:** aminopropanol;
- CC₅₀:** concentração citotóxica para 50% das células;
- CE₅₀:** concentração efetiva para alcançar 50% de proteção contra os efeitos do HSV;
- CLAE:** Cromatografia Líquida de Alta Eficiência;
- CLG:** Cromatografia Líquida Gasosa;
- CG-EM:** Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massa;
- D₂O:** óxido de deutério;
- DMSO:** dimetil sulfóxido;
- FC:** fração polissacarídica obtida da alga *P. flagellifera* por extração aquosa a 25 °C;
- FCS:** fração polissacarídica obtida da alga *P. flagellifera* por extração aquosa a 25 °C e solúvel em KCl 2,0M;
- FCS-H₂O:** fração obtida após cromatografia de FCS em DEAE-Sephacel; eluída com H₂O;
- FCS-0,1:** fração obtida após cromatografia de FCS em DEAE-Sephacel; eluída com NaCl 0,1M;
- FCS-0,2:** fração obtida após cromatografia de FCS em DEAE-Sephacel; eluída com NaCl 0,2M;

- FCS-0,3:** fração obtida após cromatografia de FCS em DEAE-Sephacel; eluída com NaCl 0,3M;
- FCS-0,4:** fração obtida após cromatografia de FCS em DEAE-Sephacel; eluída com NaCl 0,4M;
- FCS-0,5:** fração obtida após cromatografia de FCS em DEAE-Sephacel; eluída com NaCl 0,5M;
- FCS-0,6:** fração obtida após cromatografia de FCS em DEAE-Sephacel; eluída com NaCl 0,6M;
- FCS-0,7:** fração obtida após cromatografia de FCS em DEAE-Sephacel; eluída com NaCl 0,7M;
- FCS-0,8:** fração obtida após cromatografia de FCS em DEAE-Sephacel; eluída com NaCl 0,8M;
- FCS-0,9:** fração obtida após cromatografia de FCS em DEAE-Sephacel; eluída com NaCl 0,9M;
- FCS-1,0:** fração obtida após cromatografia de FCS em DEAE-Sephacel; eluída com NaCl 1,0M;
- FCS-1,25:** fração obtida após cromatografia de FCS em DEAE-Sephacel; eluída com NaCl 1,25M;
- FCS-1,5:** fração obtida após cromatografia de FCS em DEAE-Sephacel; eluída com NaCl 1,5M;
- FCS-1,75:** fração obtida após cromatografia de FCS em DEAE-Sephacel; eluída com NaCl 1,75M;
- FCS-2,0:** fração obtida após cromatografia de FCS em DEAE-Sephacel; eluída com NaCl 2,0M;
- FCS-1:** novo nome da fração FCS-0,3;
- FCS-2:** novo nome da fração FCS-0,4;
- FCS-3:** novo nome da fração FCS-0,5;
- FCS-4:** novo nome da fração FCS-0,6;
- FH:** fração polissacarídica obtida da alga *P. flagellifera* por extração aquosa a 80 °C;
- FHS:** fração polissacarídica obtida da alga *P. flagellifera* por extração aquosa a 80 °C e solúvel em KCl 2,0M;
- FHS-H₂O:** fração obtida após cromatografia de FHS em DEAE-Sephacel; eluída com H₂O;

FHS-0,1: fração obtida após cromatografia de FHS em DEAE-Sephacel; eluída com NaCl 0,1M;

FHS-0,2: fração obtida após cromatografia de FHS em DEAE-Sephacel; eluída com NaCl 0,2M;

FHS-0,3: fração obtida após cromatografia de FHS em DEAE-Sephacel; eluída com NaCl 0,3M;

FHS-0,4: fração obtida após cromatografia de FHS em DEAE-Sephacel; eluída com NaCl 0,4M;

FHS-0,5: fração obtida após cromatografia de FHS em DEAE-Sephacel; eluída com NaCl 0,5M;

FHS-0,6: fração obtida após cromatografia de FHS em DEAE-Sephacel; eluída com NaCl 0,6M;

FHS-0,7: fração obtida após cromatografia de FHS em DEAE-Sephacel; eluída com NaCl 0,7M;

FHS-0,8: fração obtida após cromatografia de FHS em DEAE-Sephacel; eluída com NaCl 0,8M;

FHS-0,9: fração obtida após cromatografia de FHS em DEAE-Sephacel; eluída com NaCl 0,9M;

FHS-1,0: fração obtida após cromatografia de FHS em DEAE-Sephacel; eluída com NaCl 1,0M;

FHS-1,25: fração obtida após cromatografia de FHS em DEAE-Sephacel; eluída com NaCl 1,25M;

FHS-1,5: fração obtida após cromatografia de FHS em DEAE-Sephacel; eluída com NaCl 1,5M;

FHS-1,75: fração obtida após cromatografia de FHS em DEAE-Sephacel; eluída com NaCl 1,75M;

FHS-2,0: fração obtida após cromatografia de FHS em DEAE-Sephacel; eluída com NaCl 2,0M;

FHS-1: novo nome da fração FHS-0,4;

FHS-2: novo nome da fração FHS-0,5;

FHS-3: novo nome da fração FHS-0,6;

FHS-4: novo nome da fração FHS-0,7;

FHS-5: novo nome da fração FHS-0,8;

G: na nomenclatura de Knutsen *et al.* (1994) corresponde a unidades de β -D-galactose;

Gal: Galactose;

Glc: Glucose;

HIV: *Human Immunodeficiency virus*;

HMBC: *Heteronuclear Multiple Bond Correlation Spectroscopy*;

HSQC: *Heteronuclear Single Quantum Correlation Spectroscopy*;

HSV: *Herpes simplex virus*;

HPSEC: Cromatografia de Exclusão Estérica de Alta Pressão acoplada a Detector de Índice de Refração;

IS: Índice de seletividade;

J: constante de acoplamento;

kDa: Kilodaltons;

L: na nomenclatura de Knutsen *et al.* (1994) corresponde a unidades de α -L-galactose;

LA: na nomenclatura de Knutsen *et al.* (1994) corresponde a unidades de 3,6-anidro- α -L-galactose;

LC: fração obtida da alga *L. filiformis* por extração aquosa a frio;

LH: fração obtida da alga *L. filiformis* por extração aquosa a 80 °C;

LCS: fração obtida da alga *L. filiformis* por extração aquosa a frio e solúvel em KCl-2,0M;

LHS: fração obtida da alga *L. filiformis* por extração aquosa a 80°C e solúvel em KCl 2,0M;

LHS-0,6: fração homogênea obtida a partir de LHS por cromatografia em DEAE-Sephacel (eluída com 0,6M de NaCl);

LHS-0,6D: fração obtida após a dessulfatação da fração LHS-0,6;

LHS-0,7: fração homogênea obtida a partir de LHS por cromatografia em DEAE-Sephacel (eluída com 0,7M de NaCl);

LHS-0,7D: fração obtida após a dessulfatação da fração LHS-0,7;

LHS-0,7T: fração obtida após o tratamento alcalino da fração LHS-0,7;

Man: manose

MBA: metilbenzilamina

Mw: Massa molecular média

nd: não determinado

ppm: partes por milhão;

RID: Detector de Índice de Refração;

RMN: Ressonância Magnética Nuclear;

RMN-¹³C: Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13;

RMN-¹H: Ressonância Magnética Nuclear de Próton;

TCDI:

TFA: ácido trifluoracético;

tr: traços;

Xyl: Xilose

3,6-AG: 3,6-anidrogactose

[α]_D²⁵: rotação óptica produzida pelo polissacarídeo ao passar pela linha D de uma lâmpada de sódio ($\lambda = 589,6$ nm) a 25 °C;

- : não detectado.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	25
1.1 OBJETIVO GERAL	27
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
2 REVISÃO DE LITERATURA	28
2.1 ALGAS VERMELHAS: ASPECTOS GERAIS	28
2.2 GALACTANAS DE ALGAS VERMELHAS: ESTRUTURA GERAL	30
2.3 GALACTANAS DO TIPO AGARANAS.....	32
2.4 GALACTANAS DA ORDEM CERAMIALES.....	37
2.4.1 Galactanas do Complexo <i>Laurencia</i>	43
2.5 DETERMINAÇÃO DA CONFIGURAÇÃO ENANTIOMÉRICA.....	46
2.6 GALACTANAS SULFATADAS: IMPORTÂNCIA ECONÔMICA	49
2.6.1 Tratamento alcalino.....	51
2.6.2 Quantificação das unidades de 3,6-anidrogalactopiranoose por método colorimétrico.....	56
2.7 GALACTANAS SULFATADAS: IMPORTÂNCIA BIOLÓGICA	57
3 MATERIAIS E MÉTODOS	62
3.1 COLETA E PROCESSAMENTO	62
3.2 POSICIONAMENTO SISTEMÁTICO DAS ESPÉCIES ESTUDADAS	62
3.3 REGISTRO DAS ESPÉCIES ESTUDADAS.....	64
3.4 EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS.....	64
3.5 MÉTODOS ANALÍTICOS GERAIS	64
3.5.1 Determinação do teor de açúcar total	64
3.5.2 Determinação do teor de proteínas	65
3.5.3 Determinação do teor de sulfato	65
3.5.4 Determinação da rotação específica	65

3.5.5 Reagentes	66
3.6 TRATAMENTO COM KCL 2,0M	66
3.7 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS	66
3.7.1 Cromatografia de troca iônica em DEAE-Sephacel.....	66
3.7.2 Análise da massa molecular HPSEC	66
3.7.3 Cromatografia Gasosa acoplada à Espectroscopia de Massa (CG-EM).....	68
3.8 HIDRÓLISE REDUTIVA TOTAL	69
3.9 METILAÇÃO.....	70
3.10 DESSULFATAÇÃO POR TRATAMENTO SOLVOLÍTICO	70
3.10.1 Preparo do sal de piridônio.....	70
3.10.2 Solvólise	71
3.11 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE ÁCIDO PIRÚVICO.....	71
3.12 DETERMINAÇÃO DA ENANTIOMERICIDADE	72
3.13 TRATAMENTO ALCALINO	74
3.13.1 Tratamento alcalino: método analítico.....	74
3.13.2 Determinação do teor de 3,6-anidrogactose pelo método do resorcinol.....	74
3.13.3 Reação de ciclização: Acompanhamento por RMN de ¹ H	75
3.13.4 Tratamento alcalino: método preparativo	75
3.13.5 Estudo cinético da reação de ciclização.....	76
3.14 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR	77
3.14.1 Técnicas de RMN monodimensionais:	77
3.14.2. Técnicas de RMN bidimensionais:	77
3.15 TESTES DE ATIVIDADE ANTIVIRAL	77
3.15.1 Frações de polissacarídeos testadas	78
3.15.2 Células e Vírus	78
3.15.3 Ensaio citotóxico	78

3.15.4 Ensaio de atividade antiviral.....	79
3.15.5 Cinética de inibição viral.....	80
3.15.6 Mecanismos de ação.....	80
3.15.6.1 Atividade virucida	80
3.15.6.2 Atividade sobre o receptor celular	81
3.15.6.3 Atividade na Penetração Viral	81
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	82
4.1. EXTRAÇÃO DAS GALACTANAS DAS ALGAS VERMELHAS <i>Palisada flagellifera</i> , <i>Laurencia filiformis</i> e <i>Laurencia aldingensis</i>	82
4.2 TRATAMENTO COM KCl 2,0M DAS FRAÇÕES OBTIDAS POR EXTRAÇÃO AQUOSA A 25 °C E 80 °C	82
4.3 ANÁLISE DOS POLISSACARÍDEOS OBTIDOS DA ALGA VERMELHA <i>P. flagellifera</i>	86
4.3.1 Análise de composição monossacarídica das frações precipitadas e solúveis em KCl 2,0M.....	86
4.3.2 Análise de RMN de ¹³ C das frações precipitadas em KCl 2,0M (FCP e FHP) DE <i>P. flagellifera</i>	88
Análise de RMN de ¹³ C das frações solúveis em KCl 2,0M de <i>P. flagellifera</i>	88
4.3.4 Análise da massa molecular por HPSEC das frações de <i>P. flagellifera</i> solúveis em KCl 2,0M (FCS e FHS)	92
4.3.5 Fracionamento de FCS e FHS (<i>P. flagellifera</i>) por cromatografia de troca iônica em DEAE-Sephacel	93
4.3.6 Análise da massa molecular por HPSEC das subfrações obtidas a partir de FCS e FHS (<i>P. flagellifera</i>) por cromatografia de troca iônica.....	95
4.3.7 Análise de composição monossacarídica das subfrações obtidas a partir de FCS e FHS (<i>P. flagellifera</i>) por cromatografia de troca iônica.....	96
4.3.8 Caracterização química das subfrações de FCS e FHS obtidas por cromatografia de troca iônica	99

4.3.9	Análise de RMN de ^{13}C das agaranas FCS-3 e FHS-3 obtidas de <i>P. flagellifera</i>	101
4.3.10	Análise de metilação das agaranas FCS-3 e FHS-3 de <i>P. flagellifera</i>	103
4.3.11	Dessulfatação solvolítica da fração FCS-3 de <i>P. flagellifera</i>	106
4.3.12	Análise de trideuterometilação e da configuração absoluta de alguns derivados metilados obtidos a partir das galactanas das frações FCS-3 e FCS-3D.	108
4.3.13	Tratamento alcalino da agarana nativa FCS-3 obtida de <i>P. flagellifera</i>	115
4.3.13.1	Estudo da cinética de ciclização da fração FCS-3	115
4.3.13.2	Tratamento alcalino da agarana FCS-3 em escala preparativa	117
4.3.14	Análises de RMN da fração FCS-3, FCS-3D e FCS-3T	119
4.4	POLISSACARÍDEOS DE <i>L. aldingensis</i> e <i>L. filiformis</i>	135
4.4.1	Análise de composição monossacarídica das frações precipitadas e solúveis em KCl 2,0M obtidas das algas <i>L. aldingensis</i> e <i>L. filiformis</i>	136
4.4.2	Caracterização química das frações brutas, precipitadas e solúveis em KCl 2,0M obtidas a partir das algas <i>L. aldingensis</i> e <i>L. filiformis</i> .	137
4.4.3	Análise de RMN de ^{13}C dos polissacarídeos precipitados em KCl 2,0M obtidos das algas <i>L. aldingensis</i> e <i>L. filiformis</i>	139
4.4.4	Análise de RMN de ^{13}C das frações solúveis em KCl obtidas de <i>L. aldingensis</i> e <i>L. filiformis</i>	143
4.4.5	Análise de homogeneidade das frações solúveis em KCl 2,0M obtidas de <i>L. aldingensis</i> e <i>L. filiformis</i>	146
4.4.6	Fracionamento de AHS (<i>L. aldingensis</i>) e LHS (<i>L. filiformis</i>) por cromatografia de troca iônica	148
4.4.7	Fracionamento dos polissacarídeos de <i>L. aldingensis</i> (AHS) por cromatografia de troca iônica em DEAE-SEPHACEL e análises	148
4.4.8	Análise de composição monossacarídica das frações obtidas a partir de AHS por cromatografia de troca iônica	149
4.4.9	Análise das massas moleculares de AHS-0,75 e AHS-1,0	150

4.4.10 Fracionamento dos polissacarídeos de <i>L. filiformis</i> (LHS) por cromatografia de troca iônica em DEAE-Sephacel e análises	151
4.4.11 Refracionamento de LHS-0,75 em DEAE-Sephacel	154
4.4.12 Análises químicas das subfrações obtidas a partir de LHS-0,75 por refracionamento em DEAE-Sephacel.....	154
4.4.13 Análise das massas moleculares das subfrações LHS2-0,5, LHS-0,6 e LHS-0,7	156
4.5 ANÁLISE DAS FRAÇÕES POLISSACARÍDICAS HOMOGENEAS OBTIDAS A PARTIR DE <i>L. aldingensis</i> E <i>L. filiformis</i>	157
4.5.1 Dessulfatação das frações homogêneas obtidas das algas <i>L. aldingensis</i> e <i>L. filiformis</i>	157
4.5.2 Análises de RMN das frações homogêneas obtidas das algas <i>L. aldingensis</i> e <i>L. filiformis</i> e de suas correspondentes frações dessulfatadas	159
4.5.3 Análise de metilação das frações AHS-0,75 (<i>L. aldingensis</i>) e LHS-0,7 (<i>L. filiformis</i>).....	161
4.5.3.1 Análise de trideuterometilação da fração AHS-0,75 (<i>L. aldingensis</i>)	161
4.5.3.2 Análise de trideuterometilação da fração LHS-0,7 (<i>L. filiformis</i>)	165
4.5.4 Tratamento alcalino	167
4.5.4.1 Tratamento alcalino das frações AHS-0,75 e LHS-0,7 em escala analítica.....	167
4.5.4.2 Tratamento alcalino das frações AHS-0,75 e LHS-0,7 em escala preparativa	171
4.6 Análises de RMN de AHS (<i>L. aldingensis</i>) e LHS-0,7 (<i>L. filiformis</i>).....	172
4.6.1 Análises de RMN de AHS (<i>L. aldingensis</i>).....	172
4.6.2 Análises de RMN de LHS-0,7 de <i>L. filiformis</i>)	181
4.7 ANÁLISE COMPARATIVA DAS AGARANAS PRODUZIDAS POR ALGAS DO COMPLEXO <i>Laurencia</i>	190
4.8 ATIVIDADE INIBITÓRIA PARA O HSV-1 E O HSV-2.....	192

5. CONCLUSÕES	200
6. REFERÊNCIAS.....	202
ANEXO	216
ANEXO 1 - PERCENTAGEM DE ÁCIDO PIRÚVICO NA AGARANA FCS-3	217

1. INTRODUÇÃO

As algas marinhas são fontes de carboidratos cuja estrutura química não é encontrada em outros organismos vegetais ou animais. Os polissacarídeos sulfatados isolados de macroalgas marinhas (ficocolóides) possuem características que os diferenciam de outros polissacarídeos, como por exemplo, a presença de unidades de 3,6-anidrogactose, monossacarídeo encontrado apenas nas galactanas sulfatadas isoladas de algas vermelhas (Rhodophyta) (PAINTER, 1983).

O nosso interesse no estudo dos diferentes polissacarídeos de algas está centralizado nos seguintes aspectos:

1) *Conhecimento da estrutura química dos polissacarídeos produzidos por macroalgas marinhas da biodiversidade nacional:*

Apesar do extenso litoral brasileiro e da grande biodiversidade algal, são relativamente poucas as espécies do Brasil que tiveram a estrutura química de seus polissacarídeos determinada.

2) *Busca de novos compostos bioativos:*

Doenças virais como a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) transmitida pelo HIV e lesões herpéticas causadas pelo HSV são consideradas um problema de saúde mundial. A potente e seletiva atividade antiherpética de alguns ficocolóides e a atividade antiviral em geral determinada nos testes *in vitro* e que é mantida nos testes *in vivo* (modelo animal) são fatores importantes para se considerar estes compostos como potenciais antivirais.

3) *Interesse taxonômico:*

Além das aplicações de interesse econômico e na área biológica, a determinação da estrutura química dos polissacarídeos obtidos de macroalgas pode também ser utilizada para a elucidação da posição taxonômica das algas, como ferramenta auxiliar dos critérios clássicos: morfologia, anatomia, e ciclo de vida (USOV, 1998). Ressalta-se, no entanto, que muitas espécies ainda devam ser investigadas para se ter um panorama mais ampliado do uso dos ficocolóides auxiliando os critérios taxonômicos clássicos.

A necessidade de se estudar os polissacarídeos obtidos de macroalgas marinhas se deve ao fato que, tanto as atividades biológicas como as propriedades físico-químicas desses biopolímeros são dependentes da estrutura química e,

particularmente, do grau de sulfatação da molécula, do posicionamento específico dos grupos sulfato, do tipo de unidades monossacarídicas, bem como da massa molecular destes polímeros (FREILE-PELEGRIN; MURANO, 2005).

O presente trabalho tem como objetivos gerais a determinação da estrutura química fina de polissacarídeos isolados de algas marinhas, bem como a avaliação de propriedades biológicas (atividade antiviral) apresentadas por estes polissacarídeos. Portanto, o estudo da estrutura química de polissacarídeos sulfatados isolados de macroalgas marinhas brasileiras é de fundamental importância, pois, através destes, novas aplicações e novas espécies produtoras de polissacarídeos com potencial interesse comercial e/ou aplicações biológicas poderão ser descobertas.

1.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho tem por objetivo geral o estudo da estrutura química de galactanas sulfatadas isoladas de algas vermelhas (Cerámiales, Rhodomelaceae, Rhodophyta), bem como o estudo da atividade antiviral destes polissacarídeos e de fucanas sulfatadas isoladas da alga parda *Lobophora variegata* (Dictyotales, Dictyotaceae, Phaeophyta).

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1 - Extração e purificação de polissacarídeos isolados de algas vermelhas do complexo *Laurencia*.
- 2 - Determinação da estrutura química fina dos polissacarídeos purificados por métodos químicos e espectroscópicos.
- 3 - Estudos de cinética de ciclização das galactanas sulfatadas.
- 4 - Avaliação da atividade antiviral das galactanas e fucanas sulfatadas contra os vírus *Herpes simplex* humanos (tipos 1 e 2).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ALGAS VERMELHAS: ASPECTOS GERAIS

A divisão mais antiga de macrófitas marinhas é representada filogeneticamente pelas algas vermelhas (Rhodophyta) (PAINTER, 1983; USOV, 1998).

Existem 4.000 a 6.000 espécies de algas vermelhas conhecidas, com aproximadamente 680 gêneros, dentre os quais poucos são unicelulares ou filamentosos microscópicos. A maioria dessas algas é estruturalmente mais complexa e corresponde às macroalgas marinhas bentônicas, sendo o número destas espécies de Rhodophyta muito maior do que a combinação de todos os outros tipos de algas bentônicas. Pouco mais de 100 espécies de algas vermelhas são de água doce (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2007).

As algas vermelhas são amplamente distribuídas no oceano, ocorrendo do nível da maré a consideráveis profundidades, flutuando livremente ou ancoradas a outras algas ou rochas (SCHAEFFER; KRYLOV, 2000).

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

Assim como as plantas superiores, as algas multicelulares, ou macroalgas, apresentam uma parede celular constituída por um sistema de duas fases: uma cristalina (esqueleto) embebida em uma fase mais amorfa (a matriz intercelular). Diferentemente das plantas terrestres, nas algas há uma abundância dos componentes de matriz em relação aos componentes do esqueleto, e há também uma prevalência dos polissacarídeos polianiônicos sobre os polissacarídeos neutros (KLOAREG; QUATRANO, 1988).

As algas marinhas biossintetizam polissacarídeos sulfatados, os quais não são encontrados em plantas terrestres ou mesmo nas algas de água doce. Isto sugere que os polissacarídeos de matriz têm funções específicas em relação ao ambiente marinho, sendo comumente postulado que eles estão especificamente envolvidos com a regulação mecânica, osmótica ou iônica (KLOAREG; QUATRANO,

1988). Ainda com função de osmorregulação, as algas biossintetizam carboidratos de baixo peso molecular, incluindo os polióis (KARSTEN; KIRST, 1989; KARSTEN; WEST; ZUCCARELLO, 1992).

Nas algas vermelhas a matriz mucilaginosa é composta principalmente por polímeros de galactose sulfatada, que conferem flexibilidade e textura à alga (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2007). Como polissacarídeo de reserva, estas algas apresentam um polímero denominado “amido das florídeas”, que é constituído por unidades de α -D-glucose com ligações do tipo (1 \rightarrow 4) e pontos de ramificação no C-6 similar à amilopectina (PAINTER, 1983); no entanto, devido ao alto teor de ramificações, esse polímero se parece mais com o glicogênio do que com a amilopectina do amido (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2007). Alguns fatores, como sazonalidade, habitat, profundidade de imersão (luminosidade) e fase de desenvolvimento celular, podem influenciar o conteúdo e as características estruturais desses polímeros (MILLER; FALSHAW, 1997).

As algas marinhas são as fontes mais importantes de polissacarídeos sulfatados que não sejam de origem animal e a estrutura química desses polímeros varia de acordo com a espécie da alga que os biossintetiza (COSTA *et al.*, 2010).

Muitas algas vermelhas apresentam considerável importância econômica, sendo utilizadas principalmente para a extração de polissacarídeos formadores de colóides (ficocolóides) e para a alimentação humana (HOEK; MANN; JAHNS, 1995).

As algas vermelhas são utilizadas como alimento especialmente por povos orientais. A alga vermelha *Porphyra* (nori), que é cultivada há séculos, é consumida por muitos habitantes do Pacífico Norte e, com a popularização do sushi, também por outros povos (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2007). As algas desse gênero são também utilizadas na tradicional medicina chinesa (ZHANG *et al.*, 2003).

Em geral, as algas marinhas não apresentam alto valor nutritivo, uma vez que faltam ao ser humano, e à maioria dos animais, as enzimas necessárias à hidrólise de grande parte do material da parede celular. No entanto, as algas marinhas fornecem sais essenciais, bem como inúmeras vitaminas e elementos em quantidade mínima importantes, sendo assim valiosos suplementos alimentares (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2007).

Uma das aplicações comerciais diretas mais úteis de qualquer alga é a obtenção das galactanas sulfatadas extraídas da parede celular de uma infinidade

de gêneros de algas vermelhas (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2007). Alguns desses polímeros apresentam propriedades geleificantes ou estabilizantes, sendo utilizados em grande escala pela indústria (USOV, 1998). Vários setores economicamente importantes como, por exemplo, as indústrias alimentícias, farmacêuticas e biotecnológicas fazem uso desses polissacarídeos (GANESAN *et al.*, 2011).

Muitas outras galactanas não apresentam as características físico-químicas necessárias à aplicação industrial, mas são muito promissoras como compostos biologicamente ativos (USOV, 1998), visto que diversas atividades biológicas têm sido descritas para esses polímeros, como por exemplo, atividade antiviral (DAMONTE *et al.*, 1996; CÁCERES *et al.*, 2000; DUARTE *et al.*, 2001, 2004; TALARICO *et al.*, 2004, 2005; TALARICO; DAMONTE, 2007; HARDEN *et al.*, 2009) anticoagulante (CARLUCCI *et al.*, 1997; FARIAS *et al.*, 2000), antitrombótica (SEN *et al.*, 2002), antiangiogênica (SATORU *et al.*, 2003) e antitumoral (FERNÁNDEZ *et al.*, 1989; ZHOU *et al.*, 2004).

2.2 GALACTANAS DE ALGAS VERMELHAS: ESTRUTURA GERAL

As galactanas sulfatadas encontradas na divisão Rhodophyta são formadas por unidades de galactopiranoose (ou derivados desse monossacarídeo) dispostas em uma cadeia linear alternando unidades designadas por A e B (AB_n) (Figura 1). As unidades A e B se apresentam na forma 3- e 4-ligada, respectivamente, podendo apresentar substituições por grupos O-metil, éster sulfato e/ou glicosilações. Adicionalmente, as unidades A podem estar substituídas por acetal de ácido pirúvico nos C-4 e C-6. As unidades B, por sua vez, podem estar total ou parcialmente ciclizadas na forma de 3,6-anidrogactopiranoose (USOV; ELASHVILI, 1991; CASES; STORTZ; CEREZO, 1992; CASES; STORTZ; CEREZO, 1994; USOV; BILAN; SHASHKOV, 1997; MILLER; BLUNT, 2002; KOLENDER; MATULEWICZ, 2002; DUARTE *et al.*, 2001; DUARTE *et al.*, 2004; NAVARRO; STORTZ, 2008; PRADO; CIANCIA; MATULEWICZ, 2008; NAVARRO *et al.*, 2011).

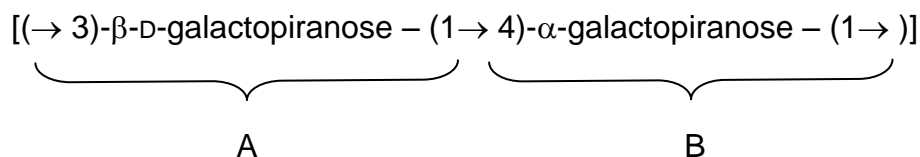


FIGURA 1 - UNIDADES REPETITIVAS PRESENTES NAS GALACTANAS

Diferentemente das unidades B, as unidades A das galactanas são compostas sempre por β -galactopirano se 3-ligada com a configuração enantiomérica da série D.

A classificação mais simplista das galactanas é feita de acordo com a estereoquímica da unidade B, que as classifica em dois grandes grupos: as carragenanas, com enantiomericidade D para as unidades de α -galactopirano se 4-ligadas; e as agaranas, com enantiomericidade L para estas mesmas unidades. As algas produtoras desses polímeros são conhecidas como carragenófitas e agarófitas, respectivamente (STORTZ; CERESO, 2000).

Algumas ordens da divisão Rhodophyta, por exemplo, a ordem Halymeniales, biossintetizam galactanas com uma estrutura intermediária entre agarana e carragenana, ou seja, em uma mesma molécula estão presentes estruturas típicas de carragenanas e de agaranas (KNUTSEN *et al.*, 1994, ZIBETTI *et al.*, 2005; ZIBETTI *et al.*, 2009). Este tipo estrutural foi denominado de carrágar por Chopin, Kerin e Mazerolle (1999) e, posteriormente, Stortz e Cerezo (2000) adotaram o termo galactana do tipo “D/L-híbrida”, para diferenciar do termo híbrido adotado para as carragenanas.

Devido à grande diversidade estrutural das galactanas sulfatadas obtidas de algas vermelhas, Knutsen *et al.* (1994), com o intuito de facilitar e padronizar a escrita das unidades dissacarídicas repetitivas das galactanas (díades), propuseram uma nomenclatura simbólica, na qual as unidades A (β -D-galactopirano se) são representadas pela letra G, enquanto as unidades B quando pertencentes ao grupo das carragenanas são representadas pelas letras D (α -D-galactopirano se) e DA (3,6-anidro- α -D-galactopirano se), e as unidades B pertencentes ao grupo das agaranas são representadas pelas letras L (α -L-galactopirano se) e LA (3,6-anidro- α -L-galactopirano se). As substituições por grupos metil, sulfato e unidades de xilose recebem o número correspondente ao carbono substituído seguido da letra

correspondente ao tipo de substituição: M, S e X, respectivamente. As unidades A substituídas por acetal de ácido pirúvico são representadas simbolicamente por GP.

No presente trabalho, em algumas ocasiões, a nomenclatura de Knutsen *et al.* (1994) foi utilizada para designar as unidades dissacarídicas encontradas nas galactanas estudadas.

2.3 GALACTANAS DO TIPO AGARANAS

As agaranas são polissacarídeos que apresentam a cadeia principal formada por unidades de (1→3)-β-D-galactopirranose e (1→4)-α-L-galactopirranose (Figura 2), diferindo das carragenanas na configuração estereoquímica da unidade B.

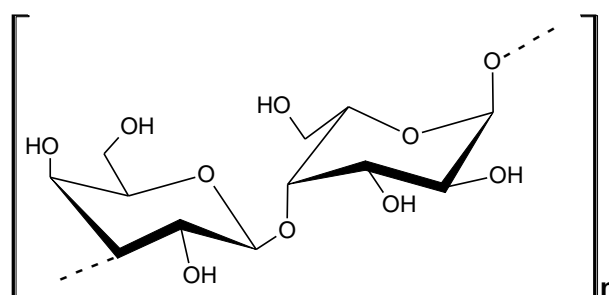


FIGURA 2. ESTRUTURA BÁSICA REPETITIVA DAS AGARANAS

Nas agaranas, a variação desta estrutura básica ocorre devido à presença de diferentes substituintes tanto nas unidades A quanto nas B, que podem se apresentar sulfatadas, metiladas e/ou glicosiladas, enquanto as unidades A podem, ainda, apresentar acetal de ácido pirúvico em C-4 e C-6, e as unidades B podem estar ciclizadas na forma de 3,6-anidro-α-L-galactopirranose (USOV, 1998; STORTZ; CERESO, 2000; TAKANO *et al.*, 2003).

Embora as agaranas apresentem uma grande variedade de grupos substituintes, duas estruturas extremas são consideradas os exemplos mais simples para esse tipo de galactana (Figuras 3a, 3b).

Uma dessas estruturas é a agarose (Figura 3a), a qual é constituída por unidades dissacarídicas repetitivas de β -D-galactopiranosse 3-ligadas (unidades A) e 3,6-anidro- α -L-galactopiranosse 4-ligadas (unidades B) (STORTZ; CERREZO, 2000).

O outro extremo de simplicidade estrutural para agaranas é denominado precursor da agarose, que apresenta as unidades B substituídas na forma de α -L-galactopiranosse-6-sulfato, que são as precursoras das unidades de 3,6-anidro- α -L-galactopiranosse *in vivo* (REES, 1961a, 1961b) (Figura 3b).

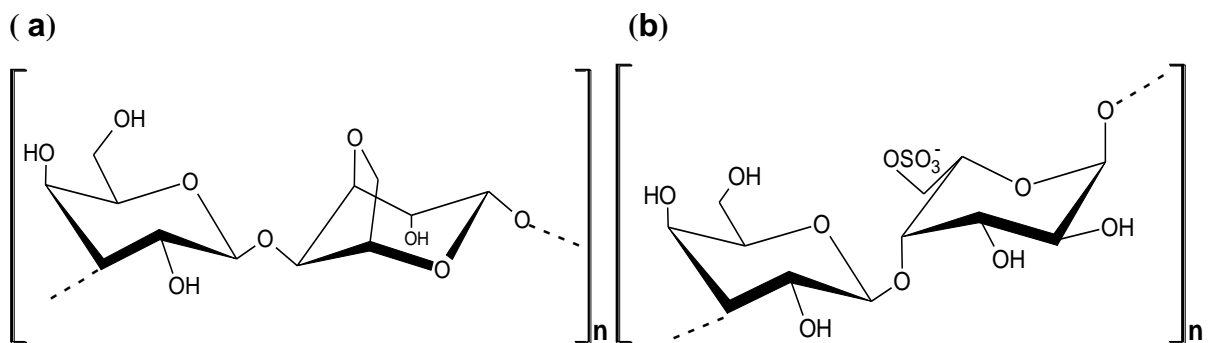


FIGURA 3 - ESTRUTURAS EXTREMAS ENCONTRADAS EM AGARANAS: AGAROSE (a); PRECURSOR DA AGAROSE (b)

Outro tipo de estrutura de galactana utilizado para comparações em estudos de agaranas de algas vermelhas é a porfirana (Figura 4); que é biossintetizada por algas do gênero *Porphyra* e *Bangia* (HOEK; MANN; JAHNS, 1995).

Estruturalmente, as porfiranas são semelhantes à agarose, porém com ocorrência natural de grupos metil eterificando o C-6 de algumas unidades A e de grupos sulfato esterificando o C-6 de unidades de α -L-galactopiranosse em substituição a algumas unidades de 3,6-anidro- α -L-galactopiranosse (ANDERSON; REES, 1965; ASPINALL, 1970). Deste modo, a dispersão estrutural das porfiranas obtidas de diferentes espécies é, portanto, reduzida às diferentes percentagens de metilação e sulfatação no C-6 das unidades A e B, respectivamente (NOSEDA *et al.*, 2000).

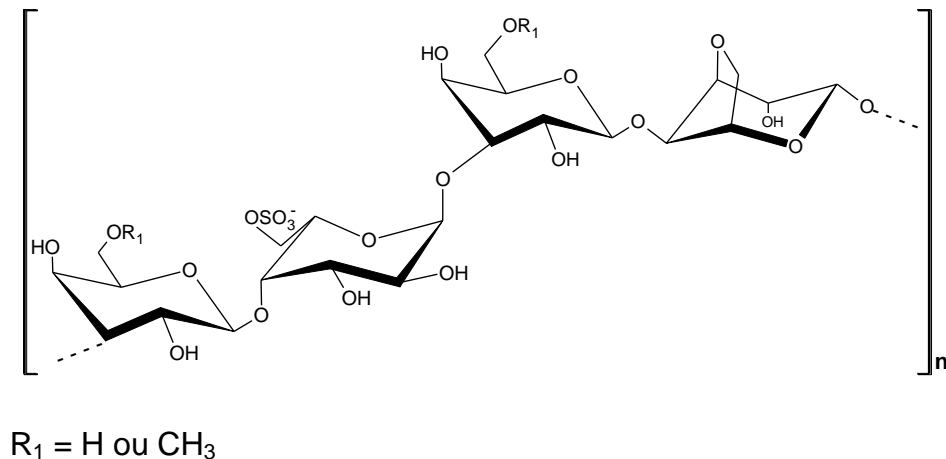


FIGURA 4- ESTRUTURA BÁSICA DAS PORFIRANAS

Estas estruturas mais simples referidas anteriormente são utilizadas como parâmetros de comparação no estudo de agaranas. No entanto, a grande variedade de grupos substituintes, encontrados em diferentes posições e proporções, garante uma grande complexidade estrutural a alguns destes polímeros. A localização e a quantidade dessas substituições afetam consideravelmente as propriedades físico-químicas dos géis de ágar, bem como as atividades biológicas desempenhadas por esses polímeros (FREILE-PELEGRIN; MURANO, 2005).

A agarose é a galactana com maior propriedade geleificante dentro do grupo das agaranas (USOV; IVANOVA; SHASHKOV, 1983). A substituição das unidades de 3,6-anidro- α -L-galactopiranosose por unidades de α -L-galactopiranosose-6-sulfato reduz consideravelmente a propriedade de geleificação desses polímeros, enquanto que a introdução de grupos O-metil nessa mesma posição (C-6) das unidades de β -D-galactopiranosose tem pouca influência sobre tal propriedade (USOV; IVANOVA; SHASHKOV, 1983).

As espécies pertencentes ao gênero *Gelidium* (ordem Gelidiales) são descritas como produtoras do ágar de melhor qualidade, visto que biossintetizam galactanas análogas à agarose, mas, devido ao alto custo desses polímeros e à gradual exaustão dos recursos naturais, foi necessária a busca por novas espécies de algas vermelhas para a obtenção de ágar. Nesse contexto, o gênero *Gracilaria* (Gracilariales, Rhodophyta) tem sido uma excelente alternativa para a indústria

alimentícia, especialmente após a descoberta de que os géis fracos podem ter sua força notavelmente aumentada através do tratamento alcalino (RODRÍGUEZ *et al.*, 2009).

O tratamento alcalino de agaranas contendo unidades precursoras, ou seja, α -L-galactopiranosose-6-sulfato e/ou α -L-galactopiranosose-2,6-dissulfato, transforma estas em unidades de 3,6-anidro- α -L-galactopiranosose e/ou 3,6-anidro- α -L-galactopiranosose 2-sulfato. Esta reação de ciclização é amplamente utilizada na indústria para aumentar o poder geleificante desses polímeros (GLICKSMAN, 1987), ou em laboratório para a quantificação das unidades B naturalmente sulfatadas em C-6 presentes nas galactanas de algas vermelhas (REES, 1961a,b). Posteriormente, esta reação química será abordada com mais detalhes.

As espécies do gênero *Gracilaria* são, a nível mundial, as maiores fontes para a obtenção de ágar (McHUGH, 2003), e uma grande variedade no padrão de substituição tem sido descrita para as galactanas desse gênero. Como exemplos pode-se citar a sulfatação em C-6 e C-4 das unidades de β -D-galactopiranosose para *G. multipartita* e *G. bursa-pastoris* (MURANO, 1995) e em C-4 das unidades de 6-O-metil- β -D-galactopiranosose para *G. edulis* (VILLANUEVA; MONTAÑO, 1999). Elevados teores de grupos metil em C-6 de β -D-galactopiranosose e C-2 das unidades anidrogalactosídicas foram descritos para *G. eucheumoides* (TAKANO; HAYASHI; HARA, 1996) e unidades laterais de 4-O-metil- α -L-galactopiranosose para *G. cervicornis* (LAHAYE; YAPHE, 1989).

A aplicação comercial das galactanas depende diretamente da composição química destas (sulfato, metil, tipo de monossacarídeos), que pode ser significativamente afetada por variáveis utilizadas no processo de extração (PEREIRA-PACHECO *et al.*, 2007). Desta forma, o estudo da estrutura química é de extrema importância para a determinação da melhor condição para a obtenção destes polímeros. Como exemplo pode ser citada a alga *G. gracilis*, que produz ágar de boa qualidade sem a necessidade do uso do tratamento alcalino. As galactanas de *G. gracilis* são constituídas principalmente por díades repetitivas de β -D-galactopiranosose ligada a 3,6-anidro- α -L-galactopiranosose, sendo parte dessas díades 6-O-metiladas. Grupos sulfato presentes em C-4 e/ou C-6 das unidades A, e em C-2

ou C-3 das unidades B foram também descritos para as galactanas desta espécie (RODRÍGUEZ *et al.*, 2009).

Galactanas sulfatadas produzidas por espécies pertencentes a diferentes ordens de Rhodophyta têm sido estudadas em detalhes, mas as pertencentes à ordem Corallinales têm recebido menos atenção, provavelmente devido ao fato de apresentarem uma cobertura calcárea, que é responsável por uma grande diminuição no rendimento de polissacarídeos (STORTZ; CERESO, 2000; NAVARRO; STORTZ, 2002).

Apesar de poucas espécies de Corallinales terem a estrutura química fina de seus polissacarídeos elucidada, a grande semelhança observada entre os que já foram estudados permite a utilização de um nome comum para essas galactanas. Desta forma, o termo “corallinas” (CASES *et al.*, 1994) é válido para nomear as galactanas produzidas por essa ordem (NAVARRO; STORTZ, 2002).

As corallinas são constituídas por uma cadeia principal do tipo agarana, sendo desprovidas de unidades de 3,6-anidrogactose, com os C-6 das unidades de β -D-galactopiranosose quase que totalmente substituídos por unidades de xilose e, em menores proporções, por grupos sulfato. As unidades de α -L-galactopiranosose são parcialmente substituídas em C-2 por grupos metil e sulfato e, adicionalmente, o C-3 pode se apresentar sulfatado em algumas destas unidades (NAVARRO; STORTZ, 2002). Este padrão de substituição foi descrito para os polissacarídeos obtidos de *Joculator maximus*, e é a estrutura mais simples que já foi descrita para a ordem Corallinales (TAKANO *et al.*, 1996). As corallinas descritas para outras espécies apresentam, em menores quantidades, outros tipos de substituição, e isto fornece características próprias aos polissacarídeos de cada espécie. Essas diferenças são, por exemplo, a presença de grupos O-metil em C-3 de α -L-galactopiranosose e em C-6 de β -D-galactopiranosose para *Corallina pilulifera* (USOV *et al.*, 1997) e de grupos sulfato em C-4 de β -D-galactopiranosose para *Bossiella cretacea* (USOV; BILAN, 1998). Para *C. officinalis*, o padrão de substituição das corallinas é mais complexo, sendo similar ao de *C. pilulifera*, porém com maiores proporções de grupos metil e com algumas unidades de β -D-galactopiranosose substituídas em C-6 por unidades de 4-O-metil-D-galactopiranosose (CASES *et al.*, 1994). A presença de um monossacarídeo não-comum para a ordem Corallinales, 2,3-di-O-metil- α -D-galactopiranosose, foi descrito como unidades laterais da cadeia principal para as

galactanas de *Lithothamnion heterocladum*, além de significativas quantidades de α -L-galactopiranosose 3-O- ou 6-O-glicosiladas (NAVARRO *et al.*, 2011).

2.4 GALACTANAS DA ORDEM CERAMIALES

Várias espécies da ordem Ceramiales vêm sendo descritas como produtoras de galactanas sulfatadas do grupo das agaranas (BATEY; TURVEY, 1975; USOV; IVANOVA; SHASHKOV, 1983; USOV; IVANOVA, 1987; USOV; KLOCHKOVA, 1992; MILLER; FURNEAUX, 1997; NOSEDA; TULIO; DUARTE, 1999; MILLER; BLUNT, 2002; DUARTE *et al.*, 2002, DUARTE *et al.*, 2004, CARDOSO *et al.*, 2007; PRADO; CIANCIA; MATULEWICZ, 2008; VILLANUEVA *et al.*, 2010).

As agaranas descritas para as espécies da ordem Ceramiales são normalmente substituídas por diferentes grupos, podendo encontrar-se metiladas, sulfatadas ou glicosiladas em diferentes posições das unidades A e B. Pode ocorrer ainda a substituição dos C-4 e C-6 das unidades A por acetal de ácido pirúvico e a presença do anel de 3,6-anidro- α -L-galactopiranosose nas unidades B (USOV; IVANOVA; SHASHKOV, 1983; MILLER; FALSHAW; FURNEAUX, 1993b; MILLER; BLUNT, 2002; DUARTE *et al.*, 2004).

Miller, Falshaw e Furneaux (1993b), com o objetivo de simplificar a estrutura química, pré-trataram com álcali os polissacarídeos de cinco espécies da ordem Ceramiales (Rhodomelaceae) e demonstraram para estas agaranas uma grande heterogeneidade de substituintes. Como exemplo pode-se citar os elevados teores de grupos metil em C-6 das unidades A para *Osmundaria colensoi*, enquanto a presença de 2-O-metil-galactopiranosose foi verificada apenas para o exemplar de *Laurencia thyrsofera* e de 2-O-metil-3,6-anidro- α -L-galactopiranosose apenas para o de *O. colensoi*. Além destas substituições, significativos teores de ácido pirúvico foram observados para *Lenormandia chauvinii* e *Bryocladia ericoiides*, e em menores quantidades para *O. colensoi* e *L. thyrsofera*. Para todos os polissacarídeos descritos neste trabalho, a razão entre β -D-galactopiranosose e 3,6-anidro- α -L-galactopiranosose foi de $\sim 1:1$, que é o ideal para ágaros. A exceção foi a agarana da espécie de

Laurencia (*L. thyrsifera*), que apresentou baixo teor de 3,6-anidro- α -L-galactopiranosose e alto teor de xilose (14%), sendo parte das unidades A deste polissacarídeo sulfatada em C-2. Para ambas as espécies de *Lenormandia* estudadas (*L. angustifolia* e *L. chauvinii*) foi descrita a presença de unidades de β -D-galactopiranosose com o C-4 substituído por grupos sulfato ou por unidades de xilose (MILLER; FALSHAW; FURNEAUX, 1993b).

Georgiella confluens foi descrita como produtora de xilogalactanas sulfatadas naturalmente ricas em unidades metiladas, sendo descritas duas unidades monossacarídicas incomuns, que foram caracterizadas como α -L-galactopiranosose sulfatada em C-3 e β -D-galactopiranosose 4-xilosilada (KOLENDER; MATULEWICZ, 2002), sendo o tipo de substituição para as unidades de xilose o mesmo que foi descrito para espécies de *Lenormandia* (*L. angustifolia* e *L. chauvinii*) (MILLER; FALSHAW; FURNEAUX, 1993b).

Usov, Ivanova e Shashkov (1983), com o propósito de encontrar novos polissacarídeos formadores de gel, isolaram galactanas geleificantes e não geleificantes de várias espécies de algas vermelhas, fazendo uso da técnica de gelo-degelo. Das quatro algas pertencentes à ordem Ceramiales estudadas, três apresentaram uma fração geleificante, sendo elas, *Campylaephora hypnaeoides*, *Delesseria serrulata* e *Polysiphonia morrowii*, enquanto *Chondria decipiens* apresentou somente frações não geleificantes. Por análises de RMN de ^{13}C , os referidos autores identificaram que a fração de polissacarídeos geleificantes da alga *C. hypnaeoides* é análoga às porfiranas, com conteúdo de 6-O-metil- β -D-galactopiranosose menor que a porfirana típica de *Porphyra umbilicales* (ANDERSON; REES, 1965). *P. morrowii*, por sua vez, apresenta uma fração polissacarídica geleificante com estrutura análoga à da agarose, com grupos O-metil e sulfato ocupando predominantemente o C-6 das unidades de β -D-galactopiranosose. Além das substituições por grupos O-metil e éster de sulfato, referidas anteriormente, as espécies *C. hypnaeoides* (Ceramiales), *D. serrulata* (Delesseriaceae), *P. morrowii* (Rhodomelaceae) e *C. decipiens* (Rhodomelaceae) apresentaram diferentes percentagens de substituição por unidades de xilose (USOV; IVANOVA; SHASHKOV, 1983).

Agaranas com padrão de substituição relativamente simples foram descritas para as algas *Pterosiphonia pennata* (MILLER, 2003), *Euptilota formosissima* e *Strebocladia glomerulata* (MILLER; FURNEAUX, 1997). As agaranas de *P. pennata* apresentam as unidades A parcialmente sulfatadas em C-6, e as unidades B são constituídas por quantidades similares de 3,6-anidro- α -L-galactopiranosose e seu derivado 2-O-metil, sendo que apenas uma pequena parte destas unidades ciclizadas é substituída pelas precursoras (α -L-galactopiranosose 6-sulfato) (MILLER, 2003). As galactanas de *E. formosissima* apresentam as unidades A totalmente substituídas por grupos O-metil em C-6, enquanto as de *S. glomerulata* apresentam esse mesmo carbono substituído por sulfato. Ambas as espécies apresentam as unidades B majoritariamente na forma de 3,6-anidro- α -L-galactopiranosose, com pequenas quantidades de α -L-galactopiranosose 6-sulfato (MILLER; FURNEAUX, 1997).

Outro exemplo de agaranas com estrutura química relativamente simples foi descrito para *Dasyclonium incisum*, que apresentam os C-4 quase totalmente sulfatados, sendo as unidades B deste polissacarídeo compostas por 3,6-anidro- α -L-galactopiranosose, sendo estas últimas parcialmente 2-O-metiladas (MILLER; FALSHAW; FURNEAUX, 1993a).

Batey e Turvey (1975), revendo a estrutura das galactanas biossintetizadas pela alga *Polysiphonia lanosa*, descreveram estas como semelhantes às porfiranas, devido à substituição dos C-6 por grupos metil e sulfato nas unidades A e B, respectivamente. Adicionalmente, unidades de 2-O-metil- α -L-galactopiranosose-6-sulfato, β -D-galactopiranosose-6-sulfato e 6-O-metil- β -D-galactopiranosose-4-sulfato também estão presentes. Este foi o primeiro relato de unidades de β -D-galactopiranosose 6-O-metiladas que são também sulfatadas.

Outras espécies do gênero *Polysiphonia* foram também estudadas: *P. abscissoides*, *P. strictissima* (MILLER; FURNEAUX, 1997) e *P. atterima* (MILLER, 2003). Estas foram descritas como produtoras de agaranas nas quais a principal substituição é a sulfatação em C-6, que ocorre tanto nas unidades A quanto nas B. As unidades B encontram-se principalmente na forma de 3,6-anidro- α -L-galactopiranosose, sendo que algumas destas podem estar na forma precursora (α -L-galactopiranosose 6-sulfato). Unidades de xilose estão presentes, porém sua posição

na galactana não foi definida. Adicionalmente, assim como *P. morrowii* (USOV; IVANOVA; SHASHKOV, 1983, USOV; IVANOVA, 1987), *P. abscissoides* (MILLER; FURNEAUX, 1997) e *P. atterima* (MILLER, 2003), *P. lanosa* também produz agaranas com unidades A 6-O-metiladas (BATEY; TURVEY, 1975).

Em um estudo mais recente, Prado, Ciancia e Matulewicz (2008) descreveram os polissacarídeos de outra espécie do gênero *Polysiphonia*: *P. nigrescens*, que biossintetiza agaranas semelhantes às descritas no parágrafo acima, sendo estes polissacarídeos parcialmente ciclizados com um alto grau de sulfatação em C-6 das unidades A e B, podendo apresentar também pequenas quantidades de 6-O-metil- β -D-galactopiranoose. Neste estudo, o posicionamento das unidades de xilose pôde ser localizado, estando este monossacarídeo presente como unidades simples glicosilando o C-6 também das unidades β -D-galactopiranosídicas.

Da alga *Chondria macrocarpa*, foi obtida uma xilogalactana que apresentou uma cadeia principal do tipo agarana, sendo as unidades de β -D-galactopiranoose parcialmente sulfatadas em C-2 e C-6. As unidades B são compostas principalmente por 3,6-anidro- α -L-galactopiranoose e seu precursor α -L-galactopiranoose 6-sulfato. Uma quantidade significativa de xilose ligada ao C-3 de unidades de L-galactopiranoose 6-sulfatadas foi observada para as galactanas biossintetizadas por essa espécie (FURNEAUX; STEVENSON, 1990).

Miller e Blunt (2002) analisaram a composição dos polissacarídeos da mesma espécie descrita acima (*Chondria macrocarpa*), mas foram utilizados exemplares coletados no outono e na primavera. Os polissacarídeos obtidos da alga coletada no outono foram semelhantes àqueles descritos por Furneaux e Stevenson (1990), enquanto que os polissacarídeos dos exemplares coletados na primavera apresentaram altos níveis de unidades B na forma precursora (α -L-galactopiranoose 6-sulfato) e baixos níveis de β -D-galactopiranoose-2-sulfato, sendo descrita, ainda, a presença de grupos O-metil em C-6 em quantidades moderadas. Assim como os polissacarídeos de *L. angustifolia* e *L. chauvivii* (MILLER; FALSHAW; FURNEAUX, 1993b), as agaranas extraídas *C. macrocarpa* coletadas no mês de novembro (primavera no hemisfério sul) também continham acetal de ácido pirúvico (MILLER; BLUNT, 2002). Desta forma, Miller e Blunt (2002) concluíram que as agaranas de *C. macrocarpa* variam de acordo com a estação do ano; na primavera são

predominantemente polímeros precursores do ágar, enquanto que no outono são predominantemente polímeros de ágar sulfatado.

Agaranas com altos teores de ácido pirúvico foram descritas para a espécie *Acanthophora spicifera*. Estas apresentam as unidades A principalmente 2-sulfatadas (contendo ácido pirúvico ou não), com menores proporções de grupos sulfato ou metil em C-6, além de unidades de β -D-galactopiranosose não substituídas. As unidades B são compostas majoritariamente por 3,6-anidro- α -L-galactopiranosose e seu correspondente precursor biológico, α -L-galactopiranosose-6-sulfato, juntamente com menores proporções de 3,6-anidro- α -L-galactopiranosose 2-sulfato, α -L-galactopiranosose 2,6-dissulfato, α -L-galactopiranosose trissulfatada, α -L-galactopiranosose 2,6-dissulfato 3-xilose, 2-O-metil- α -L-galactopiranosose e α -L-galactopiranosose não substituída (CAUDURO, 2000; DUARTE *et al.*, 2004). Algumas frações de agaranas obtidas neste estudo apresentaram potente atividade antiherpética (ver adiante).

Ainda se tratando da espécie *Acanthophora spicifera*, de uma agarana pré-tratada com álcali e submetida à hidrólise redutiva parcial, foram isolados dissacarídeos alditóis com grupos sulfato em C-2 das unidades A e também com acetal de ácido pirúvico nestas mesmas unidades (GONÇALVES *et al.*, 2002). Este estudo auxiliou na elucidação da estrutura química fina das agaranas biossintetizadas por *A. spicifera* (DUARTE *et al.*, 2004).

Culturas de *Bostrychia moritziana*, obtidas de água doce e de ambiente marinho, foram analisadas quanto à composição dos polissacarídeos da matriz extracelular. As agaranas biossintetizadas pelos espécimens de água doce apresentam uma maior diversidade estrutural, sendo constituídas por unidades de β -D-galactopiranosose e seu derivado 6-O-metil, ligadas a unidades de 3,6-anidrogalactopiranosose e seu derivado 2-O-metil. Unidades de α -L-galactopiranosose metiladas e sulfatadas em C-2 e C-6, respectivamente, também estão presentes, além de traços de terminais não redutores de xilose. Os polissacarídeos obtidos dos espécimens de ambiente marinho diferiram dos de água doce por conterem apenas traços de monossacarídeos 2-O-metilados, reduzidos teores de grupos sulfato e maiores quantidades de 6-O-metil- β -D-galactopiranosose, de unidades anidrogalactosídicas e de unidades terminais de xilose. As diferenças observadas entre as composições dos polissacarídeos estudados foram associadas pelos

autores à adaptação das algas ao stress osmótico e iônico dos diferentes ambientes (YOUNGS *et al.*, 1998).

Análises químicas e espectroscópicas permitiram determinar que *Bostrychia montagnei* biossintetiza agaranas de estrutura complexa. Essas apresentam as unidades de β -D-galactopiranosose principalmente sulfatadas em C-4, sendo que essas unidades A podem ser também substituídas em C-6 por grupos metil, unidades simples de xilose ou, em menores proporções, por galactopiranosose. As unidades B são constituídas principalmente por 2-O-metil-3,6-anidro- α -L-galactopiranosose e α -L-galactopiranosose 3-sulfato, podendo esta última unidade estar também 2-O-metilada ou 2-O-glicosilada ou, ainda, ser 2,3- ou 3,6-dissulfatada. Este foi o primeiro relato de uma agarana contendo conjuntamente unidades de galactopiranosose com grupos sulfato em C-4 e em C-3 (DUARTE *et al.*, 2002). Adicionalmente, as galactanas de *B. montagnei* apresentam atividade contra HSV-1 e HSV-2 (DUARTE *et al.*, 2001, ver adiante).

Embora grande parte das algas pertencentes à ordem Ceramiales sejam descritas como produtoras de galactanas do tipo agaranas, foi verificada a presença de híbridos-D/L em algumas espécies pertencentes à essa ordem.

Takano *et al.* (1999), revendo a estrutura dos polissacarídeos de *Rhodomela larix*, isolaram uma fração minoritária constituída por um polissacarídeo híbrido-D/L, que foi obtido e caracterizado através das técnicas de precipitação com Cetavlon e metanólise parcial. Posteriormente, através do fracionamento de uma agarana bruta obtida da alga *Digenea simplex*, Takano *et al.* (2003) também isolaram uma galactana sulfatada do tipo híbrida D/L, sendo esta última do tipo carragenana-agarana.

Dentre as famílias pertencentes à ordem Ceramiales, a Rhodomelaceae é a mais estudada quanto à estrutura química de seus polissacarídeos (STORTZ; CERESO, 2000). Essa família, com aproximadamente 125 gêneros, é a maior da ordem Ceramiales. Alguns gêneros, como *Polysiphonia*, *Laurencia* e *Chondria*, por exemplo, são compostos por numerosas espécies (BOUZON; OURIQUES, 2007).

2.4.1 Galactanas do Complexo *Laurencia*

O presente trabalho de doutorado tem como principal objetivo a análise estrutural de polissacarídeos de espécies da Ordem Ceramiales, mais especificamente as do complexo *Laurencia* (família Rhodomelaceae). Esse complexo inclui mais de 150 espécies com uma ampla distribuição geográfica, sendo encontradas desde as águas temperadas às tropicais (NAN; CHOI, 2001). Atualmente, esse complexo se divide em quatro gêneros: *Laurencia*, *Osmundea*, *Chondrophyucus* e *Palisada* (CASSANO *et al.*, 2009).

Analisando dados da literatura referentes a algumas espécies do gênero *Laurencia*, observa-se uma variedade no padrão de substituição das agaranas biossintetizadas pelas algas desse gênero.

Para as agaranas da espécie *Laurencia pinnatifida*, Bowker e Turvey (1968a, 1968b) sugeriram uma estrutura repetitiva de porfirana, mas mascarada pelas substituições por grupos sulfato, metil e unidades de xilose. Deste modo, as unidades A deste polímero são compostas por β -D-galactopiranosose e seu derivado 6-O-metil em equivalentes proporções, enquanto as unidades B são constituídas por 2-O-metil- α -L-galactopiranosose e 3,6-anidro- α -L-galactopiranosose. Os grupos sulfato ocupam principalmente o C-2 das unidades A e o C-6 das unidades B, não sendo definida a posição das unidades de xilose.

Usov e Elashvili¹ (1989, *apud* USOV; ELASHVILI, 1991), investigando algumas espécies representativas do gênero *Laurencia*, observaram para as agaranas de *Laurencia obtusa*, *Laurencia papillosa* e *Laurencia nipponica* uma quantidade significativa de grupos sulfato no C-6 de unidades α -L-galactopiranosídicas que se mostraram estáveis em álcali. Além disso, os polissacarídeos dessas espécies apresentaram espectros de RMN de ¹³C complexos, que não puderam ser assinalados satisfatoriamente. Posteriormente, Usov e Elashvili (1991) estudaram as agaranas de *L. nipponica* mais detalhadamente.

¹USOV, A., I.; ELASHVILI, M. Ya. Specific fragmentation of red algal galactans under reducing conditions. *F. E. C. S. Fifth Int. Conf. Chem. Biotechnol. Active Nat. Prod., Conf. Proc.* Bulgarian Acad. Sci., Sofia., 2, 346-350, 1989.

Através da hidrólise reductiva parcial das galactanas de *L. nipponica*, Usov e Elashvili (1991) isolaram um pentassacarídeo sulfatado no C-6 das unidades B que se apresentou resistente ao tratamento alcalino. Esse dado, em conjunto com as análises de RMN de ^{13}C e ^1H , permitiu aos autores concluir que os C-3 das unidades de α -L-galactopiranosose-6-sulfato se encontravam substituídos por unidades simples de β -D-xilopiranosose nessas agaranas.

Também através do uso da hidrólise reductiva parcial, Usov e Elashvili (1997) obtiveram como principais produtos das galactanas de *Laurencia coronopus* os dissacarídeos agarobiitol (G \rightarrow LA), seu derivado 6-O-metil (G6M \rightarrow LA) e 6-O-sulfato (G6S \rightarrow LA). Diferentemente das agaranas de *L. nipponica* (USOV; ELASHVILI, 1991), as de *L. coronopus* não tiveram a posição das unidades de xilose localizada. Os autores sugeriram que, devido à estreita relação taxonômica entre essas duas espécies, as agaranas de *L. coronopus* também pudessem ser xilosiladas em C-3 das unidades de α -L-galactopiranosose (USOV; ELASHVILI, 1997).

Um padrão distinto de substituição para as unidades de xilose presentes nas agaranas obtidas de espécies do complexo *Laurencia* foi descrito para *Laurencia undulata*, sendo isolada a partir dessa espécie uma agarobiose xilosilada, sendo a posição dessas pentoses o C-4 das unidades β -D-galactopiranosídicas (G4X \rightarrow LA) (HIRASE *et al.*, 1982). Unidades de xilose glicosilando o C-4 de unidades de β -D-galactopiranosose foram também descritas para duas espécies de *Lenormandia* (*L. angustifolia* e *L. chauvinii*) (MILLER; FALSHAW; FURNEAUX, 1993b) e para *Georgiella confluens* (KOLENDER; MATULEWICZ, 2002).

Agaranas piruvatadas e com alto teor de unidades de xilose (14%) foram descritas para *L. thyrsifera* (MILLER; FALSHAW; FURNEAUX, 1993b). Essas galactanas apresentam baixíssimo teor de grupos O-metil em C-6 das unidades A, bem como de unidades B na forma 3,6-anidro- α -L-galactopiranosose, em contraposição ao fato de esse polissacarídeo ter sido submetido a tratamento alcalino. Os autores atribuíram a não ciclização das unidades de α -L-galactopiranosose ou à presença de unidades de xilose em C-3 ou mesmo à ausência de grupos sulfato no C-6 dessas unidades. Adicionalmente, a piruvatação dessas agaranas ocorre nas unidades de β -D-galactopiranosose sem sulfatação em C-2 (MILLER; FALSHAW; FURNEAUX, 1993b).

Utilizando a técnica de metanólise parcial, Valiente *et al.* (1993) demonstraram que as agaranas de *L. gemmifera* são compostas principalmente por β -D-galactopiranosose, as quais podem estar metiladas em C-6 (unidades A) e 3,6-anidro- α -L-galactopiranosose, as quais podem estar metiladas em C-2 (unidades B). As análises estruturais das agaranas produzidas por esta espécie não puderam ser realizadas, visto que a metanólise promove a perda dos grupos sulfato. Em contrapartida, o ácido pirúvico não é perdido nesse tipo de hidrólise e, deste modo, foi possível detectar a presença deste substituinte em frações purificadas das agaranas de *L. gemmifera*. De modo semelhante ao acetal de ácido pirúvico, as unidades de xilose presentes nestas agaranas também puderam ser detectadas somente após a obtenção de frações polissacarídicas purificadas (VALIENTE *et al.*, 1993).

Com objetivo de investigar novas espécies com potencial para a produção de ágar, Villanueva *et al.* (2010) descreveram a espécie *L. flexilis* como produtora de uma agarana constituída majoritariamente pela díade de 6-O-metil- β -D-galactopiranosose ligada a 3,6-anidro- α -L-galactopiranosose, sendo uma pequena proporção das unidades A sulfatadas em C-4. Os referidos autores descreveram o ágar produzido por esta espécie como um gel de força moderada, apresentando as características físico-químicas e reológicas apropriadas para a utilização na indústria alimentícia (VILLANUEVA *et al.*, 2010).

Os polissacarídeos produzidos por duas espécies de *Chondrophycus* (*C. papillosus* e *C. flagelliferus*) foram investigados sob o aspecto estrutural (CARDOSO *et al.* 2007). Estudos morfológicos e filogenéticos deram suporte à transferência dessas espécies para o gênero *Palisada*, que foram renomeadas como *Palisada papillosa* e *Palisada flagellifera*, respectivamente (NAM, 2006; NAM 2007; CASSANO *et al.*, 2009). Análises químicas e espectroscópicas demonstraram que, surpreendentemente, além de galactanas sulfatadas e piruvatadas com um complexo padrão de substituição (as quais foram parcialmente caracterizadas), *P. papillosa* e *P. flagellifera* biossintetizam uma xilomanana sulfatada formada por uma cadeia principal de unidades de manose 4-O-substituídas sulfatadas em C-2 (CARDOSO *et al.*, 2007). Este estudo adicionou um novo tipo de polissacarídeo àqueles produzidos pelas algas da ordem Ceramiales. Destaca-se que este é o primeiro relato deste tipo de polissacarídeo, e deste modo, outras espécies de algas

pertencentes ao complexo Laurencia foram, no presente trabalho, investigadas quanto à presença de xilomananas sulfatadas, bem como quanto à estrutura química de suas galactanas sulfatadas.

2.5 DETERMINAÇÃO DA CONFIGURAÇÃO ENANTIOMÉRICA

A análise estrutural de polissacarídeos usualmente envolve análises de metilação e, em alguns casos, o padrão de ligação desses polímeros dá origem a derivados metilados que não podem ser interpretados inequivocadamente. Como exemplos, podem ser citadas as unidades de β -D-galactose 4-ligadas 3-substituídas, unidades de α -L-galactose 4-ligadas 3-substituídas e unidades de α -D-galactose 4-ligadas 3-substituídas, sendo que todas essas unidades iriam dar origem ao derivado 2,6-di-O-metil-galactose como produto da análise de metilação (ERREA; KOLENDER; MATULEWICZ, 2001).

Deste modo, a determinação da enantiomeridade do derivado 2,6-di-O-metil-galactose poderia fornecer informações adicionais sobre a estrutura do polissacarídeo, desde que o derivado 2,6-di-O-metil-L-galactose indicaria a presença de unidades de α -L-galactose 4-ligadas 3-substituídas, e a presença do derivado 2,6-di-O-metil-D-galactose seria atribuído a unidades de β -D-galactose 3-ligadas 4-substituídas ou α -D-galactose 4-ligadas 3-substituídas (ERREA; KOLENDER; MATULEWICZ, 2001).

A determinação da enantiomeridade é também de extrema importância no caso de galactanas do tipo D/L-híbridas, nas quais há a co-ocorrência de unidades de α -D- e α -L-galactose nas unidades B do polissacarídeo. Deste modo, a determinação da configuração absoluta das unidades sacarídicas que compõem essas galactanas é imprescindível para a determinação da estrutura química fina destes polímeros.

A determinação da enantiomeridade de unidades açúcares às séries D- e L- não pode ser realizada pelas técnicas cromatográficas convencionais, visto que estes consistem em isômeros do tipo enantiômeros (imagens especulares um do outro, Figura 5), de forma que ambos possuem as mesmas propriedades físicas.

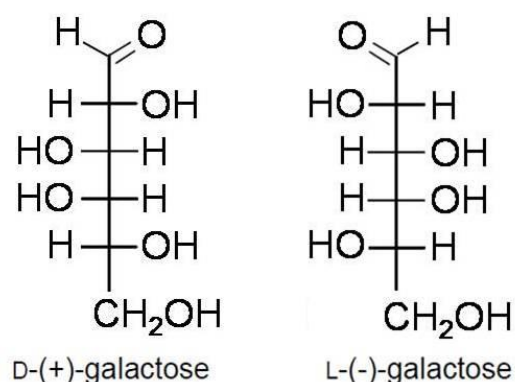


FIGURA 5 – GALACTOSE: PAR DE ENANTIÔMEROS “D” E “L”

FONTE: ELABORADA PELO AUTOR

Isômeros são definidos como compostos químicos diferentes que possuem a mesma fórmula molecular. Os compostos isômeros que possuem a mesma conectividade mas diferem no arranjo espacial de seus átomos no espaço são denominados estereoisômeros. Existem dois grupos de compostos estereoisômeros: (1) enantiômeros: compostos que são imagens especulares um do outro e que, portanto, não se sobrepõem; (2) diastereoisômeros: compostos que não são imagens especulares um do outro (Figura 6). Para que a enantiomeridade ocorra é necessário que a molécula apresente ao menos um centro quiral, e o termo estereoquímica é utilizado para designar o arranjo espacial em três dimensões que os átomos de uma molécula apresentam no espaço.

Os compostos que são diastereoisômeros diferem entre si quanto ao ponto de fusão, solubilidade e pressão de vapor. Já os compostos enantiômeros possuem as mesmas propriedades físicas, sendo que a única propriedade físico-química capaz de diferenciá-los é a rotação do plano de luz plano-polarizada, pois os enantiômeros são opticamente ativos (SOLOMONS; FRYHLE, 2002).

Desta forma, a reação de açúcares enantioméricos com uma amina quiral de uma única série enantiomérica fornecerá derivados diastereoisômeros desses açúcares, os quais são suscetíveis à separação por métodos cromatográficos, pois possuem solubilidade diferenciada em solventes comuns e pontos de ebulição e fusão diferentes (SOLOMONS; FRYHLE, 2002).

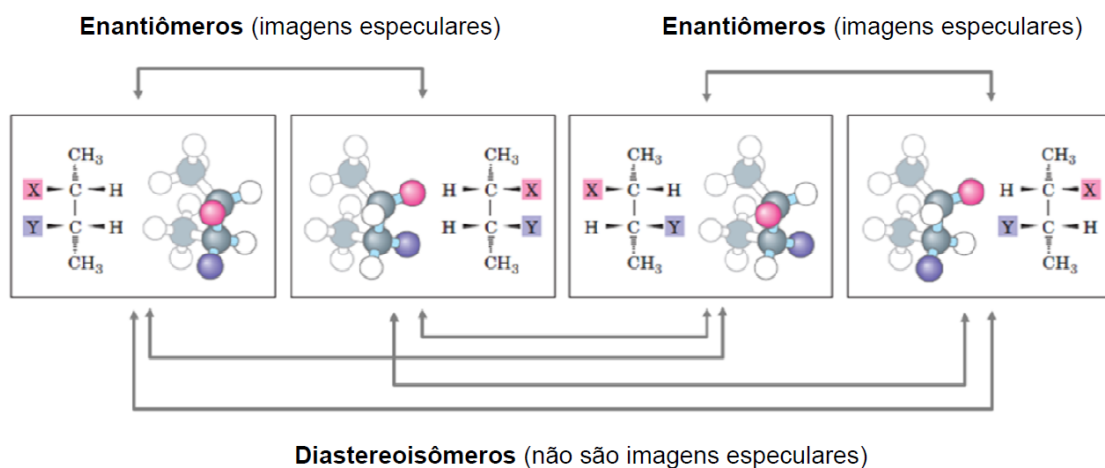


FIGURA 6 – ISÔMEROS: ENANTIÔMEROS E DIASTEREISÔMEROS

FONTE: MODIFICADA DE NELSON E COX, 2011

A determinação da configuração absoluta de um açúcar presente em um polissacarídeo requer, deste modo a aminação redutiva deste, que consiste no seguinte processo: (1) hidrólise das ligações glicosídicas, (2) aminação redutiva, utilizando-se uma amina quiral, que pode ser AP ou MBA (Figura 7). Visto que os açúcares hidrolisados estão em sua forma aldeídica, estes são facilmente reduzidos por um mecanismo de adição nucleofílica da amina sobre a carbonila do aldeído, formando um intermediário hemiaminal. Esse intermediário sofre desidratação originando uma imina. Tanto o hemiaminal quanto a imina sofrem redução formando o derivado aminado (Figura 8).

O resultado final do processo de aminação redutiva com uma amina S é uma mistura dos diastereoisômeros: D/(S) e L/(S), os quais possuem tempos de eluição diferenciais e, portanto podem ser separados e quantificados através de cromatografia líquido-gasosa acoplada à espectrometria de massa (CLG-EM) (NAVARRO; STORTZ, 2003).

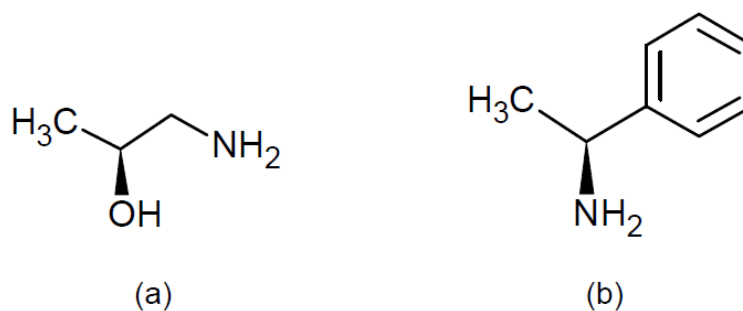


FIGURA 7 – AMINOPROPANOL (a) E METILBENZILAMINA (b)

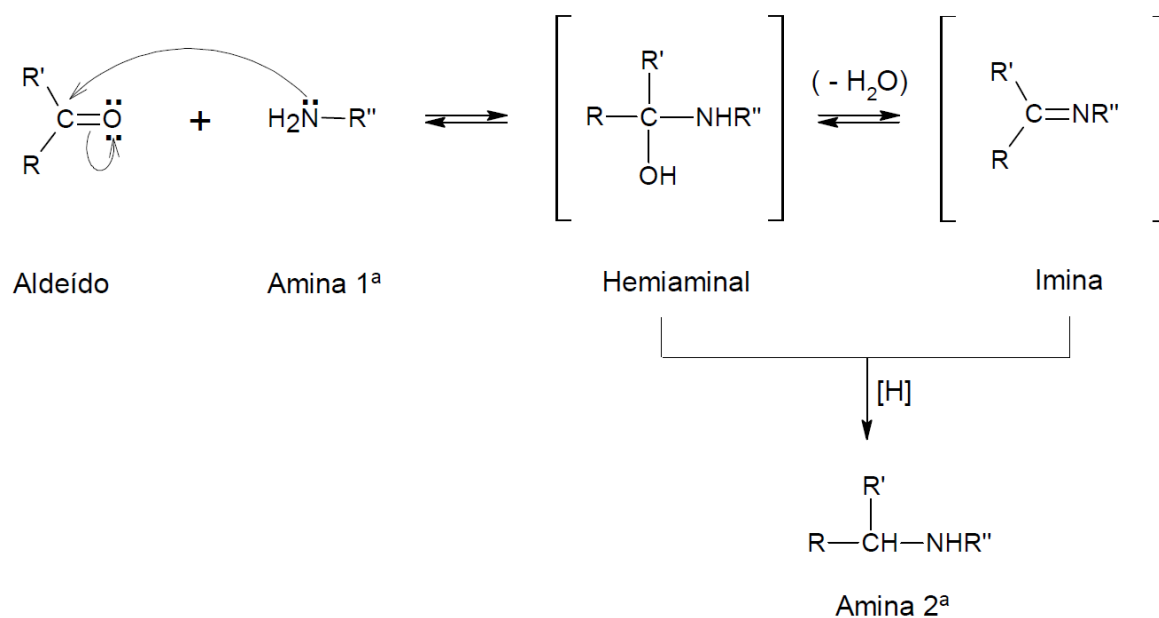


FIGURA 8 – MECANISMO DA REAÇÃO DE AMINAÇÃO REDUTIVA
 FONTE: SOLOMONS E FRYHLE, 2002

2.6 GALACTANAS SULFATADAS: IMPORTÂNCIA ECONÔMICA

Devido à capacidade de formarem géis ou soluções viscosas em sistemas aquosos, as galactanas sulfatadas são conhecidas como ficocolóides, sendo estes

polímeros amplamente utilizados em vários setores industriais, nos quais atuam como agentes espessantes, geleificantes e estabilizantes (CAMPO *et al.*, 2009).

No setor alimentício, as carragenanas são utilizadas para melhorar a textura de queijos, para controlar a viscosidade e textura de pudins e outras sobremesas com leite, para dar liga e estabilizar carnes processadas, em molhos, em hambúrgueres com baixos teores de gorduras, entre outras aplicações. Estes polímeros são também utilizados em uma diversidade de outros setores, como: indústria têxtil, cosmética, de papel e farmacêutica (CAMPO *et al.*, 2009).

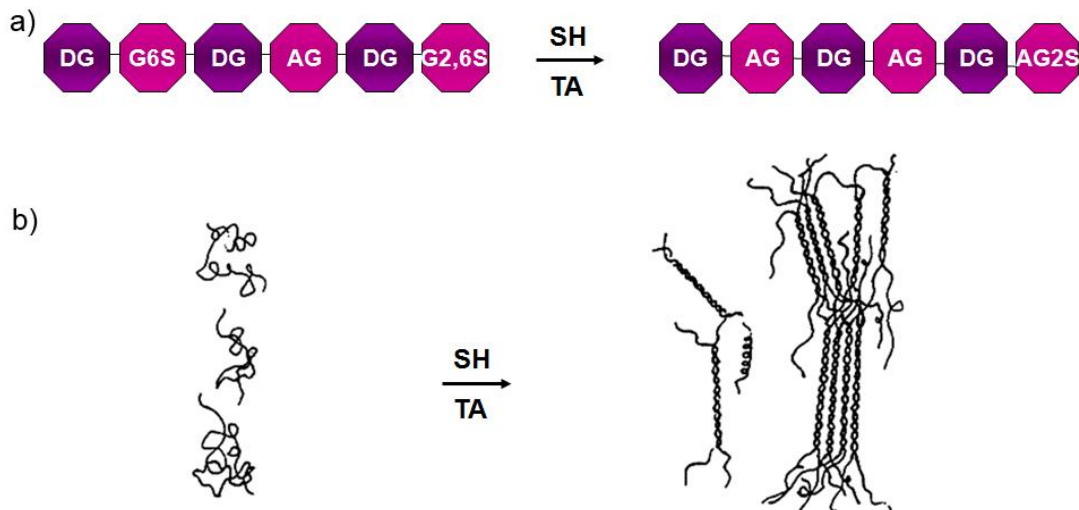
As agaranas são comercialmente obtidas a partir de espécies como *Porphyra*, *Gelidium*, *Pterocladia* e *Gracilaria* (LEE, 1989). Estes hidrocolóides são utilizados em inúmeros produtos das indústrias alimentícia, farmacêutica e biotecnológica (GANESAN *et al.*, 2011), sendo o Japão o maior produtor mundial desses polímeros. O ágar foi o primeiro ficocolóide utilizado na indústria alimentícia (ARMISEN; GALATAS, 2000), a qual é responsável por 80% do consumo deste hidrocolóide (KUMAR; FOTEDAR, 2009).

As algas do gênero *Porphyra* são consideradas importantes “produtos marinhos”, visto que movimentam cerca de 1,3 bilhões de dólares por ano (BLOUIN *et al.*, 2011). As porfiranas, agaranas obtidas das algas deste gênero, não são utilizadas como ingredientes geleificantes ou texturizantes, mas mesmo assim fazem parte dos polissacarídeos algais mais consumidos pelo fato de serem o principal componente das espécies *P. yezoensis* e *P. tenera*, que são extensivamente utilizadas no sushi (NISIZAWA *et al.*, 1987; FUKUDA *et al.*, 2007).

A utilização dos polissacarídeos sulfatados nos diversos setores econômicos é dependente de suas propriedades físico-químicas, sendo a capacidade única desses polímeros formarem géis fortes em soluções aquosas resultado da peculiar estrutura química regular, que possibilita conformações moleculares ordenadas e agregações (LAHAYE, 2001), estando o teor de unidades de 3,6-anidrogactose diretamente relacionado à capacidade de geleificação das galactanas (Figuras 9a,b) (USOV, 1984). Este monossacarídeo é produzido apenas pelas algas vermelhas, não sendo encontrado nos demais polissacarídeos biossintetizados por outros grupos vegetais (USOV, 1984).

As unidades anidrogactosídicas são formadas naturalmente na alga através da atividade da enzima sulfidrolase a partir de unidades precursoras de α -

galactopirranose 6-sulfato e/ou α -galactopirranose 2,6-dissulfato (REES, 1961a,b; WONG; CRAIGIE, 1978), ou podem ser obtidas a partir das mesmas unidades precursoras por meio de uma reação química denominada tratamento alcalino (Figura 9a).



SH = Sulfohidrolase; TA = Tratamento alcalino

FIGURA 9 - FORMAÇÃO DAS UNIDADES DE 3,6-ANIDROGALACTOSE (a) E FORMAÇÃO DO GEL EM GALACTANAS SULFATADAS (b)

FONTE: ELABORADA PELO AUTOR

2.6.1 Tratamento alcalino

A reação química utilizada para aumentar o teor de unidades de 3,6-anidrogalactose em galactanas sulfatadas é denominada tratamento alcalino, visto que é realizada em meio básico e na presença de um agente redutor estável em meio básico, o borohidreto de sódio (NaBH_4), o qual é adicionado ao meio reacional antes e após a adição da base, visando impedir a degradação do polissacarídeo através de suas extremidades redutoras (CIANCIA *et al.*, 1993).

O tratamento alcalino é um processo amplamente utilizado pela indústria para a obtenção de polissacarídeos com maior capacidade de geleificação.

Esta reação, que ocorre em meio básico e com temperatura variável, promove a liberação do grupo sulfato em C-6 das unidades de α -galactopiranosose e em seguida ocorre a formação do anel 3,6-anidro, com a perda de uma molécula de água. Esta é uma reação de substituição nucleofílica bimolecular (S_N2), na qual as unidades de α -galactopiranosose passam de uma conformação ${}^4C^1$ para ${}^1C^4$ em carragenanas, e de ${}^1C^4$ para ${}^4C^1$ em agaranas (Figura 10) (CIANCIA *et al.*, 1993).

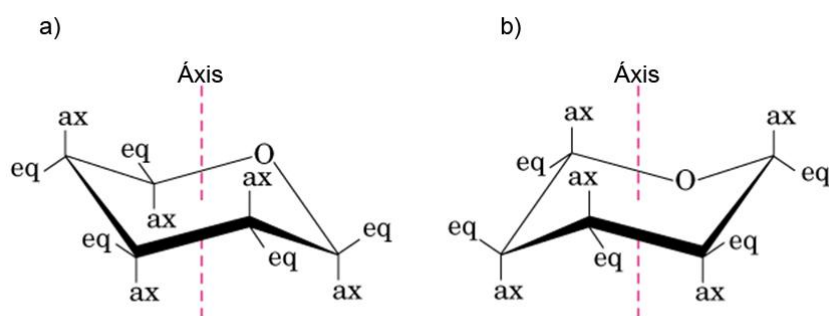


FIGURA 10 – CONFORMAÇÕES ${}^1C^4$ (a) E ${}^4C^1$ (b) DE UNIDADES HEXOPIRANOSÍDICAS

FONTE: NELSON E COX, 2011

As galactanas que apresentam unidades precursoras (α -L-galactopiranosose 6-sulfato e/ou α -L-galactopiranosose 2,6-dissulfato) podem, desta forma, ter essas unidades ciclizadas por meio do seguinte mecanismo: (1) primeiramente ocorre a ionização da hidroxila em C-3, o que gera repulsão entre o oxigênio equatorial em C-3 e o sulfato em C-6 (ou em C-2 e C-6) e, conseqüentemente, a desestabilização da conformação da unidade (${}^4C^1$ em carragenas ou ${}^1C^4$ em agaranas); (2) a mudança de conformação (para ${}^1C^4$ ou para ${}^4C^1$, em carragenas e agaranas, respectivamente) ocorre numa tentativa de posicionar os grupos em C-3 e C-6 (e C-2) o mais distante possível; nesta configuração o oxigênio do C-3 e o sulfato do C-6 estão em posição paralela axial; (3) esta posição favorece o ataque nucleofílico do oxigênio em C-3 ao C-6, ocorrendo uma reação de substituição nucleofílica bimolecular (S_N2), em que o grupo sulfato em C-6 é liberado num processo de eliminação seguido pela formação do anel 3,6-anidro, com a perda de uma molécula de água; (4) finalmente toda a molécula se reacomoda. Nesta reação, a força direcional é a ionização da hidroxila

em C-3 das unidades precursoras, que é proporcionada por temperatura e meio alcalino (CIANCIA *et al.*, 1993; NOSEDA; CERREZO, 1995).

A reação de ciclização somente se processará com as unidades de α -galactopiranosose sulfatadas em C-6 e com a hidroxila em C-3 livre, estando a velocidade desta reação sob controle da temperatura, concentração de álcali, do tempo de reação e da distribuição dos grupos sulfato nas unidades A do polissacacárideo (β -D-galactopiranosose) (CIANCIA *et al.*, 1993; CIANCIA; MATULEWICZ; CERREZO, 1997; NOSEDA ; CERREZO, 1995).

Em laboratório o tratamento alcalino pode ser utilizado para auxiliar a caracterização estrutural das galactanas. Neste contexto, este procedimento pode ser utilizado para a quantificação de unidades precursoras na molécula nativa, bem como pode sugerir a presença de substituição por grupos sulfato em diferentes posições, os quais podem influenciar a velocidade de ciclização. Além disso, as galactanas sulfatadas submetidas à reação de ciclização, pelo fato de serem estruturas mais repetitivas, apresentam espectros de RMN menos complexos, e estes podem ser utilizados para auxiliar nos assinalamentos dos espectros de RMN da galactana nativa.

Estudos prévios têm demonstrado que a reação de ciclização nas galactanas apresenta uma cinética reacional de pseudo-primeira ordem (CIANCIA *et al.*, 1993). Esta reação, tanto a nível industrial quanto a nível laboratorial, deve ser realizada em condições adequadas de, por exemplo, temperatura e tempo. As condições experimentais a serem utilizadas devem visar a obtenção do polímero com a maior percentagem de unidades ciclizadas e com a menor degradação possível.

Como exemplo do efeito dos grupos sulfato sobre a velocidade de ciclização, pode-se citar as carragenanas da família *lambda* (unidades A sulfatadas em C-2) as quais apresentam uma velocidade de ciclização menor do que as carragenanas da família *kappa* (unidades A sulfatadas em C-4). As *lambda*-carragenanas apresentam grupos sulfato ao redor da hidroxila livre em C-3 das unidades de α -D-galactopiranosose. Tais grupos esterificam o C-2 das unidades A e B e, devido à concentração de cargas negativas que esses grupos sulfato promovem ao redor da hidroxila em C-3, esta última fica “protegida” da ionização. Consequentemente, o processo de ciclização é retardado, uma vez que esta ionização é a força dirigente reacional. (CIANCIA *et al.*, 1993; NOSEDA; CERREZO, 1995). O principal fator que

contribui para este efeito é 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 11).

O padrão de sulfatação observado nas carragenanas da família *kappa* promove um efeito contrário ao observado nas *lambda*-carragenanas. Nas *mu/nu*-carragenanas (família *kappa*) os grupos sulfato que esterificam o C-4 das unidades A podem interagir com os grupos sulfato que esterificam os C-2 e C-6 presentes na unidade B (Figura 12). A repulsão gerada entre esses grupos das unidades A e das unidades B favorece a alteração conformacional destas últimas (${}^1C^4$ para ${}^4C^1$ e vice-versa, Figura 10) e, conseqüentemente, a ciclização do açúcar (NOSEDA; CERREZO, 1995).

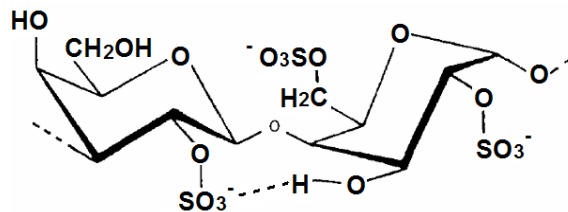


FIGURA 11 – INTERAÇÃO DO GRUPO SULFATO EM C-2 DE β -D-GALACTOSE 2-SULFATO E A HIDROXILA EM C-3 DE α -D-GALACTOSE 2,6-SULFATO EM *LAMBDA*-CARRAGENANA.

FONTE: CIANCIA *et al*, 1993.

Tendo em vista o efeito dos grupos sulfato em diferentes posições das unidades A, Nosedá *et al.*, (2000) estudaram a reação de ciclização com porfirinas, as quais apresentam grupos sulfato exclusivamente em C-6 das unidades B (Figura 4). Como resultado desse estudo, foi obtido para a velocidade de ciclização um valor intermediário entre os de *lambda*- e de *mu/nu*-carragenana.

Estes dados, em conjunto, demonstram que a velocidade da reação de ciclização não é dependente da enantiomericidade da unidade de α -galactopiranosose, mas sim da posição e distribuição dos grupos sulfato nas unidades de β -D-galactopiranosose (NOSEDA *et al.*, 2000).

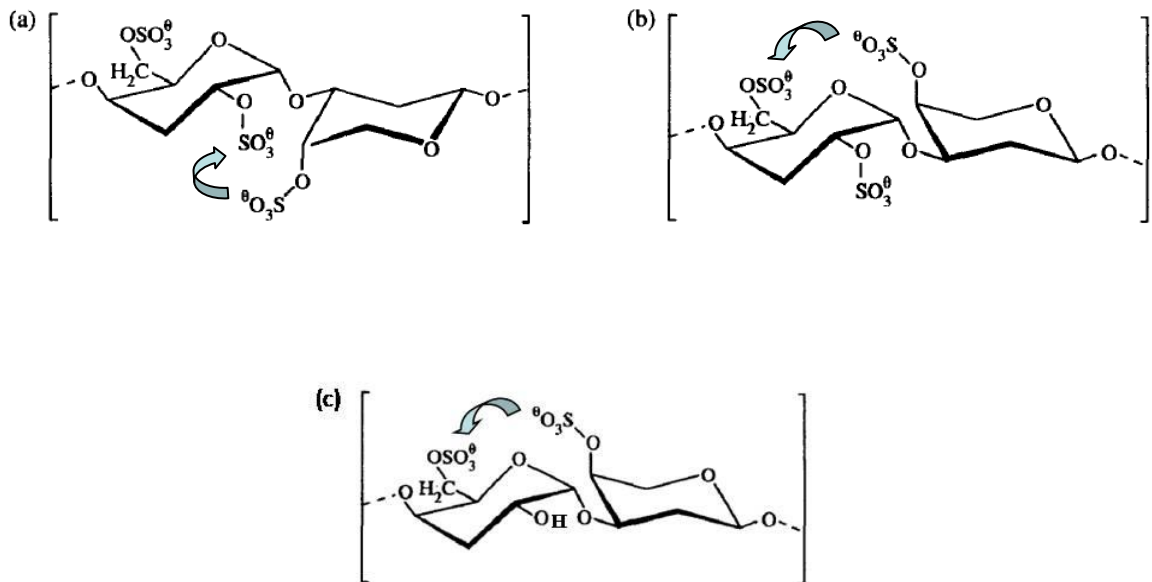


FIGURA 12 – INTERAÇÃO ENTRE O SULFATO EM C-4 DE β -D-GALACTOSE 4-SULFATO COM O SULFATO EM C-2 (a) OU C-6 (b) DE α -D-GALACTOSE EM *NU*-CARRAGENANAS E COM O SULFATO EM C-6 DE α -D-GALACTOSE EM *MU*-CARRAGENANAS (c).

FONTE: MODIFICADA DE NOSEDA *et al.*, 2000

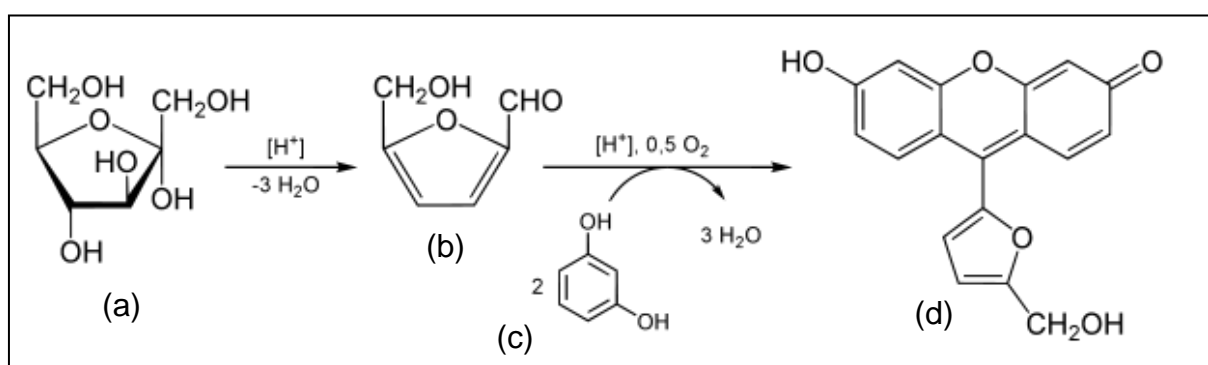
O estudo da cinética química da reação de ciclização visa buscar as melhores condições para a obtenção de ficocolóides com maior poder geleificante através do tratamento alcalino. Além disso, as cinéticas reacionais de polissacarídeos modelos (*kappa*-, *nu*- e *lambda*-carragenana; porfirana) podem ser utilizadas em estudos comparativos com outros polissacarídeos mais complexos e, desta forma, fornecer informações importantes sobre as díades precursoras presentes em polímeros de estrutura química complexa.

2.6.2 Quantificação das unidades de 3,6-anidro- α -galactose por método colorimétrico

O método fotocolorimétrico utilizado laboratorialmente para a quantificação do teor de 3,6-anidro- α -galactose é o método do resorcinol (YAPHE, 1960; YAPHE; ARSENAULT, 1965). Nesta metodologia, o açúcar anidro é detectado através do teste de Seliwanoff, que é utilizado para distinguir aldoses de cetoses.

No teste de Seliwanoff (Figura 13), as aldoses são diferenciadas das cetoses por meio de seus grupos funcionais aldeído e cetona, respectivamente. Este teste é baseado no fato que, quando aquecidas em meio ácido, as cetoses desidratam muito mais rapidamente do que as aldoses, formando o 5-hidroximetil-2-furaldeído (HMF), que reage com o resorsinol e forma um produto de coloração vermelho cereja; esse produto apresenta a absorbância máxima em 555nm.

As unidades de 3,6-anidrogactose são altamente sensíveis a ácidos (HAWORTH; JACKSON; SMITH, 1940). A alta sensibilidade das ligações glicosídicas envolvendo o C-1 das unidades anidrogactosídicas faz com que essas sejam rapidamente hidrolisadas sob condições relativamente brandas, originando o 3,6-anidro-*aldeído*-galactose; este produto aldeídico sofre uma série de desidratações e, com o rearranjo do anel, dá origem ao HMF. Desta forma, o 3,6-anidro-*aldeído*-galactose, assim como as cetoses, dá uma resposta positiva mediante o teste de Seliwanoff (O'NEIL, 1955).



Desidratação da cetose (a) em meio ácido para a formação do HMF (b), que reage com compostos fenólicos, nesse caso o resorcinol (c), para originar o produto com coloração avermelhada (d).

FIGURA 13 – TESTE DE SELIWANOFF

FONTE: <http://www.chimie-analytique.wikibis.com>

2.7 GALACTANAS SULFATADAS: IMPORTÂNCIA BIOLÓGICA

Os diferentes tipos de polissacarídeos sulfatados isolados de algas marinhas apresentam uma grande variabilidade de atividades biológicas. Como alguns exemplos podem ser citadas as atividades antiviral (DUARTE *et al.*, 2004; TALARICO *et al.*, 2005; TALARICO; DAMONTE, 2007; CASSOLATO *et al.*, 2008; HARDEN *et al.*, 2009; TALARICO *et al.*, 2011) e a potente ação anticoagulante e antitrombótica (ROCHA *et al.*, 2005).

Entre as principais atividades biológicas desempenhadas pelas galactanas sulfatadas está a antiviral, visto que para muitos destes polímeros têm sido descritas potentes atividades contra diversos vírus envelopados, como os vírus herpes simplex (HSV – *Herpes simplex virus*), vírus da imunodeficiência humana (HIV – *human immunodeficiency virus*), citomegalovírus (HCMV - *human cytomegalovirus*), entre outros (DAMONTE; MATULEWICZ; CERESO, 2004).

Durante as últimas décadas, houve grande aumento do número de agentes antivirais aprovados para uso clínico (DE CLERCQ, 2002). No entanto, nem sempre estes compostos são eficazes ou bem tolerados e, além disso, é muito rápido o aparecimento de linhagens de vírus resistentes a esses quimioterápicos. Deste modo, há uma grande demanda por drogas antivirais com novos mecanismos de ação (CHATTOPADHYAY *et al.*, 2008).

O efeito inibitório dos polissacarídeos sulfatados parece ser baseado principalmente na capacidade desses polímeros interferirem na etapa inicial da infecção viral: a interação do vírus com a célula (DAMONTE; MATULEWICZ; CERESO, 2004).

A face extracelular da membrana plasmática é extremamente rica em macromoléculas polianiónicas, que são sítios prontamente acessíveis para interagirem com proteínas que regulam diferentes funções, fisiológicas ou patológicas. Dentre os poliânions, a heparina, o heparan sulfato (HSPGs - *heparan sulfate proteoglycans*) e os glicosfingolípídeos (GSLs - *glycosphingolipids*) são amplamente distribuídos nos fluidos biológicos, na membrana celular e no interior da célula (URBINATI; CHIODELLI; RUSNATI, 2008).

O contato inicial entre os vírus envelopados e a célula hospedeira ocorre pela interação iônica entre regiões da glicoproteína viral carregadas positivamente e os

constituintes da superfície celular carregados negativamente, os poliânions. Os polissacarídeos sulfatados, devido à alta densidade de cargas negativas, são capazes de interagir com essas glicoproteínas virais e, conseqüentemente, bloqueiam a entrada do vírus na célula (CALLAHAN *et al.*, 1991).

Para o HSV, são descritas cinco glicoproteínas virais (gB, gC, gD, gH e gL) que são responsáveis pela seqüência de eventos requerida para a adsorção e entrada do vírus na célula. O primeiro passo é a ligação da gC e, em alguns casos também da gB, às glicosaminoglicanas presentes na superfície celular, preferencialmente ao heparan sulfato (HS) (Figura - 14) (WUDUNN; SPEAR, 1989; LYCKE *et al.*, 1991; SHIEH *et al.*, 1992).

Feyzi *et al.* (1997) demonstraram que a seqüência mínima necessária para a interação do HS com a glicoproteína gC do HSV-1 é $[\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-L}\text{-}(\text{}^1\text{C}_4)\text{-IdoA}_2\text{-OSO}_3\text{-}(1\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D}\text{-}(\text{}^4\text{C}_1)\text{-GlcNR6}'\text{-OSO}_3\text{-}(1\rightarrow)]$ com no mínimo 10-12 unidades repetitivas

Após a adsorção ao HS, para que ocorra a entrada do vírus na célula, gD se liga a um segundo conjunto de receptores ou co-receptores, que são conhecidos como mediadores para a entrada do herpes vírus (ou HVEMs – *Herpes virus entry mediators*). A interação entre gD e os HVEMs expõe um sítio de ligação para o heterodímero formado por gH e gL. Quando se ligam a gD, gH e gL passam a expor um sítio de fusão no heterodímero e também em gB (DAMONTE; MATULEWICZ; CERREZO, 2004).

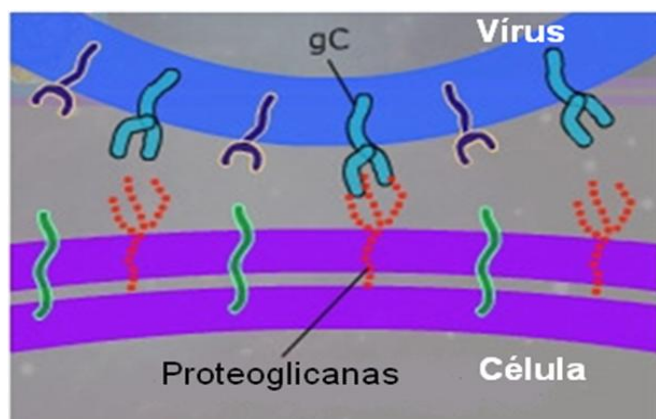


FIGURA 14 – ETAPA INICIAL DA INFECÇÃO DA CÉLULA PELO HSV.

FONTE: GONÇALVES, 2005

Vários estudos têm comprovado a atividade anti HSV-1 inerente a galactanas naturalmente sulfatadas extraídas de algas vermelhas. Carlucci *et al.* (1997), Duarte *et al.* (2001) e Duarte *et al.* (2004) demonstraram que a especificidade do posicionamento dos grupos sulfato nestas galactanas é diretamente relacionada ao nível de atividade antiviral.

As carragenanas da alga *Gigartina skottsbergii* (Gigartinales) foram testadas contra o vírus *Herpes simplex* (HSV) tipos 1 e 2 e revelaram uma inibição seletiva na replicação viral *in vitro*. A atividade antiviral foi correlacionada com as unidades de α -D-galactopiranosose 2,6-disulfato presentes na galactana. Possivelmente estas unidades promovem aos grupos sulfato do polissacarídeo uma disposição similar à desses mesmos grupos nas unidades de α -D-glucosamina 2,6-disulfato do heparan sulfato, que está presente na superfície celular. Além disso, esses polímeros apresentaram uma atividade anticoagulante muito baixa, mesmo em concentrações muito maiores do que a IC₅₀ da atividade antiviral. Essa excelente relação entre uma atividade antiviral eficaz acompanhada da perda da atividade anticoagulante faz desses polissacarídeos compostos muito promissores. Estas mesmas carragenanas, quando submetidas a tratamento alcalino, tiveram a atividade antiviral consideravelmente reduzida. Os autores correlacionam o grau de sulfatação, a posição dos grupos sulfato e o peso molecular dos polissacarídeos à atividade antiviral destas moléculas (CARLUCCI *et al.*, 1997).

Duarte *et al.* (2001) investigaram a atividade de agaranas sulfatadas obtidas de *Bostrychia montagnei* (Ceramiales) frente ao HSV-1 e ao HSV-2. As frações polissacarídicas B1, B-2 e B-3 (5.600-31.300 kDa, 11-16% de grupos sulfato) não apresentaram atividade frente às estirpes de vírus testadas. Já as frações B4, B5 e B-6 (34.000-43.700 kDa; 22,0-24% de grupos sulfato) apresentaram atividade somente quando adicionadas durante o período de adsorção do vírus. Os autores concluíram que os polissulfatos exercem um efeito de “blindagem” dos sítios da glicoproteína do envelope viral, que são carregados positivamente e necessários para a adsorção do vírus ao heparan sulfato presente na superfície da célula. Este mecanismo geral de atuação explica a ampla atividade antiviral dos polissulfatos contra os vírus envelopados (WITVROUW; DeCLERQ, 1997). O padrão de sulfatação das frações polissacarídicas testadas era nos C-6 e C-4 das unidades A e no C-3 das unidades B. Os autores afirmam que a atividade pode estar

correlacionada com o peso molecular desses polissacarídeos e que o padrão de sulfatação não foi estritamente necessário para as frações de galactanas B1-B3, visto que não apresentaram atividade. Deste modo, a atividade diferenciada exercida pelos grupos B1-B3 e B4-B6 pode estar correlacionada com a distribuição desses grupos sulfato na cadeia do polissacarídeo e, conseqüentemente, com o efeito conformacional na cadeia como um todo. Foi observada atividade antiviral durante o período de adsorção do vírus às células, porém apenas com as galactanas mais sulfatadas (22,0-24,0% de NaSO₃) e com maior peso molecular (34.000-43.700 Da). Os autores destacam que o padrão de sulfatação observado não é estritamente necessário para o bloqueio da infecção viral, visto que as galactanas com o mesmo padrão de substituições por sulfato, baixo peso molecular e baixo grau de sulfatação não apresentam atividade. Deste modo, a atividade diferencial dos extratos pode estar correlacionada com a distribuição dos grupos sulfato e, conseqüentemente, com a conformação estrutural das cadeias polissacarídicas (DUARTE *et al.*, 2001).

Agarans 2-O- (unidade A) e 6-O-sulfatadas (unidade B), obtidas da alga vermelha *Acanthophora spicifera* (Ceramiales), apresentaram alta atividade anti-HSV-1 e HSV-2. O padrão de sulfatação apresentado por estes polissacarídeos permite às suas unidades dissacarídicas assumir uma conformação equivalente à sequência mínima do heparan sulfato. Desta forma, a interação polissacarídeo-vírus impede a primeira etapa da infecção viral, ou seja, a interação vírus-célula (DUARTE *et al.*, 2004).

O padrão médio de sulfatação das agarans de *A. spicifera*, [\rightarrow 3)- β -D-(⁴C₁)-Galp2-OSO₃-(1 \rightarrow 4- α -L-(¹C₄)-Galp6'-OSO₃-(1 \rightarrow)], é similar à sequência mínima do HS, podendo ser este o fator responsável pela formação do complexo polissacarídeo-gC (DUARTE *et al.*, 2004).

A utilização de polissacarídeos sulfatados apresenta inúmeras vantagens sobre as outras classes de antivirais, visto que estes polímeros apresentam o custo de produção relativamente baixo, um amplo espectro de atuação, baixa citotoxicidade, segurança e boa aceitabilidade pelo paciente. Essas características fazem com que esses polissacarídeos sulfatados sejam, em um futuro próximo, candidatos promissores a serem a droga de escolha para o tratamento de infecções

virais. Ressalta-se que muitos estudos de triagem clínica ainda devem ser realizados com esses compostos (WIJESEKARA; PANGESTUTI; KIM, 2011).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 COLETA E PROCESSAMENTO

Os exemplares da alga vermelha *Palisada flagellifera* foram coletados na praia da Pedra do Xaréu, no litoral do estado de Pernambuco (fevereiro de 2001). Os exemplares das algas *Laurencia filiformis* e *Laurencia aldingensis* foram coletados na praia Ponta da Fortaleza, cidade de Ubatuba – SP (junho de 2007) e em Ponta dos Castelhanos, cidade de Anchieta – SP (junho de 2007), respectivamente. Todas as espécies foram classificadas pela Dra. Mutue Toyota Fujii, do Instituto de Botânica, seção de ficologia, São Paulo.

Os exemplares das três espécies foram lavados com água doce, examinados e selecionados em lupa, secos em estufa a 35-40 °C. Após a secagem, *P. flagellifera* foi moída em moinho de faca (WILEY MILL), resultando em 6,3g de alga seca e moída. As algas *L. filiformis* e *L. aldingensis* tiveram sua moagem em liquidificador, resultando em 8,2g e 8,0g de pó seco, respectivamente. As algas secas e moídas, posteriormente, foram submetidas aos processos de extração.

3.2 POSICIONAMENTO SISTEMÁTICO DAS ESPÉCIES ESTUDADAS

Divisão: Rhodophyta

Classe: Rhodophyceae

Ordem: Ceramiales

Família: Rhodomelaceae

Gênero: *Palisada*

Espécie: *P. flagellifera* (J. Agardh) K.W. Nam.

Gênero: *Laurencia*

Espécie: *L. filiformis* (C. Agardh) Montagne.

Espécie: *L. aldingensis* Saito & Womersley.

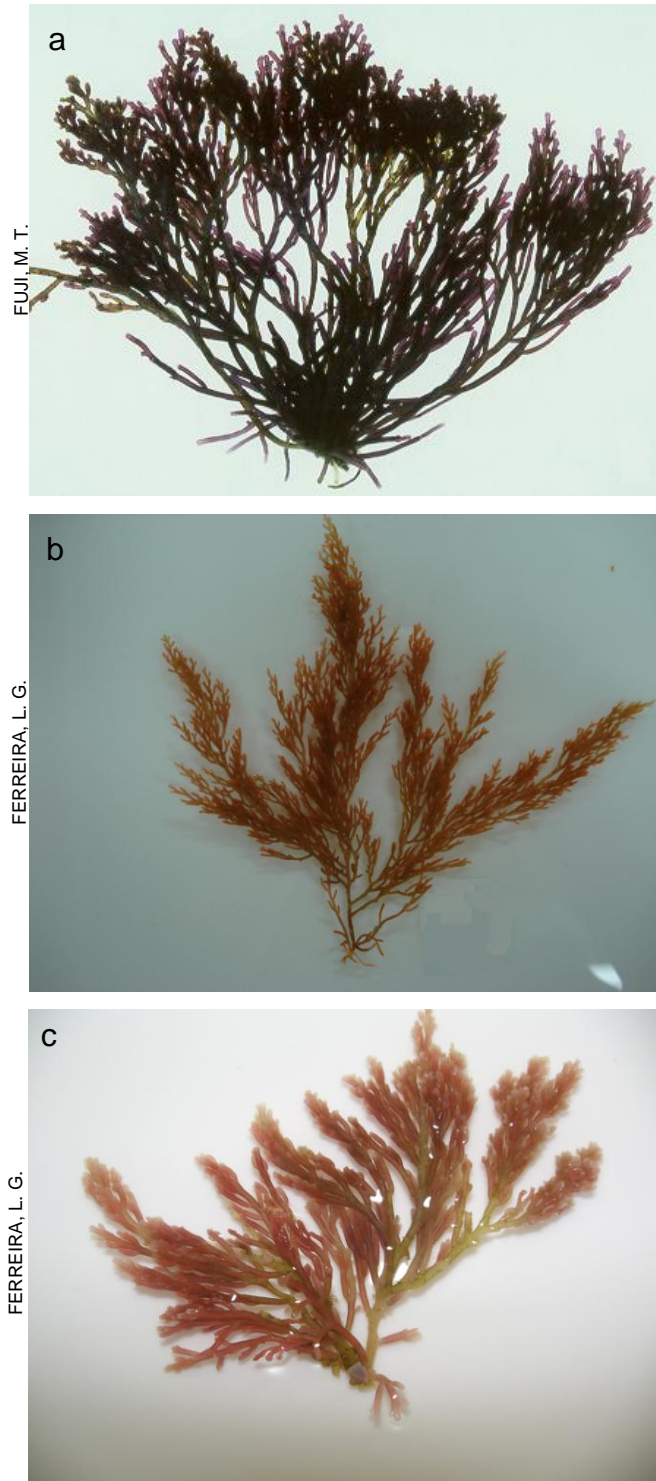


FIGURA 15 - FOTOGRAFIAS DAS ESPÉCIES ESTUDADAS: *P. flagellifera* (a), *Laurencia aldingensis* (b) e *Laurencia filiformis* (c).

3.3 REGISTRO DAS ESPÉCIES ESTUDADAS

Exemplares das espécies estudadas foram depositados no Herbário do Departamento de Botânica da Universidade Federal do Paraná – UFPR.

As espécies foram registradas com os seguintes números de tombo:

- *P. flagellifera* : 55549
- *L. filiformis*: 60127
- *L. aldingensis*: 60128

3.4 EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS

As algas secas e moídas foram, separadamente, submetidas à extração aquosa (1,0% p/v) sob agitação mecânica, a 25 °C por 3 horas. Os extratos obtidos foram centrifugados a 8.000 rpm por 20 minutos, 4 °C. Aos sobrenadantes foram adicionados 3 volumes de etanol. Após centrifugação (8.000 rpm, 20 min., 4°C), os precipitados foram ressolubilizados em água, dialisados contra água destilada e liofilizados.

As algas residuais das extrações a 25 °C foram submetidas a extrações aquosas (1,0% p/v) sob agitação mecânica, a 80 °C por 3 horas. Os extratos obtidos das extrações a 80 °C foram tratados de maneira idêntica à descrita para os extratos obtidos a 25 °C.

Os processos de extração a 25 °C e os procedimentos para obtenção dos polissacarídeos solúveis em água a 80 °C foram realizados três vezes em cada temperatura.

3.5 MÉTODOS ANALÍTICOS GERAIS

3.5.1 Determinação do teor de açúcar total

As dosagens de açúcares totais foram realizadas pelo método do fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS *et al.*, 1956) e foi utilizada galactose para construção de curva padrão.

3.5.2 Determinação do teor de proteínas

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

3.5.3 Determinação do teor de sulfato

O teor de sulfato foi determinado pelo método de Dodgson (1961), após hidrólise das amostras com HCl 1,0M, 5 horas, 105 °C. Foi utilizada uma solução de sulfato de sódio para construção de curva padrão.

3.5.4 Determinação da rotação específica

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

3.5.5 Reagentes

Os reagentes utilizados apresentam grau de pureza P.A.

3.6 TRATAMENTO COM KCL 2,0 M

Os polissacarídeos obtidos das extrações aquosas a 25 °C e 80 °C foram ressolubilizados em água (0,25% p/v) e em seguida foi adicionado KCl sólido de modo a formar solução 2,0M. Após agitação por 3 horas, as soluções permaneceram em repouso por 16 horas a 4 °C e em seguida foram centrifugadas (8.000 rpm, 20 min., 4 °C). Os respectivos sobrenadantes foram dialisados contra água destilada e liofilizados. Os precipitados, após ressolubilização em água destilada, foram também dialisados contra água destilada e liofilizados.

3.7 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

3.7.1 Cromatografia de troca iônica em DEAE-Sephacel

As frações polissacarídicas de maior rendimento foram fracionadas por cromatografia de troca iônica em coluna contendo DEAE-Sephacel, utilizando-se eluição por etapas: 1) água e 2) solução de NaCl em concentrações crescentes de 0,1 a 2,0M.

Neste método cromatográfico as eluições foram monitoradas pelo teste do fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS *et al.*, 1956).

3.7.2 Análise de Massa Molecular por HPSEC

As análises de homogeneidade e determinação da massa molecular média (M_w) das frações polissacarídicas foram realizadas por cromatografia de exclusão

estérica de alta pressão (HPSEC) WATERS, equipado com um detector de índice de refração diferencial WATERS modelo 2410 e com detector de espalhamento de luz em multiângulos (MALLS) WYATT TECHNOLOGY modelo DAWN DSP com 18 detectores dispostos ao redor da fotocélula em diferentes ângulos. Para uma melhor separação foram utilizadas 4 colunas de gel filtração WATERS, modelo ULTRAHYDROGEL 2000, 500, 250 e 100, com limites de exclusão de 7×10^6 , 4×10^5 , 8×10^4 e 5×10^3 Dalton (Da), respectivamente, conectadas em série. A fase móvel utilizada foi uma solução de nitrito de sódio (NaNO_2 0,1M) contendo azida de sódio (NaN_3 $0,2 \text{g.L}^{-1}$), a 20°C .

Para análise de homogeneidade foram preparadas soluções de amostra 1mg.mL^{-1} em NaNO_2 0,1M. Essas soluções foram filtradas em membranas Millipore (acetato de celulose) com diâmetro de poro de $0,22 \mu\text{m}$. A análise foi realizada utilizando-se injeções de $100 \mu\text{L}$ de solução no cromatógrafo, com fluxo de $0,6 \text{mL min}^{-1}$. Para determinação da massa molecular ponderal média (M_w) foi utilizado o valor de dn/dc obtido juntamente à análise de homogeneidade.

Para a determinação da variação do índice de refração com relação à concentração (dn/dc), foram preparadas soluções de 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1 mg das amostras em 1 ml de NaNO_2 0,1M e NaN_3 $0,2 \text{g.L}^{-1}$. As amostras foram filtradas em membranas Millipore $0,45 \mu\text{m}$ e armazenadas em frascos viais rigorosamente limpos. As análises foram realizadas utilizando-se injeções de $100 \mu\text{L}$ de cada solução no cromatógrafo.

Foi utilizado o programa ASTRA (WYATT TECHNOLOGY) para análise dos dados obtidos. Para cada amostra pode se efetuar uma medida do espalhamento do feixe luminoso em função da concentração do polímero e em função do ângulo. A relação que permite calcular M_w é:

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

onde

$$K = (2\pi^2 n^2 / \lambda^4 n_0^4) / (dn/dc)^2$$

n = índice de refração do solvente no comprimento de onda λ_0

λ_0 = comprimento de onda da luz incidente

N = número de Avogadro

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

c = concentração do polímero

θ = ângulo do feixe de luz espalhado

A_2 = segundo coeficiente virial

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

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

R_θ = fator de Rayleigh, calculado através da seguinte equação

$$R_\theta = \frac{G_\theta \cdot D}{G_0 \cdot \sigma' \cdot 1'}$$

sendo

G_θ = intensidade relativa correspondente ao feixe espalhado

G_0 = intensidade relativa correspondente ao feixe incidente,

D, σ' e $1'$ = constantes do aparelho.

3.7.3 Cromatografia Gasosa acoplada à Espectroscopia de Massa (CG-EM)

As análises de cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa foram realizadas em um cromatógrafo VARIAN 3800, conectado a um espectrômetro modelo Varian Saturn 2000R (tipo *ion trap*), utilizando He como gás carreador a um fluxo de 1 mL.min⁻¹. Foi utilizada coluna capilar (30 m x 0.25 mm i.d.) modelo DB-225 (J&W), aquecida a 50 °C durante a injeção e programada para um aumento de temperatura de 40 °C.min⁻¹ até atingir 215 °C (temperatura constante) para análise quantitativa dos acetatos de alditol e dos derivados parcialmente metilados, também na forma de acetatos de alditol. Para distinguir entre os derivados metilados que são co-eluídos por CG-EM, foi utilizado uma segunda coluna (30 m x 0.25 mm i.d.) modelo DB-23 (J&W) Aquecida a 100 °C durante a

injection e com programação de aumento da temperatura de $5\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ até $180\text{ }^{\circ}\text{C}$ e então de $20\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ até $215\text{ }^{\circ}\text{C}$.

As áreas dos picos de interesse foram determinadas por integração utilizando o software Varian MS data review. Os espectros de massa foram obtidos por impacto de elétrons a 70 eV , repetidamente a cada $1/8$ de segundo, abrangendo fragmentos com relação massa/carga (m/z) variando de 40 a 300. Este método foi utilizado para quantificação de acetatos de alditóis (SLONEKER, 1972), sendo identificados por meio de seus tempos de retenção e perfis característicos de fragmentação por impacto de elétrons comparados com padrões descritos na literatura (JANSSON *et al.*, 1976; CARPITA; SHEA, 1989).

3.8 HIDRÓLISE REDUTIVA TOTAL

A hidrólise redutiva dos polissacarídeos foi realizada utilizando uma combinação dos métodos de Stevenson e Furneaux (1991) e de Jol *et al.*, (1999). O processo hidrolítico foi realizado em duas etapas:

1) Na primeira, 1 mg do polissacarídeo foi solubilizado em água destilada ($50\text{ }\mu\text{L}$) e, logo em seguida, foi adicionado $100\text{ }\mu\text{L}$ de uma solução $80\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de MMB (complexo borano 4-metil-morfolina), que é um agente redutor que possui estabilidade em meio reacional ácido. Sequencialmente, $100\text{ }\mu\text{L}$ de ácido trifluoracético (TFA) $6,0\text{M}$ foi adicionado, atingindo a concentração final de $2,4\text{M}$, e a hidrólise foi realizada a $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 30 minutos. Após atingir a temperatura ambiente, $100\text{ }\mu\text{L}$ da solução de MMB ($80\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) foi adicionado e a amostra foi concentrada, a $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ utilizando nitrogênio gasoso ($\text{N}_{2(\text{g})}$), até atingir a consistência de xarope. Essa primeira etapa tem a finalidade de hidrolisar e reduzir os pontos da cadeia polissacarídica que apresentam unidades de 3,6-anidro- α -L-galactopiranosose, protegendo-as da degradação em meio ácido.

2) Na segunda etapa foi adicionado $100\text{ }\mu\text{L}$ da solução de MMB ($80\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) e $100\text{ }\mu\text{L}$ de TFA $4,0\text{M}$, atingindo a concentração final de $\sim 2,0\text{M}$; a hidrólise foi realizada à temperatura de $120\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 60 minutos. De maneira semelhante à primeira etapa,

100 μL da solução de MMB ($80\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) foi adicionada e a amostra foi evaporada a $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ utilizando nitrogênio gasoso ($\text{N}_{2(\text{g})}$), mas desta vez a solução foi concentrada o máximo possível (até a secura). Nesta segunda hidrólise, ocorre a quebra das ligações glicosídicas envolvendo as demais unidades constituintes do polissacarídeo, as quais por sua vez foram também reduzidas.

Logo após, os monossacarídeos reduzidos foram acetilados (Anidrido acético/TFA concentrado (2:1) a $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 15 min.) e analisados na forma de acetatos de alditóis por CG-EM (Cromatografia Gasosa-Espectrometria de Massa).

3.9 METILAÇÃO

O processo de metilação do polissacarídeo na forma de sal de trietilamônio foi conduzido de acordo com o método de Ciucanu e Kerek (1984). Após solubilização em DMSO (1 mL para cada 15 mg de polissacarídeo) foi adicionado NaOH pulverizado (~ 30 mg) e a mistura foi mantida sob agitação vigorosa (em vórtex) por 30 minutos. Em seguida, foi adicionado iodometano (0,2 mL) e mantida a agitação por mais 30 minutos. Este processo de adição de NaOH e iodometano foi repetido por três vezes, completando-se a primeira etapa de metilação. As frações foram neutralizadas (ácido acético 50%), dialisadas contra água destilada, liofilizadas e hidrolisadas de acordo com o método descrito no item 3.8, que é uma combinação das metodologias descritas por Stevenson e Furneaux (1991) e por Jol *et al.*, (1998). Em seguida, as amostras foram analisadas por CG-EM, na forma de acetatos de alditóis parcialmente metiladas.

O processo descrito acima foi realizado por mais duas vezes seqüenciais, completando-se assim, as três etapas de metilação.

3.10 DESSULFATAÇÃO POR TRATAMENTO SOLVOLÍTICO

3.10.1 Preparo do Sal de Piridônio

O processo de solvólise foi conduzido com os polissacarídeos na forma de sal de piridônio (STEVENSON; FURNEAUX, 1991). Para a formação deste sal, as frações foram solubilizadas em água e a elas foi adicionada resina catiônica DOWEX 50x8 na forma H⁺, sob agitação magnética à temperatura ambiente por 30 minutos. Após este procedimento, o pH do sobrenadante se apresenta entre 1-2. Após filtração sob pressão reduzida, o eluído foi neutralizado com piridina até pH 7,0 e liofilizado.

3.10.2 Solvólise

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

A solução resultante foi mantida a 100 °C durante 4 horas. Após o resfriamento, as frações solvolizadas foram submetidas à diálise exaustiva contra água destilada e liofilizadas. Os polissacarídeos dessulfatados foram submetidos à metilação conforme descrito no item 3.9.

3.11 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE ÁCIDO PIRÚVICO

A determinação do teor de ácido pirúvico foi realizada de acordo com o método descrito por Troyano *et al.* (1996), utilizando-se a hidrólise ácida (TFA 1M) descrita por Verhoef *et al.*, (2003). Em seguida foi realizada análise direta por

cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Brevemente, o polissacarídeo (1 mg) foi hidrolisado em TFA 1M, 6 horas, a 120 °C. O produto de hidrólise foi filtrado em membrana Millipore µm Millex GV (0,22 µm) e analisado por CLAE a 65 °C em cromatógrafo Shimadzu Scientific Instruments Inc. modelo CLASS LC10 com detector SPD 10A a 210 nm. A separação por CLAE foi realizada com uma coluna resistente a ácido Phenomenex Rezex 8% H e uma pré-coluna Phenomenex Carbo H⁺. Foi utilizado solução aquosa de H₂SO₄ (0,05% v/v) a um fluxo de 0,5 mL.min⁻¹ como fase móvel. Os teores de ácido pirúvico nas frações polissacarídicas foram calculados utilizando curva-padrão de ácido pirúvico (Sigma-Aldrich) no intervalo de 10-260 µg, sendo plotados os valores das quantidades de ácido pirúvico (µg) no eixo x e as correspondentes áreas obtidas nos cromatogramas no eixo y. O resultado foi expresso como a percentagem de acetal de ácido pirúvico presente na amostra (w/w).

3.12 DETERMINAÇÃO DA ENANTIOMERICIDADE

A determinação da configuração enantiomérica das unidades de galactose sem substituição presentes nos produtos de metilação da galactana nativa FCS-3 foi determinada pelo método de aminação redutiva com (S)-aminopropanol (CASES; CERZO; STORTZ, 1995).

A configuração absoluta do derivado 2,6-Me₂-galactose, presente na galactana dessulfatada (FCS-3D) foi determinada através de aminação redutiva com (S)-α-metilbenzilamina (ERREA; KOLENDER; MATULEWICZ, 2001).

Para a realização dos experimentos, os produtos de metilação foram hidrolizados (TFA 1M, 120 °C, 1 hora (ERREA; KOLENDER; MATULEWICZ, 2001) e derivatizados com as respectivas aminas quirais.

Como padrões foram utilizados D-galactose (MERCK) e 2,6-Me₂-D-galactose, sendo este último obtido através da metilação (CIUCANU; KEREK, 1984) seguida de hidrólise (TFA 1M, 120 °C, 1 hora (ERREA; KOLENDER; MATULEWICZ, 2001) do polissacarídeo *kappa*-carragenana, obtido da alga vermelha *Kapaphycus alvarezzi*.

Os padrões de açúcares da série D foram derivatizados com as respectivas aminas quirais, sendo uma alíquota derivatizada com a mistura racêmica da amina ((R) e (S)) e outra alíquota derivatizada apenas com a (S)-amina. Este procedimento foi utilizado porque o derivado do açúcar D (padrão) com a (S)-amina fornecerá o tempo de retenção do enantiômero D- do açúcar presente na amostra, já o derivado do açúcar D (padrão) com a (R)-amina fornecerá o tempo de retenção do enantiômero L do açúcar presente na amostra, quando este último é derivatizado com a amina (S).

Após acetilação (anidrido acético/TFA concentrado (2:1) a 65 °C por 15 min.), os produtos de aminação redutiva foram analisados por CG-EM em cromatógrafo Varian 4000 conectado a espectrômetro do tipo *ion-trap* Varian Saturn 2000R, utilizando He como gás carreador a um fluxo de 1 mL.min⁻¹. Foi utilizada uma coluna capilar (30 m x 0.25 mm i.d.) modelo VF1-MS (Varian), aquecida a 50 °C durante a injeção e programada para aumentar 7.5 °C.min⁻¹ até 200 °C (temperatura constante) foi utilizada para a separação dos produtos de aminação redutiva.

As análises dos cromatogramas foram realizadas da seguinte forma:

- 1) Análise do tempo de retenção do padrão de açúcar da série D derivatizado com a (S)-amina, denominado padrão DS;
- 2) Localização do tempo de retenção do padrão DS obtido da derivatização do açúcar da série D com a mistura racêmica da amina ((R) e (S)), por exclusão determina-se o tempo de retenção do padrão DR.
- 3) Análise dos tempos de retenção dos derivados presentes nas amostras problemas que foram derivatizados com a (S)-amina.
- 4) Determinação da enantiomericidade dos derivados presentes na amostra problema através de comparação com os tempos de retenção dos padrões DS e DR, que por estereoisomericidade são correspondentes a LR e LS, respectivamente. Deste modo, os tempos de retenção dos padrões DS e DR equivalem aos tempos de retenção dos derivados DS e LS presentes na amostra problema.

3.13 TRATAMENTO ALCALINO

3.13.1 Tratamento alcalino: método analítico

A fração polissacarídica foi solubilizada em água destilada (0,2 g%) e reduzida com NaBH_4 (10% em relação ao peso do polissacarídeo) por 12 horas. Em seguida foi adicionado NaOH 3M de modo que a concentração final da solução fosse de NaOH 1M e, novamente, foi adicionado NaBH_4 (5% em relação ao peso do polissacarídeo) (CIANCIA *et al.*, 1993). Alíquotas de 0,75 mL desta solução foram separadas em viais que foram mantidos a 80°C em banho termostatizado. Os viais foram retirados um a um em intervalos regulares de tempo, resfriados em banho de gelo e neutralizados com HCl . Para cada uma destas soluções foi determinado o teor de 3,6-anidrogactose formado utilizando-se o método do resorcinol (como descrito no item 3.13.2).

3.13.2 Determinação do teor de 3,6-anidrogactose pelo método do resorcinol

A determinação do teor de 3,6-anidrogactose foi realizada pelo método do resorcinol, de acordo com Yaphe e Arsenault (1965). Segue abaixo a descrição do método.

Soluções necessárias:

- a) Foi preparada uma solução mãe de 1,1-dimetoxietano (acetal) a 0,81% (p/v). A solução para o trabalho se obteve pela diluição desta com água destilada (1:25). Esta solução é estável por um mês.
- b) A solução de resorcinol foi preparada dissolvendo este reagente (15 mg) em água destilada (10 mL). Esta solução, guardada em geladeira em frasco âmbar, pode ser conservada por uma semana.
- c) O reativo de resorcinol-ácido clorídrico foi preparado adicionando-se 100 mL de ácido clorídrico fumegante ($d= 1,19$, graduação analítica) sobre a solução

de resorcinol (9 mL) e agregando a esta mistura a solução de trabalho de acetal (1,0 mL). Este reativo é estável por 3 horas.

A realização da dosagem do teor do açúcar anidro foi realizada utilizando-se 0,6 mL de uma solução de polissacarídeo contendo entre 5 e 40 μg de 3,6-anidrogactose, contida em tubo de ensaio em banho de gelo. A esta solução foi adicionado 3,0 mL de reativo de resorcinol-ácido clorídrico. Após agitação, o tubo foi fechado com bola de vidro e foi mantido em banho de gelo durante alguns minutos. Em seguida, foi mantido à temperatura ambiente e, logo, aquecido a 80 °C durante 10 min. A amostra foi esfriada em banho de gelo e foi realizada a leitura da absorbância em 555 nm nos primeiros 15 min. Paralelamente, foi utilizado o branco com água destilada. A quantidade de 3,6-anidrogactose foi determinada por referência com a curva padrão de frutose e foi expressa como quantidade de componente anidro.

3.13.3 Reação de ciclização: Acompanhamento por RMN de ^1H

Outra metodologia utilizada neste trabalho para a determinação da melhor condição para a realização do tratamento alcalino foi o acompanhamento da formação das unidades de 3,6-anidrogactose por RMN de ^1H .

Neste método foi utilizada a integração das áreas da região α -anomérica para calcular a percentagem de unidades de 3,6-anidro- α -gactose em relação ao total de unidades B da gactana. Isso foi possível devido ao fato que a região α -anomérica apresenta sinais exclusivos, diferentemente da região β -anomérica, que apresenta sobreposição com a região do anel no espectro de RMN de ^1H .

3.13.4 Tratamento alcalino: método preparativo

As frações polissacarídicas foram solubilizadas em água destilada (0,2 g%), reduzidas com boroidreto de sódio (10% em relação à massa do polissacarídeo) e mantidas em repouso por 12 horas a 4 °C. Posteriormente, foi adicionado hidróxido

de sódio 3,0 M (obtendo concentração final de 1 M) e a mistura foi mantida em banho termostatizado a 80 °C até que o teor de 3,6-anidrogactose atingisse valor constante (CIANCIA *et al.*, 1993), como determinado previamente pelo método analítico ou de acompanhamento por RMN de ¹H. Após resfriamento, diálise e liofilização, as amostras foram submetidas à hidrólise reductiva (conforme item 3.8) e analisadas por CG-EM na forma de acetatos de alditóis. Estas amostras também foram submetidas a análises de RMN como descrito no item 3.15.

3.13.5 Estudo cinético da reação de ciclização

Os valores de absorvância obtidos no acompanhamento do tratamento alcalino pelo método analítico seguido de dosagem do teor de 3,6-anidrogactose (YAPHE; ARSENAULT, 1965) foram aplicados à fórmula:

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

onde:

A_0 = Absorvância no tempo zero da reação

A_∞ = Absorvância no tempo infinito

A_t = Absorvância em determinado tempo (CIANCIA *et al.*, 1993).

A diferença entre a absorvância inicial (A_0 - zero minuto) e a absorvância a tempo infinito (A_∞) indica a concentração inicial de unidades reacionais (unidades de α -galactopiranosose 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 reagiram. A partir desta equação é 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 seguinte equação:

$$t_{1/2} = \ln 2 / k.$$

3.14 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

As análises de ressonância magnética nuclear foram realizadas em espectrômetro da marca BRUKER, modelo DRX 400, série Avance, em tubos de 5 mm, sendo as amostras dissolvidas em água deuterada. Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em ppm utilizando como padrão interno acetona ($\delta=30,2$ e $2,224$ para ^{13}C e ^1H , respectivamente).

3.14.1 Técnicas de RMN Monodimensionais:

- a) Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13 (RMN de ^{13}C).
- b) Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13 DEPT 135 (Distortionless Enhancement by Polarization).
- c) Ressonância Magnética Nuclear de Próton (RMN – ^1H).

3.14.2. Técnicas de RMN Bidimensionais:

- A) COSY (“Correlation Spectroscopy”).
- B) HMBC (“Heteronuclear Multiple Bond Correlation”).
- C) HSQC (“Heteronuclear Single Quantum Coherence”).

3.15 TESTES DE ATIVIDADE ANTIVIRAL

Os estudos de atividade antiviral das galactanas sulfatadas utilizadas neste trabalho foram realizados no Departamento de Virologia, Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ (Rio de Janeiro) pelo grupo da Prof^a. Dr^a. Maria Teresa Villela Romanos, com a qual o grupo de Química de Carboidratos de algas marinhas da UFPR mantém colaboração

científica fornecendo amostras de polissacarídeos sulfatados e aliando os resultados de atividade antiviral com os de estrutura química fina.

3.15.1 Frações de polissacarídeos testadas

Para a determinação da atividade antiherpética foram utilizadas as seguintes frações:

- FCS-3: galactana sulfatada obtida da alga *P. flagellifera*;
- AHS e LHS: galactanas sulfatadas obtidas das algas *L. aldingensis* e *L. filiformis*, respectivamente;
- Q2-0,6: fucana sulfatada obtida da alga parda *Lobophora variegata*.

3.15.2 Células e Vírus

Foram utilizadas para os ensaios antivirais células Vero (linhagem de células de rim de macaco verde africano), crescidas em meio essencial mínimo (MEM) de Eagle suplementado com 2 mM de L-glutamina, 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de gentamicina, 2,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de fungizona e 10% de soro fetal bovino inativado por calor e mantido a 37 °C em atmosfera com 5% de CO_2 .

Os HSV-1 e HSV-2 foram isolados de lesões típicas nos lábios e na genitália, respectivamente, no Departamento de Virologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ. Os vírus foram submetidos à reação em cadeia da polimerase (PCR - *polymerase chain reaction*) utilizando primers específicos para a identificação (MARKOULATOS *et al.*, 2001).

3.15.3 Ensaio citotóxico

Para a determinação das concentrações máximas não tóxicas (CMNT), as monocamadas de células Vero foram expostas a diferentes concentrações dos polissacarídeos sulfatados (200; 100; 50; 25; 12,5; 6,25 e 3,15 mg.mL^{-1}) e incubadas a 37 °C em atmosfera com 5% de CO_2 por 48 horas. Após a incubação, alterações morfológicas das células tratadas com os polissacarídeos foram observadas em

microscópio óptico invertido (Leitz) e a MNTC foi determinada (WALKER *et al.*, 1971).

A viabilidade celular foi avaliada pelo método de BOREFREUND e PUERNER (1985), baseado na captação do vermelho neutro pelas células. Brevemente, as células foram incubadas na presença de 0,01% de solução de vermelho neutro por 3 horas a 37 °C em atmosfera com 5% de CO₂. Em seguida, o meio foi removido e as células foram fixadas com formalina 4% em tampão fosfato (pH = 7,2). O corante incorporado pelas células viáveis foi eluído por uma mistura de solventes composta por metanol:ácido acético:água (50:1:49), e a captação de coloração foi avaliada por densidade óptica (OD – *optical density*) do eluído a 490 nm em espectrofotômetro automático (ELx800TM—Bio-TeK Instruments, Inc.). A concentração citotóxica para 50% das células em cultura (CC₅₀) foi definida como a concentração capaz de reduzir em 50% a captação do corante.

3.15.4 Ensaio de atividade antiviral

O método utilizado para a avaliação da atividade antiviral das galactanas sulfatadas foi o de redução do título viral. Os títulos virais foram calculados utilizando o método estatístico de Reed e Muench (1938) e foram expressos como a dose infectante para 50% da cultura do tecido (DICT₅₀ – dose infectante para 50% da cultura de tecido) por ml.

Inicialmente foi feita uma triagem dos polissacarídeos sulfatados quanto à atividade antiviral; as monocamadas de células Vero foram tratadas com o polissacarídeo na CMNT e uma suspensão viral (100 DICT₅₀.mL⁻¹) foi adicionada a culturas de células tratadas e não tratadas com o polissacarídeo. Após 48h de incubação a 37 °C, em atmosfera com 5% de CO₂, o sobrenadante foi coletado e foram determinados os títulos virais em células tratadas e não tratadas. A atividade antiviral foi expressa como índice de inibição viral (IIV) e percentagem de inibição (PI).

O grau de atividade antiviral foi expresso em percentagem de inibição (PI). A PI foi obtida utilizando os valores do antilogaritmo de DICT₅₀ na seguinte fórmula (NISHIMURA *et al.*, 1977):

$$PI = [1 - (\text{antilog do valor do teste/antilog do valor do controle})] \times 100.$$

3.15.5 Cinética de inibição viral

A curva de dose-resposta foi estabelecida inicialmente com a CMNT, sendo os polissacarídeos sulfatados diluídos a partir dessa concentração e avaliados de acordo com a metodologia de redução do título viral em relação ao controle. O título viral encontrado em cada concentração foi plotado no gráfico da concentração dos polissacarídeos sulfatados x porcentagem de inibição (PI).

A partir desse gráfico, foi obtida a concentração efetiva para causar 50% de inibição (CE_{50}), que foi definida como a concentração requerida para alcançar 50% de proteção contra os efeitos citopáticos induzidos pelo vírus. O índice de seletividade (IS) foi determinado pela razão entre CC_{50} e CE_{50} , que corresponde à relação entre a concentração do polissacarídeo necessária para reduzir a viabilidade celular em 50% e a concentração de polissacarídeos capaz de causar 50% de inibição viral.

3.15.6 Mecanismos de ação

Para avaliar os mecanismos de ação foi utilizada a metodologia de titulação por plaqueamento. Brevemente, diluições logarítmicas (10^{-1} a 10^{-5}) da suspensão viral (Atividade virucida) e dos sobrenadantes (Atividade sobre o receptor celular e Atividade na Penetração Viral) foram inoculadas em placas contendo monocamada confluyente de células Vero. Depois de inoculadas, as células foram incubadas por 60 min. a 37°C em ambiente com 5% de CO_2 . Após incubação, foi adicionado carboximetil celulose a 1,5% em MEM e as células incubadas por 48 horas. Após esse período o meio foi retirado, as células lavadas com PBS pH 7,2, fixadas com formaldeído a 4% em PBS e coradas com cristal violeta a 1% em PBS. A porcentagem de inibição foi determinada comparando-se os títulos de vírus na presença (teste) e ausência (controle) das substâncias.

3.15.6.1 Atividade virucida

Uma amostra de $100\ \mu\text{L}$ de suspensão viral ($10^5\ \text{DICT}_{50}.\text{mL}^{-1}$) foi adicionada a $900\ \mu\text{L}$ de polissacarídeos na CMNT ou MEM-Eagle (controle). As amostras foram

incubadas a 37 °C por 2h. Em seguida, os títulos residuais dos vírus tratados ou não tratados foram determinados e a atividade virucida foi avaliada através do ensaio de redução de formação de placas de vírus e expresso como percentagem de inibição (PI).

3.15.6.2 Atividade sobre o receptor celular

Monocamadas de células Vero foram pré-tratadas com polissacarídeo na MNTC ou MEM-Eagle (controle) por 1h a 4°C. Em seguida, as células foram lavadas 3 vezes com MEM-Eagle, em seguida, inoculadas com 100 TCID₅₀.mL⁻¹ de suspensão viral e incubadas a 37 °C por 48h. Após o período de incubação, o sobrenadante foi coletado e os títulos virais das células tratadas e não tratadas foram determinados; a atividade antiviral foi avaliada pelo ensaio de redução de placa de vírus e expresso como percentagem de inibição (PI).

3.15.6.3 Atividade na Penetração Viral

Monocamadas de células Vero foram inoculadas com 100 DICT₅₀.mL⁻¹ de suspensões virais e incubadas por 1 hora a 4 °C. Após este período, as células foram lavadas com MEM-Eagle e, em seguida, foi adicionado o polissacarídeo na CMNT ou MEM-Eagle (controle). A temperatura das culturas foi imediatamente elevada para 37 °C e mantida por uma hora para permitir que ocorresse a penetração das partículas virais no interior das células. Após incubação, as monocamadas de células foram lavadas, MEM-Eagle fresco foi adicionado e as culturas foram incubadas a 37 °C por 48 horas. Após incubação, o sobrenadante foi coletado e os títulos virais das células tratadas e não tratadas foram determinados e a atividade antiviral foi avaliada pelo ensaio de redução da placa de vírus e expresso como percentagem de inibição (PI).

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. EXTRAÇÃO DAS GALACTANAS DAS ALGAS VERMELHAS *Palisada flagellifera*, *Laurencia filiformis* e *Laurencia aldingensis*

Os polissacarídeos das algas vermelhas *P. flagellifera*, *L. filiformis* e *L. aldingensis* foram obtidos a partir das algas secas e moídas (6,3, 8,2 e 8,0 g, respectivamente) por extração aquosa a 25 °C sob agitação mecânica por 3 horas. Após centrifugação, os polissacarídeos presentes nos sobrenadantes (cujos volumes foram reduzidos por evaporação a 60 °C sob pressão reduzida) foram precipitados com etanol (3 vol.), ressolubilizados em água destilada e liofilizados, originando as frações polissacarídicas obtidas por extração a 25 °C denominadas FC, LC e AC (13,0; 19,0 e 6,6% de rendimento, respectivamente, em relação às algas secas e moídas) (Esquema 1, Tabela 1).

Sequencialmente os respectivos resíduos foram submetidos à extração aquosa a quente (80 °C, 3 horas) sob agitação mecânica. Após centrifugação, os polissacarídeos solúveis foram precipitados (etanol 3 vol.) e tratados de maneira idêntica a descrita anteriormente para os polissacarídeos obtidos por extrações aquosas a 25 °C. As frações polissacarídicas obtidas a 80 °C denominadas FH, LH e AH apresentaram rendimentos de 15,0; 26,0 e 32,0%, respectivamente, em relação às algas secas e moídas (Esquema 1, Tabela 1).

4.2 TRATAMENTO COM KCl 2,0M DAS FRAÇÕES OBTIDAS POR EXTRAÇÃO AQUOSA A 25 °C E 80 °C

As frações polissacarídicas obtidas a 25 °C (FC, LC e AC) e a 80 °C (FH, LH e AH) foram submetidas ao tratamento com KCl 2,0M (Esquema 2).

Sendo assim, as frações FC, FH, LC, LH, AC e AH foram separadamente solubilizadas em água destilada (0,25 g%), e em seguida foi adicionado KCl para que se atingisse a concentração de 2,0M. Após 2 horas de agitação, repouso por 12 horas a 4 °C, centrifugação (8000 rpm, 20 minutos, 4 °C), diálise contra água

destilada e P. liofilização, foram originadas as respectivas frações precipitadas (FCP, FHP, LCP, LHP, ACP e AHP) e as frações solúveis (FCS, FHS, LCS, LHS, ACS e AHS) em KCl 2,0 M (Esquema 2, Tabela 2).

ESQUEMA 1 – EXTRAÇÃO AQUOSA A 25 °C E 80 °C DAS ALGAS *P. flagellifera* (F), *L. aldingensis* (A) e *L. filiformis* (L)

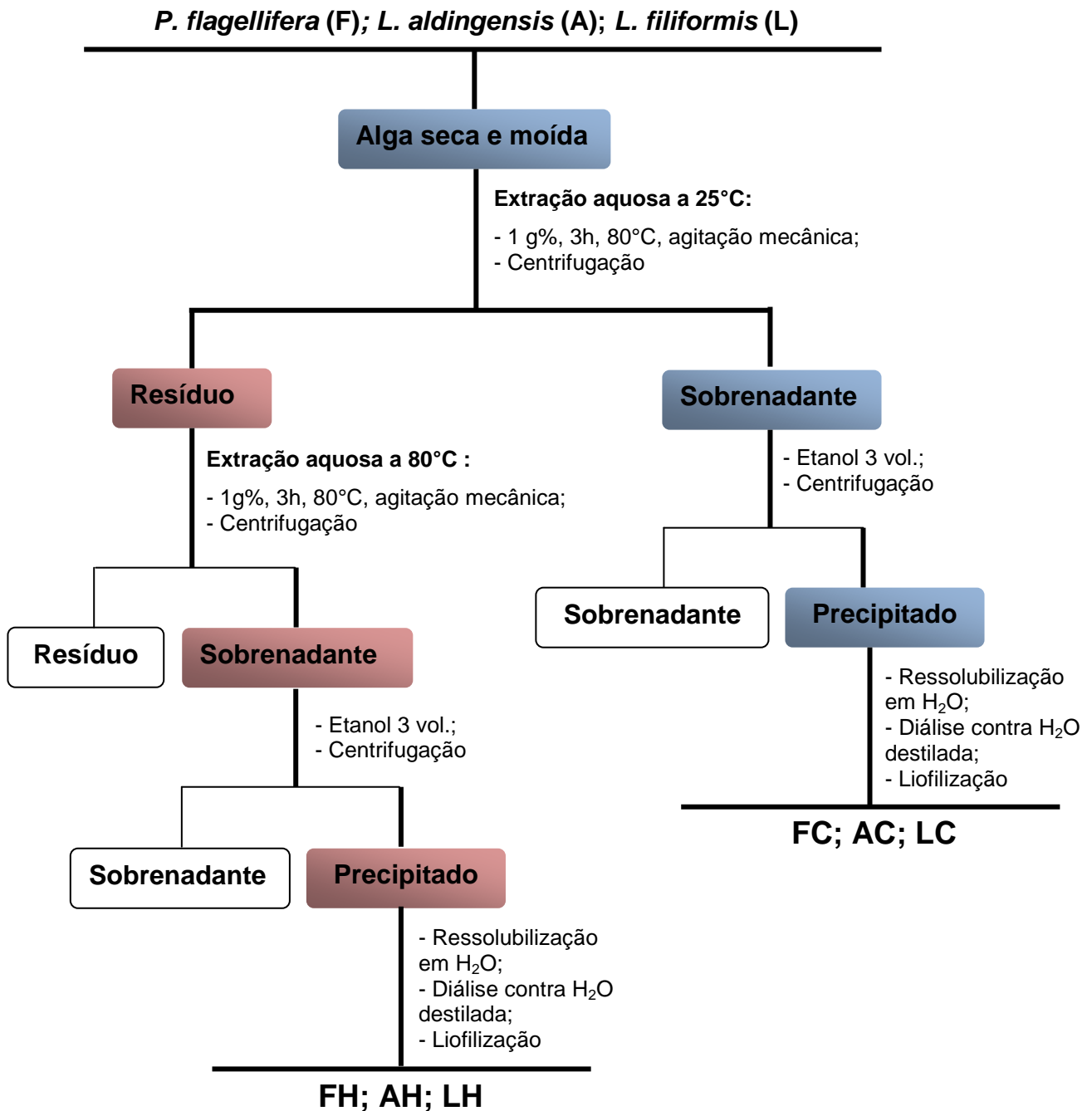


TABELA 1 – RENDIMENTO DAS FRAÇÕES OBTIDAS APÓS EXTRAÇÕES AQUOSAS A 25 °C E 80 °C

ALGA	FRAÇÃO ^(a)	RENDIMENTO (%) ^(b)
<i>P. flagellifera</i>	FC	13,0
	FH	15,0
<i>L. aldingensis</i>	AC	6,6
	AH	32,0
<i>L. filiformis</i>	LC	19,0
	LH	26,0

a = As frações obtidas das extrações aquosas a 25 °C e 80 °C levam as letras C e H, respectivamente.
b = Rendimento em relação à alga seca e moída.

ESQUEMA 2 – TRATAMENTO COM KCl 2,0M DAS FRAÇÕES FC, FH, AC, AH, LC E LH

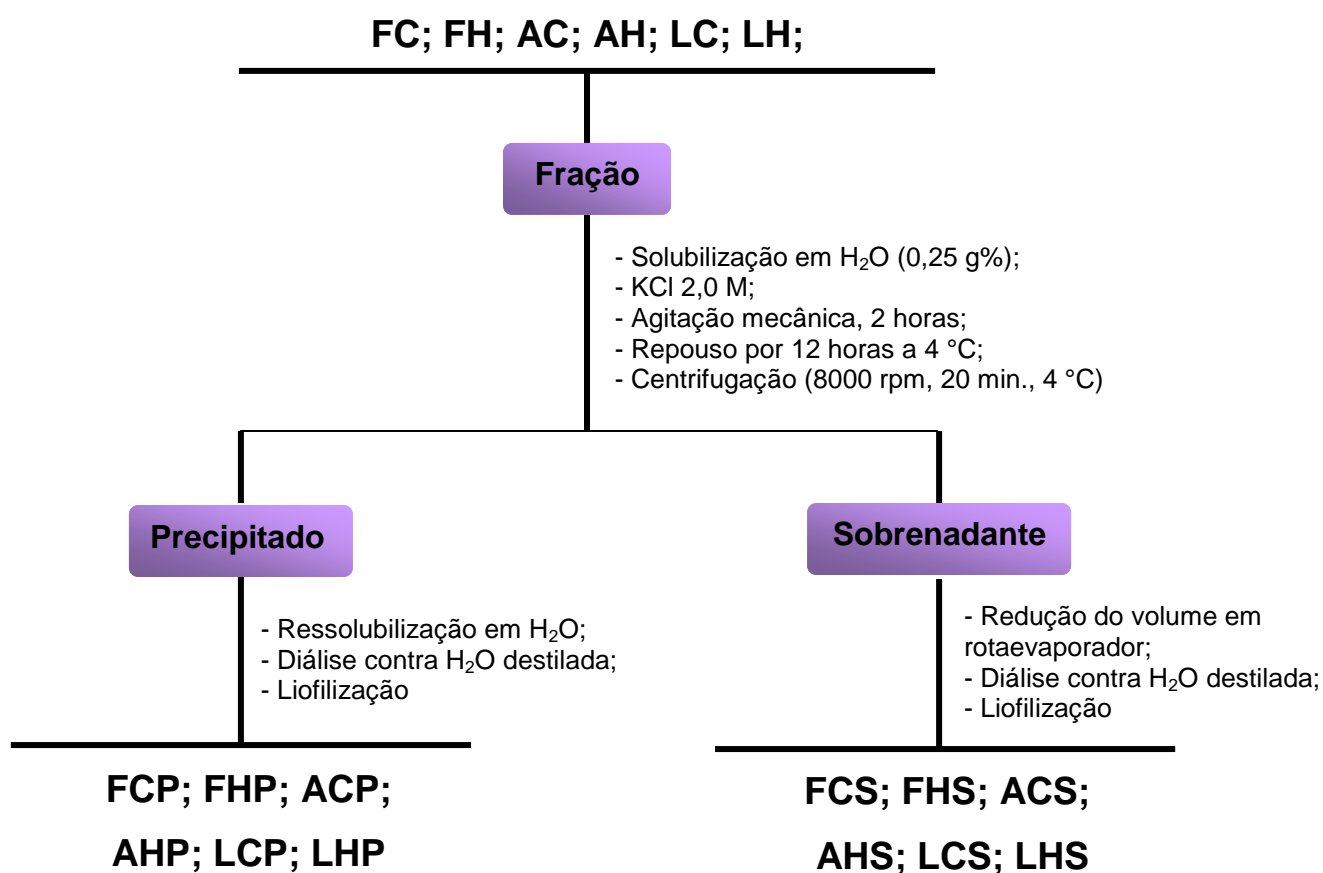


TABELA 2 – RENDIMENTO DAS FRAÇÕES PRECIPITADAS E SOLÚVEIS EM KCl 2,0M

ALGA	FRAÇÃO DE PARTIDA ^(a)	FRAÇÃO OBTIDA ^(b)	RENDIMENTO (%) ^(c)
<i>P. flagellifera</i>	FC	FCP	22,0
		FCS	78,0
	FH	FHP	31,0
		FHS	69,0
<i>L. aldingensis</i>	AC	ACP	1,5
		ACS	98,5
	AH	AHP	3,0
		AHS	97,0
<i>L. filiformis</i>	LC	LCP	7,0
		LCS	93,0
	LH	LHP	14,0
		LHS	86,0

^a = Frações obtidas da extrações aquosas a 25 °C e 80 °C levam as letras C e H, respectivamente.

^b = Frações obtidas após o tratamento com KCl 2,0 M. As frações precipitadas e solúveis em KCl 2,0 M levam as letras P e S, respectivamente.

^c = Rendimentos obtidos em relação ao total de polissacarídeos recuperados após tratamento com KCl 2,0 M.

As frações submetidas ao tratamento com KCl 2,0M apresentaram rendimentos de 69,0 a 98,5% em termos de polissacarídeos solúveis (tabela 2). Ressalta-se que os polissacarídeos obtidos de *L. filiformis* e *L. aldingensis* são predominantemente solúveis em KCl 2,0M (86,0 a 98,5%), enquanto que as frações FC e FH (extratos obtidos de *P. flagellifera* a 25 e a 80 °C, respectivamente)

apresentaram 22,0 e 31,0%, respectivamente, de polissacarídeos que foram precipitados, (frações FCP e FHP, respectivamente) .

4.3 ANÁLISE DOS POLISSACARÍDEOS OBTIDOS DA ALGA VERMELHA *P. flagellifera*

4.3.1 Análise de composição monossacarídica das frações precipitadas e solúveis em KCl 2,0M

As frações de *P. flagellifera* precipitadas com KCl 2,0M foram analisadas quanto a composição monossacarídica (tabela 3). FCP e FHP apresentaram manose como componente majoritário (81,8 e 88,8%, respectivamente), sendo observada também a presença de xilose em ambas as frações (4,7% para FCP e 5,4% para FHP). Estes resultados indicam a presença de xilomananas sulfatadas presentes nos precipitados de KCl de *P. flagellifera*; conforme descrito por Cardoso *et al.* (2007). A fração FCP apresentou ainda em sua composição 10,7% de galactose e pequenas quantidades de 6-O-metilgalactose (1,1%) e de glucose (1,6%); FHP apresenta 4,8% de galactose e 1,0% de glucose. A presença de galactose nestas frações é proveniente de galactanas co-precipitadas juntamente com as xilomananas durante o tratamento com KCl 2,0M.

De modo diferente, as análises de composição monossacarídica dos polissacarídeos de *P. flagellifera* solúveis em KCl 2,0M (tabela 3) mostram que FCS e FHS se apresentam constituídas principalmente por galactose (34,8 e 31,3%, respectivamente), 3,6-anidrogactose (24,9 e 26,4%, respectivamente), 6-O-metilgalactose (22,2 e 17,7%, respectivamente) e 2-O-metil-3,6-anidrogactose (7,6 e 9,8%, respectivamente). Sendo assim, essas frações são representativas das galactanas sulfatadas presentes em *P. flagellifera*; mas, apesar de se apresentarem majoritariamente constituídas por unidades de galactose e seus derivados, estas apresentaram também menores proporções de xilose (4,3 e 4,8% para FCS e FHS, respectivamente) e manose (3,6 e 7,4% para FCS e FHS, respectivamente). Esses resultados indicam a presença de xilomananas sulfatadas que permaneceram na fração solúvel após o tratamento com KCl 2,0M. A fração FCS apresenta ainda

pequena quantidade de glucose (1,3%), estando este constituinte presente também em FHS como traços. A presença de glucose nestas frações pode ser atribuída ao amido das florídeas, que é o polissacarídeo de reserva das algas vermelhas (McCANDLESS, 1981; PERCIVAL, 1979). Unidades de galactose naturalmente metiladas (3-Me-Gal, 2,3-Me₂-Gal e 2,4-Me₂-Gal) foram observadas em pequenas proporções (~1% ou mesmo traços) para FCS e FHS (tabela 3).

TABELA 3 - COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES PRECIPITADAS (FCP; FHP) E SOLÚVEIS (FCS; FHS) EM KCL 2,0M OBTIDOS DE *P. flagellifera*

MONOSSACARÍDEO (MOL %) ^a	FRAÇÃO			
	FCP	FHP	FCS	FHS
Gal ^b	10,7	4,8	34,8	31,3
6-Gal	1,1	-	22,2	17,7
AG	-	-	24,9	26,4
2-AG	-	-	7,6	9,8
2-Gal	-	-	1,3	1,5
3-Gal ^c	-	-	tr	-
2,3-Gal	-	-	1,0	tr
2,4-Gal	-	-	tr	1,1
Xyl	4,7	5,4	4,3	4,8
Glc	1,6	1,0	1,3	tr
Man	81,8	88,8	3,6	7,4

^a = Monossacarídeos analisados por CG-EM na forma de acetatos de alditóis.

^b = Gal, 6-Gal e AG correspondem a galactose, 6-O-metilgalactose e 3,6-anidrogactose, respectivamente, etc.

^c = Determinado após hidrólise, redução com NaBD₄, acetilação e análise por CG-EM.

4.3.2 Análise de RMN de ^{13}C das frações precipitadas em KCl 2,0M (FCP e FHP) DE *P. flagellifera*

Os espectros de RMN de ^{13}C das frações de *P. flagellifera* precipitadas em KCl 2,0M, FCP e FHP, se mostraram similares; deste modo somente o espectro de FCP está representado na figura 16. Sinais principais em 99,0; 78,0; 70,5 e 76,7 ppm correspondem aos C-1 a C-4 de unidades de manose 4-ligadas sulfatadas em C-2. Estas unidades estão substituídas em C-6 por unidades de xilose (C-5 e C-6 em 73,6 e 68,2 ppm, respectivamente) ou não (C-5 e C-6 em 75,2 e 60,7 ppm, respectivamente). São observados ainda os sinais em 103,4; 72,9; 75,9; 69,4 e 65,2 ppm, correspondentes aos C-1 a C-5 das unidades de xilose. Estes resultados estão de acordo com a análise de composição monossacarídica destas frações (tabela 3), caracterizando a presença de xilomananas sulfatadas, como anteriormente descrito por Cardoso *et al.* (2007).

4.3.3 Análise de RMN de ^{13}C das frações solúveis em KCl 2,0M de *P. flagellifera*

Os espectros de RMN de ^{13}C das frações solúveis em KCl 2,0M, FCS (Figura 17) e FHS (espectro não mostrado), são similares e se apresentaram complexos e com sinais alargados, devido ao grande número de sobreposições.

A região anomérica mostrou dois sinais principais, em 97,9 e 100,7 ppm, que podem ser atribuídos às unidades de 3,6-anidro- α -L-galactopiranosose ligadas às unidades de β -D-galactopiranosose 2-sulfato (contendo ácido pirúvico ou não), respectivamente (DUARTE *et al.*, 2004). Estas unidades anidrogalactosídicas também estão ligadas a unidades de β -D-galactopiranosose, podendo estas últimas serem piruvatadas ou não (C-1 em 102,3 ppm) (LAHAYE *et al.*, 1989). Foi observado ainda um sinal em 103,0 ppm, correspondente ao C-1 de unidades de β -D-galactopiranosose (que podem estar piruvatadas ou não) ligadas a unidades de α -L-galactopiranosose (C-1 também em 100,7 ppm) (LAHAYE, YAPHE e ROCHAS, 1985). O sinal em 99,2 ppm pode ser atribuído ao C-1 de unidades de α -L-galactopiranosose substituídas em C-2 por grupos sulfato (NAVARRO; STORTZ, 2008) e também ao C-1 de unidades de manose (CARDOSO *et al.*, 2007), sendo estes resultados

condizentes com os obtidos pela análise de composição monossacarídica desta fração.

Sinais em 25,2 ppm e em 175,9; 176,6 ppm foram atribuídos aos grupos metil e carboxila, respectivamente, do acetal de ácido pirúvico na forma de 4,6-O-(1'-carboxietilideno) (GAREGG, 1979).

FIGURA 16 – ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DA FRAÇÃO PRECIPITADA EM KCl 2,0M FCP (*P. flagellifera*)

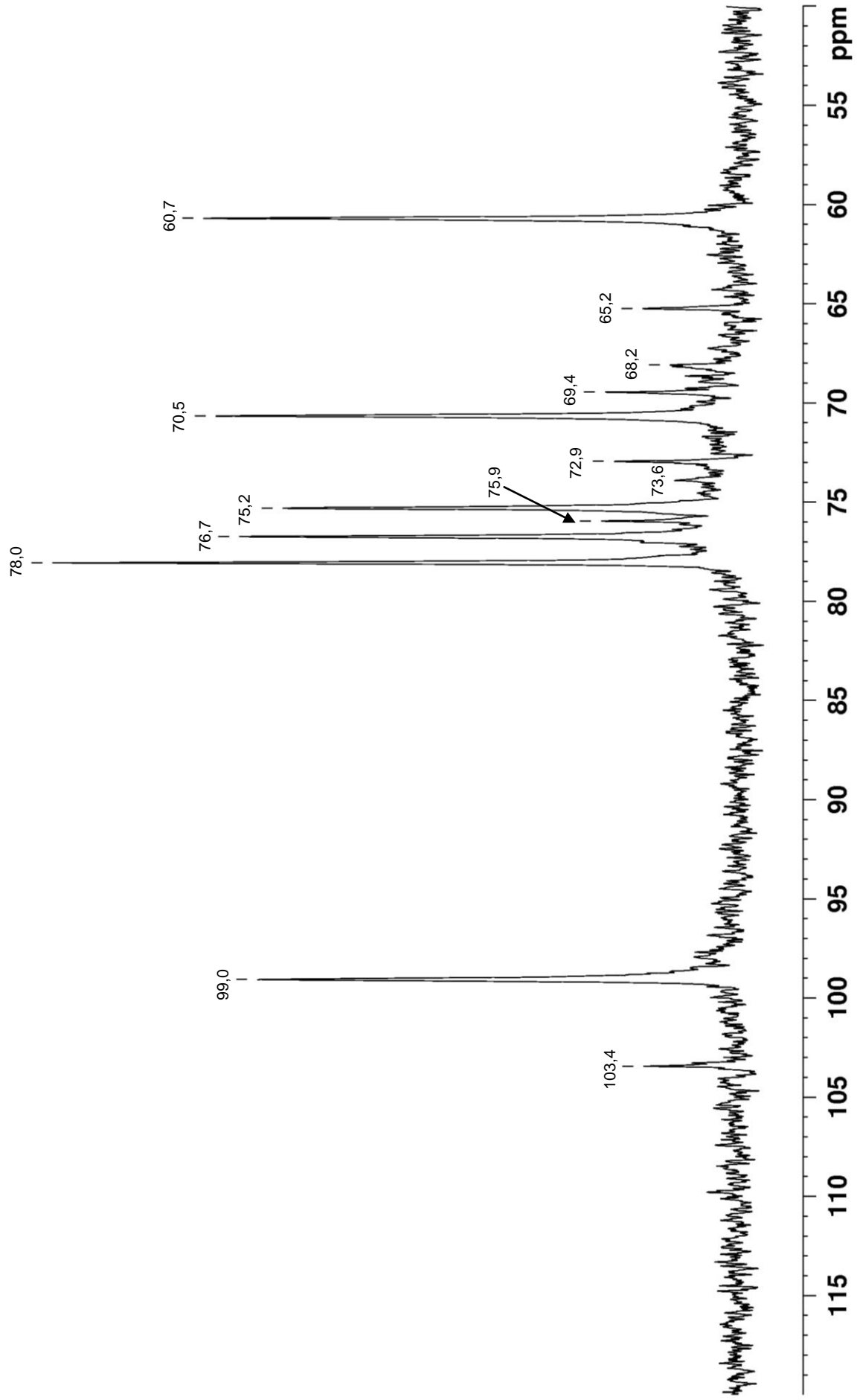
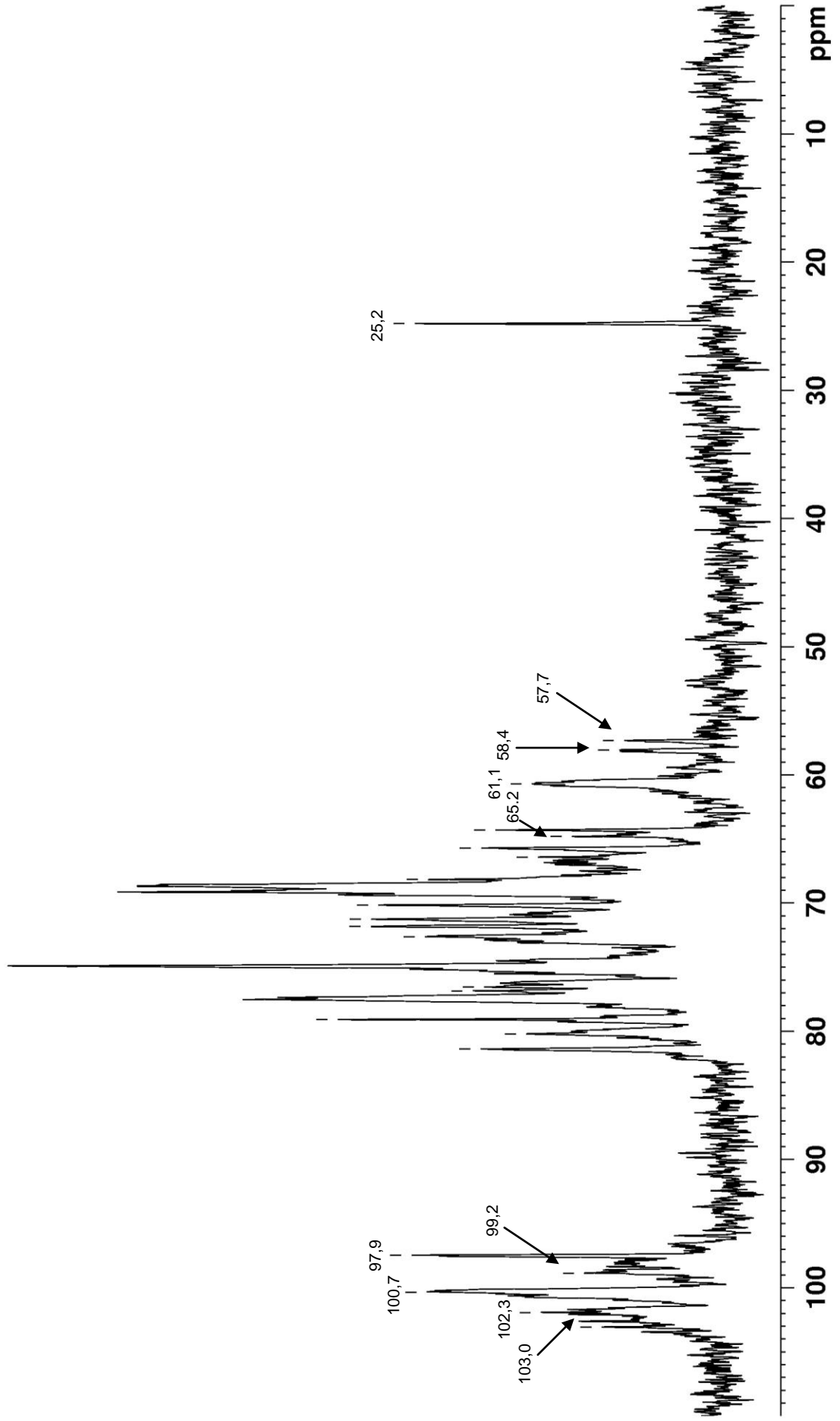


FIGURA 17 - ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DA FRAÇÃO SOLÚVEL EM KCl 2,0M FCS (*P. flagellifera*)



Adicionalmente, sinais em 57,7 e 58,4 ppm foram atribuídos a grupos O-metil, e em 61,1 e 65,2 ppm ao C-6 das unidades de galactopiranosose e ao C-5 das unidades de xilopiranosose, respectivamente .

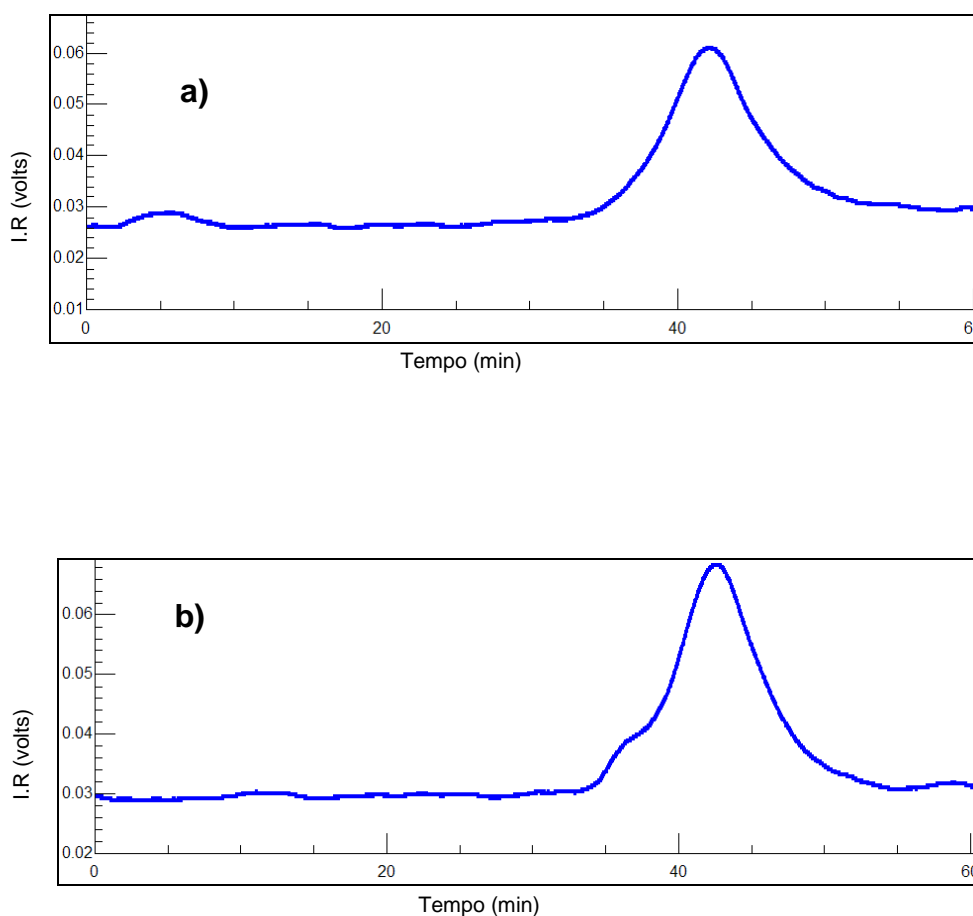
4.3.4 Análise da massa molecular por HPSEC das frações de *P. flagellifera* solúveis em KCl 2,0M (FCS e FHS)

As frações polissacarídicas solúveis em KCl obtidas de *P. flagellifera* (FCS e FHS), foram as que apresentaram os maiores rendimentos e representam as galactanas sulfatadas produzidas por *P. flagellifera*. Sendo assim, estas frações foram analisadas em relação à massa molecular de seus polissacarídeos.

A análise da massa molecular por HPSEC da fração FCS (Figura 18a) mostrou que esta se apresenta homogênea quanto a massa molecular dos polissacarídeos que a compõe. Em contrapartida, a fração FHS (Figura 18b) de *P. flagellifera* apresentou perfil heterogêneo.

Embora FCS tenha apresentado um perfil homogêneo quanto à massa molecular de seus polissacarídeos, pela análise de composição monossacarídica (Tabela 3) pôde ser observado que esta ainda se apresentou contaminada por polissacarídeos correspondentes à xilomanana sulfatada. Desta maneira, assim como FHS, FCS foi submetida a processo de purificação por cromatografia de troca iônica em DEAE-SEPHACEL.

FIGURA 18 - ANÁLISE DA MASSA MOLECULAR POR HPSEC-IR DAS FRAÇÕES SOLÚVEIS EM KCl 2,0M FCS (a) e FHS (b) de *P. flagellifera*



4.3.5 Fracionamento de FCS e FHS (*P. flagellifera*) por cromatografia de troca iônica em DEAE-Sephacel

Tendo em vista o conjunto dos resultados apresentados acima, as frações FCS e FHS foram, separadamente, submetidas ao processo de fracionamento por cromatografia de troca iônica em DEAE-Sephacel.

Neste processo, a coluna foi eluída inicialmente com água destilada e em seguida com concentrações crescentes de NaCl, que variaram de 0,1 a 2,0M.

As frações com os maiores rendimentos obtidas após o fracionamento de FCS foram FCS-0,4 (5,0%), FCS-0,5 (14,0%), FCS-0,6 (55,0%) e FCS-0,7 (6,0%), eluídas nas concentrações de 0,4 a 0,7M de NaCl, respectivamente (Tabela 4).

TABELA 4 – RENDIMENTOS DAS SUBFRAÇÕES OBTIDAS A PARTIR DAS FRAÇÕES SOLÚVEIS EM KCl 2,0M (FCS E FHS DE *P. flagellifera*) POR CROMATOLOGRAFIA DE TROCA IÔNICA

ELUENTE	SUBFRAÇÕES DE FCS	RENDIMENTO (%) ^(a)	SUBFRAÇÕES DE FHS	RENDIMENTO (%) ^(a)
H ₂ O	FCS- H ₂ O	0,3	FHS- H ₂ O	-
NaCl 0,1M	FCS-0,1	0,4	FHS-0,1	0,2
NaCl 0,2M	FCS-0,2	2,0	FHS-0,2	0,8
NaCl 0,3M	FCS-0,3	2,5	FHS-0,3	2,9
NaCl 0,4M	FCS-0,4	5,0	FHS-0,4	5,0
NaCl 0,5M	FCS-0,5	14,0	FHS-0,5	19,0
NaCl 0,6M	FCS-0,6	55,0	FHS-0,6	35,0
NaCl 0,7M	FCS-0,7	6,0	FHS-0,7	14,0
NaCl 0,8M	FCS-0,8	0,6	FHS-0,8	8,0
NaCl 0,9M	FCS-0,9	0,3	FHS-0,9	2,8
NaCl 1,0M	FCS-1,0	0,4	FHS-1,0	0,5
NaCl 1,25M	FCS-1,25	2,2	FHS-1,25	-
NaCl 1,50M	FCS-1,5	2,7	FHS-1,50	3,0
NaCl 1,75M	FCS-1,75	1,2	FHS-1,75	2,3
NaCl 2,0M	FCS-2,0	1,0	FHS-2,0	1,6

^a = Rendimentos calculados em relação às respectivas frações de partida (FCS e FHS)

Nota-se que a fração FCS-0,6 foi a de rendimento majoritário absoluto, com mais de 50% de rendimento em relação ao material de partida (FCS).

O fracionamento FHS originou as frações majoritárias FHS-0,4, FHS-0,5, FHS-0,6, FHS-0,7 e FHS-0,8 (eluídas com NaCl 0,4 a 0,8M, respectivamente), com rendimentos de 5,0; 19,0; 35,0; 14,0 e 8,0 %, respectivamente (Tabela 4).

As frações de maiores rendimentos ($\geq 5,0$ %) obtidas dos fracionamentos de FCS e FHS por cromatografia de troca iônica foram selecionadas para estudo dos polissacarídeos solúveis em KCl 2,0M obtidos de *P. flagellifera*. Para uma melhor

organização, essas frações foram renomeadas (tabela 5) para dar prosseguimento ao trabalho.

TABELA 5 – RENOMEAÇÃO DAS FRAÇÕES MAJORITÁRIAS OBTIDAS A PARTIR DE FCS E FHS (*P. flagellifera*) POR CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA.

SUBFRAÇÕES DE FCS	RENOMEADA COMO	SUBFRAÇÕES DE FHS	RENOMEADA COMO
FCS-0,4	FCS-1	FHS-0,4	FHS-1
FCS-0,5	FCS-2	FHS-0,5	FHS-2
FCS-0,6	FCS-3	FHS-0,6	FHS-3
FCS-0,7	FCS-4	FHS-0,7	FHS-4
		FHS-0,8	FHS-5

4.3.6 Análise da massa molecular por HPSEC das subfrações obtidas a partir de FCS e FHS (*P. flagellifera*) por cromatografia de troca iônica

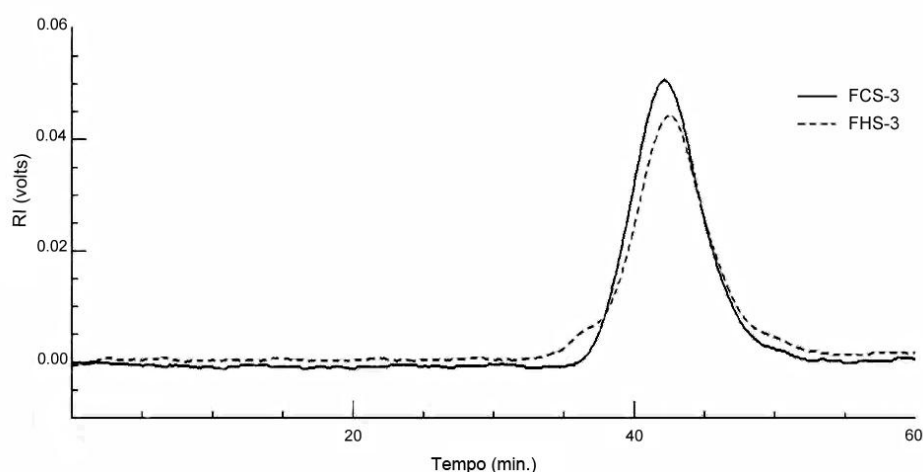
As frações com os maiores rendimentos ($\geq 5,0\%$) obtidas dos fracionamentos de FCS e FHS por cromatografia de troca iônica foram submetidas à análise de homogeneidade por HPSEC.

Todas as frações obtidas a partir de FCS apresentaram um perfil heterogêneo mediante essa análise de homogeneidade, exceto a fração FCS-3 (55,0% de rendimento, Tabela 4), eluída com NaCl 0,6M; a figura 19 mostra o perfil homogêneo quanto à massa molecular dos polissacarídeos presentes em FCS-3, que apresenta massa molecular média de 143 kDa ($dn/dc = 0,146$).

Da cromatografia de troca iônica de FHS, todas as frações obtidas apresentaram perfil heterogêneo pela análise de homogeneidade por HPSEC-MALLS. O perfil de eluição da fração majoritária (FHS-3, 35,0% de rendimento,

Tabela 4) está representado na figura 19. Pode-se observar que, apesar do perfil cromatográfico desta fração não ser simétrico, a grande maioria dos polissacarídeos que a compõem apresentam a mesma massa molecular média, visto que o perfil cromatográfico de FHS-3 apresenta apenas um pequeno ombro à esquerda do pico principal, o que indica que uma pequena parte desta fração é composta por polissacarídeos com massa molecular superior à média

FIGURA 19 – ANÁLISE DE MASSA MOLECULAR POR HPSEC DAS FRAÇÕES FCS-3 E FHS-3 de *P. flagellifera*



4.3.7 Análise de composição monossacarídica das subfrações obtidas a partir de FCS e FHS (*P. flagellifera*) por cromatografia de troca iônica

A Tabela 6 mostra a análise de composição monossacarídica das frações obtidas após o fracionamento de FCS e FHS. Por essa análise pode-se observar que todas as frações se apresentam constituídas principalmente por galactose (22,9 a 59,7%), 6-O-metil-galactose (2,0 a 17%), 3,6-anidrogalactose (4,0 a 30,5%) e xilose (4,4 a 12,3%). Todas as frações contêm 2-O-metil-3,6-anidrogalactose (1,0 a 12,8%), exceto FCS-1, que apresenta um alto teor de 3-O-metil-galactose (12,9%). FHS-1 apresenta 2,6% desse monossacarídeo naturalmente 3-O-metilado. A presença de 2,3-O-metil-galactose foi detectada para as frações FCS-3, FCS-4,

FHS-2, FHS-3, FHS-4 e FHS-5 (1,5% para FHS-4 e ~ 1,0% para as outras frações). 2,4-O-metil-galactose está presente em FCS-1 (2,0%), FCS-2 (1,0%) e FHS-1 (2,6%).

De ambos os extratos solúveis em KCl 2,0M, foram obtidas, por cromatografia de troca-iônica, frações com quantidades significativas de glucose (15,1 e 19,1% para FCS-1 e FHS-1, respectivamente) e manose (20,0 e 22,7% para FCS-2 e FHS-2, respectivamente). Adicionalmente, glucose foi observada também para as frações FCS-2, FCS-4 e FHS-2 (5,3, 2,4 e 1,0%, respectivamente); manose está presente também nas frações FCS-1, FCS-4 (5,9 e 3,2%, respectivamente) e em todas as subfrações majoritárias obtidas a partir de FHS (2,3 a 22,7%), exceto para FHS-4. Como já descrito anteriormente, a presença de glucose e manose indicam a presença de amido das florídeas e xilomananas sulfatadas, respectivamente, que estão presentes como contaminantes nestas galactanas sulfatadas.

A fração FCS-3 (55,0% de rendimento após cromatografia de FCS em DEAE-Sephacel), que se mostrou homogênea pela análise de HPSEC (Figura 19), apresentando-se constituída principalmente por galactose (59,7%), 6-O-metil-galactose (16,0%) e 3,6-anidrogalactose (12,0%), além de xilose (6,0%) e pequenas quantidades de 2-O-metil-3,6-anidrogalactose (2,8%), 2-O-metil-galactose (2,2%) e 2,3-O-metil-galactose (1,0%). Destaca-se que esta fração se apresentou livre de glucose e manose e, deste modo, a xilose ainda presente não é proveniente de xilomananas sulfatadas, mas sim das galactanas sulfatadas, sendo comum a presença de unidades de xilose como cadeias laterais nas agaranas produzidas por algas do complexo *Laurencia* (HIRASE *et al.*, 1982; USOV; ELASHIVILI, 1991, MILLER; FALSHAW; FURNEAUX, 1993; USOV; ELASHIVILI, 1997; KOLENDER; MATULEWICZ, 2002).

A fração FHS-3 (35% de rendimento, obtida a partir de FHS após cromatografia em DEAE-Sephacel), assim como FCS-3, apresenta como principais constituintes monossacarídicos galactose (46,9%), 6-O-metil-galactose (17,0%) e 3,6-anidrogalactose (16,4%), além de xilose (7,7%), 2-O-metil-galactose (1,7%) e 2,3-O-metil-galactose (0,9%). Esta fração também se apresenta livre de glucose, mas, diferentemente de FCS-3, FHS-3 apresenta 2,3% de manose.

TABELA 6 – ANÁLISE DE COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DE FCS, FHS E DAS SUBFRAÇÕES OBTIDAS POR CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA

MONOSSACARÍDEO (MOL %) ^(a)	FRAÇÃO										
	FCS	FCS-1	FCS-2	FCS-3	FCS-4	FHS	FHS-1	FHS-2	FHS-3	FHS-4	FHS-5
Gal	34,8	46,0	39,7	59,7	59,6	31,3	44,4	22,9	46,9	32,6	40,9
6-Me-Gal ^(b)	21,2	2,0	10,0	16,0	11,0	17,7	5,3	14,4	17,0	16,5	9,2
3,6-AG ^(b)	24,9	4,0	10,0	12,3	11,6	26,4	7,0	20,8	16,4	30,5	28,1
2-Me-AG ^(b)	7,6	-	2,5	2,8	2,5	9,8	1,0	7,0	3,8	12,8	12,3
2-Me-Gal	1,3	2,0	1,6	2,2	1,8	1,5	tr	tr	1,7	1,7	1,6
3-Me-Gal	Tr	12,9	-	-	-	-	2,6	-	-	-	-
2,3-Me-Gal	1,0	-	-	1,0	1,1	tr	-	1,1	0,9	1,5	0,9
2,4-Me-Gal	Tr	2,0	1,0	-	-	1,1	2,7	-	-	-	-
Xyl	4,3	10,1	9,9	6,0	6,8	4,8	12,3	10,1	7,7	4,4	4,7
Glc	1,3	15,1	5,3	-	2,4	tr	19,1	1,0	-	-	-
Man	3,6	5,9	20,0	-	3,2	7,4	5,6	22,7	5,6	-	2,3

^a = Monossacarídeos analisados por GC-EM na forma de acetatos de alditol.

^b = 6-Me-Gal: 6-O-metilgalactose; 3,6-AG: 3,6-anidrogallactose; 2-Me-AG: 3,6-anidro-2-O-metilgalactose, respectivamente, etc.

4.3.8 Caracterização química das subfrações de FCS e FHS obtidas por cromatografia de troca iônica

A Tabela 7 mostra os resultados de caracterização química das frações com os maiores rendimentos obtidas a partir da purificação de FCS e FHS; pode-se notar que todas as frações são constituídas principalmente por carboidratos, visto que as quantidades de açúcar total variam de 44,0% a 57,7%.

De forma geral, as frações eluídas com maiores concentrações de NaCl durante o fracionamento por cromatografia em DEAE-SEPHACEL apresentaram maior grau de sulfatação, demonstrando que este processo foi eficiente no fracionamento desses polissacarídeos conforme a carga apresentada por estes.

Sendo assim, das frações obtidas a partir de FCS, FCS-4 e FCS-3 foram as que apresentaram os maiores teores de sulfato, 24,6 e 22,7%, respectivamente. FCS-1 e FCS-2 apresentaram 5,7 e 16,3% de grupos sulfato, respectivamente.

Das frações obtidas a partir de FHS, FHS-4 e FHS-5 foram as que apresentaram os maiores teores de sulfato (23,5 e 24,8%, respectivamente), seguido FHS-3 (19,2%). FHS-1 e FHS-2 apresentaram quantidades semelhantes de grupos sulfato, 18,5 e 18,0%, respectivamente.

Em termos de conteúdo proteico, FCS e FHS apresentam 4,7% e 3,1% deste componente, respectivamente. Para as frações obtidas após cromatografia em DEAE-Sephacel, FCS-1 e FHS-1 (ambas eluídas com NaCl 0,4M) foram as que apresentaram os maiores teores proteicos (11,1 e 12,5%, respectivamente). Pequenas quantidades de proteínas foram observadas também para as frações FCS-2, FCS-4, FHS-2 e FHS-5 (1,8 a 2,5%). Destaca-se que as frações majoritárias, FCS-3 e FHS-3 se apresentam livres de conteúdo proteico.

A dosagem do teor de ácido pirúvico das frações brutas solúveis em KCl 2,0M indicou que FCS e FHS apresentam 4,9 e 4,5% deste constituinte. Após cromatografia por DEAE-Sephacel, das frações obtidas a partir de FCS, FCS-3 foi a que apresentou o maior teor de ácido pirúvico (5,2%), estando esse constituinte presente nas outras frações em quantidades que variam de 1,2 a 3,7%. Das frações obtidas a partir de FHS, FHS-4 e FHS-3 foram as que apresentaram as maiores quantidades de ácido pirúvico (5,4 e 5,0%, respectivamente). Nas outras frações o conteúdo deste constituinte ficou entre 2,0 e 3,5%.

TABELA 7 – ANÁLISES QUÍMICAS DE FCS, FHS E DAS SUBFRAÇÕES OBTIDAS POR CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA

FRAÇÃO	CARBOIDRATO (%) ^(a)	SULFATO (%) ^(b)	PROTEÍNA (%) ^(c)	ÁCIDO PIRÚVICO (%) ^(d)	$[\alpha]_D^{25}$ ^(e)
FCS	54,2	21,0	4,7	4,9	-43,0
FCS-1	50,8	5,7	11,1	1,2	-34,5
FCS-2	56,8	16,3	2,1	3,7	-26,5
FCS-3	55,3	22,7	-	5,2	-49,5
FCS-4	46,6	24,6	1,8	3,2	-33,5
FHS	57,1	20,5	3,1	4,5	-38,5
FHS-1	46,3	18,5	12,5	2,0	-23,5
FHS-2	55,1	18,0	2,4	4,1	-30,0
FHS-3	59,2	19,2	-	5,0	-48,0
FHS-4	57,7	24,8	-	5,4	-38,0
FHS-5	44,0	23,5	2,5	3,5	-33,0

^a = Dubois *et al.*, 1956;

^b = Dodgson, 1961;

^c = Lowry *et al.*, 1951;

^d = Troyano *et al.*, 1996; Verhoef *et al.*, 2003.

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

Todas as frações apresentaram rotação óptica negativa (-23,5 a -49,5°). Estes resultados estão de acordo com a análise de RMN de ¹³C das frações brutas FCS (Figura 17) e FHS, que mostraram sinais de α -L-galactopiranosose e 3,6-anidro- α -L-galactopiranosose. A presença de unidades de galactopiranosídicas da série L indica que as galactanas em questão pertencem ao grupo das agaranas; os valores de rotação específica negativos observados em todas as frações de *P. flagellifera* são característicos deste tipo de polissacarídeo.

FCS-3 foi a fração de maior rendimento (55,0%, tabela 4) obtida após fracionamento cromatográfico do extrato bruto obtido a temperatura de 25 °C (FCS). Esta fração se apresentou homogênea (HPSEC-MALLS) e livre de manose (CG-

EM). Sendo assim, FCS-3 é uma fração purificada de galactanas sulfatadas (22,7%, tabela 7) e piruvatadas (5,2%, Tabela 7) produzidas por *P. flagellifera*.

De modo diferente, a fração FHS-3 (fração de maior rendimento obtida a partir da extração a 80 °C, após fracionamento cromatográfico) apresenta-se heterogênea quanto à massa molecular média e contém 5,6% de manose (Tabela, 6). Em contrapartida, FHS-3 apresenta os teores de grupos sulfato (19,2%) e de ácido pirúvico (5,0%) semelhantes aos da fração FCS-3 (Tabela 7). De forma geral, a caracterização química de FHS-3 é bem semelhante à de FCS-3 (tabela 7) e, adicionalmente, os espectros de RMN de ^{13}C destas frações também são similares (ver item seguinte).

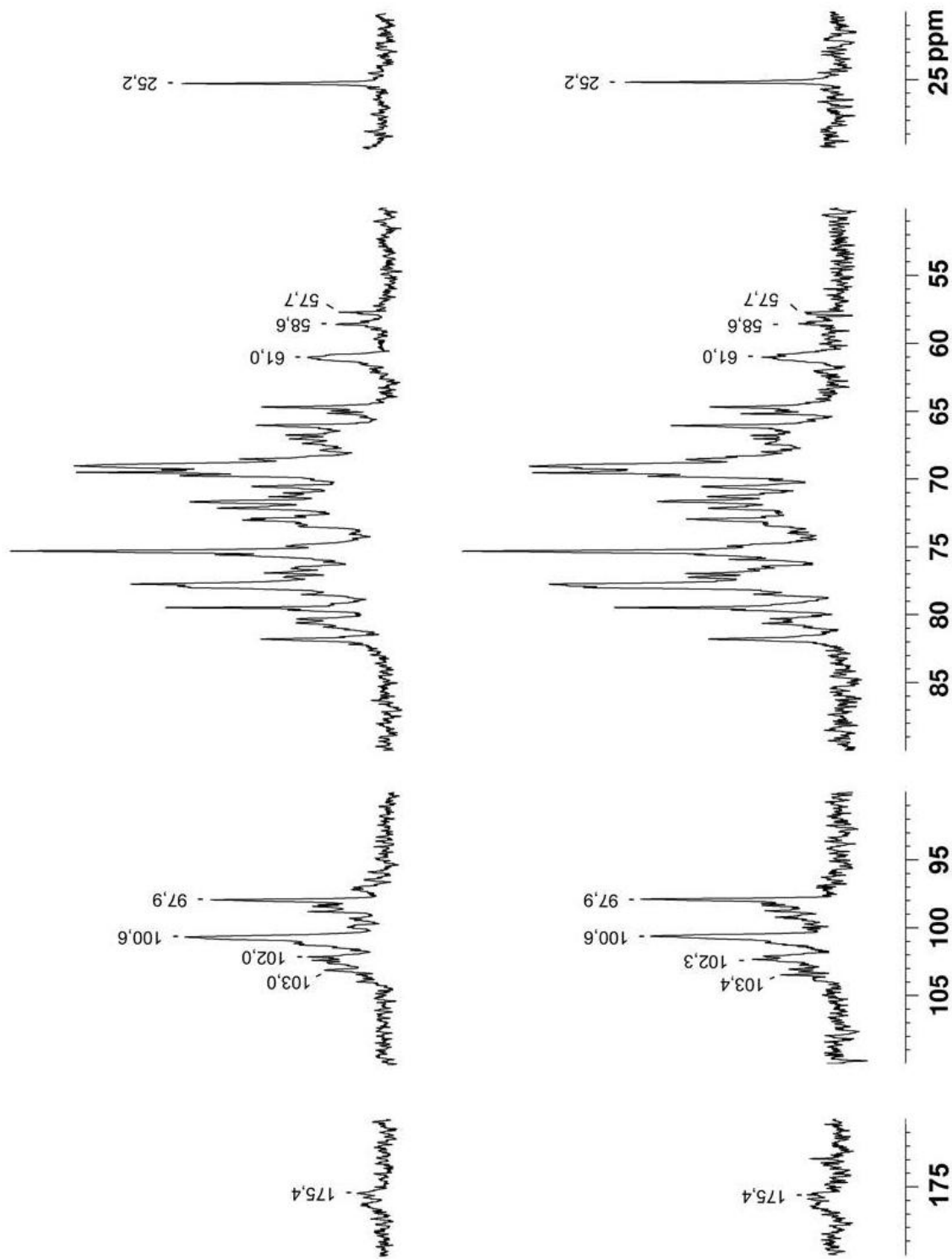
4.3.9 Análise de RMN de ^{13}C das agaranas FCS-3 e FHS-3 obtidas de *P. flagellifera*

Os espectros de RMN de ^{13}C das frações FCS-3 e FHS-3 se mostraram similares, estando este dado de acordo com os obtidos pela análise da composição monossacarídica, teores de grupos sulfato e ácido pirúvico, bem como as análises de metilação.

Pela análise de RMN de ^{13}C das frações FCS-3 e FHS-3 (Figura 20) pode-se observar o sinal em 25,2 ppm e 175,4 ppm, correspondentes aos grupos metil (GAREGG, 1979) e carboxila de ácido pirúvico na configuração R (LAHAYE *et al.*, 1989), respectivamente. Os sinais em 57,7 e 58,6 ppm correspondem a grupos metil.

Na região anomérica são observados dois sinais principais em 100,6 e 97,9 ppm, correspondentes aos C-1 das díades de β -D-galactopiranosose 2-sulfato ligadas a 3,6-anidro- α -L-galactopiranosose (DUARTE *et al.*, 2004). São observados ainda grupos de sinais em 103,4-103,0 ppm, correspondentes a unidades de β -D-galactopiranosose ligadas a unidades de α -L-galactopiranosose (C-1 em 100,6 ppm) (LAHAYE *et al.*, 1985; USOV *et al.*, 1997; DUARTE *et al.*, 2002), em 102,3-102,0 correspondentes a unidades de β -D-galactopiranosose ligadas a 3,6-anidro- α -L-galactopiranosose (C-1 em 97,9 ppm) (LAHAYE *et al.*, 1989, DUARTE, 2002).

FIGURA 20 - ESPECTROS DE RMN DE ^{13}C DAS AGARANAS FCS-3 E FHS-3 OBTIDAS DE *P. flagellifera*



4.3.10 Análise de metilação das agaranas FCS-3 e FHS-3 de *P. flagellifera*

A técnica de análise de metilação ocupa um lugar de destaque na determinação da estrutura de polissacarídeos, fornecendo informações que muitas vezes não podem ser obtidas por outros métodos. Isto ocorre especialmente quando se trata de polissacarídeos complexos, como as galactanas sulfatadas obtidas de algas da Ordem Ceramiales, nas quais é freqüente a presença de grupos O-metil naturais, heterogeneidade no padrão de sulfatação e presença de ácido pirúvico.

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

No desenvolvimento deste trabalho, a metilação das frações polissacarídicas foi realizada de acordo com a metodologia de Ciucanu e Kerek (1984). Este método deve ser realizado em meio anidro e prevê o uso de dimetilsulfóxido (DMSO) como solvente, hidróxido de sódio (NaOH) pulverizado e, como agente metilante, iodeto de metila (CH_3I).

Por ser um solvente aprótico (sem hidrogênio ácido), o DMSO é apropriado para este tipo de reação, visto que a etapa inicial consiste na desprotonação das hidroxilas (-OH) presentes no polissacarídeo. Além disso, o DMSO solvata fortemente os cátions deixando os ânions relativamente livres para reagir, sendo esta característica muito vantajosa no caso da metilação, visto que a etapa inicial é realizada por intermédio de uma base forte (OH^-) (CORRÊA, 1971).

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

FCS-3 foi a fração de maior rendimento (55,0%) obtida após fracionamento cromatográfico do extrato obtido a temperatura de 25 °C e solúvel em KCl (FCS). Esta fração se apresentou homogênea (HPSEC-MALLS, figura 19) e livre de manose (CG-EM, tabela 6). Sendo assim, FCS-3 foi selecionada para ser analisada quanto à sua estrutura química fina por métodos químicos e espectroscópicos, bem como submetida aos testes de atividade antiviral.

A fração FHS-3 (34,0% de rendimento), que foi a majoritária obtida após fracionamento cromatográfico do extrato obtido a temperatura de 80 °C e solúvel em KCl 2,0M (FHS), apresentou-se heterogênea quanto à massa molecular média e contém 5,6% de manose. Em contrapartida, FHS-3 se apresentou semelhante a fração FCS-3 frente às análises químicas e de espectroscopia de RMN de ¹³C. Sendo assim, FHS-3 também foi submetida a análises de metilação, com o objetivo de verificar o perfil das galactanas sulfatadas obtidas de *P. flagellifera* por extração aquosa a quente.

A tabela 8 apresenta os resultados das análises de metilação das frações FCS-3 e FHS-3. Para ambas as frações, os principais produtos obtidos foram: 2,4,6-Me-galactose (18,2-18,8%), galactose (20,8-21,6%) e 2-O-Me-galactose (11,3-13,2%), correspondentes a unidades de galactopiranosose 3-ligadas, galactose totalmente substituídas e galactose 3,4,6-substituídas, respectivamente. Outros derivados que também estão presentes em percentagens significativas são 2,3-Me-Gal (4,0-6,2%) e 2-Me-AG (9,6-13,1%), correspondentes a unidades de galactopiranosose 4-ligadas 6-O-substituídas e de 3,6-anidro-galactopiranosose 4-ligadas. Ressalta-se a ambiguidade dos derivados galactose e 2-O-Me-galactose, que podem corresponder tanto a unidades A quanto a unidades B. O primeiro derivado pode ser composto por unidades 3- e/ou 4-ligadas tri-substituídas e o segundo derivado pode ser composto por unidades 3- ou 4-ligadas di-substituídas em C-4 e C-6 ou em C-3 e C-6, respectivamente. Uma diversidade de outros derivados foi observada em menores proporções, demonstrando o alto grau de complexidade das galactanas presentes nestas frações.

Em se tratando das unidades 3-ligadas, foram observados também os derivados 4,6-Me-Gal (5,5-6,2%), 2,4-Me-Gal (5,4-5,8%) e 4-Me-gal (2,0-2,3%), correspondentes a unidades A substituídas em C-2, C-6 e em C-2 e C-6, respectivamente. No que diz respeito às unidades 4-ligadas, foram observados os

derivados AG (5,7-8,1%) e 3,6-Me-Gal (3,2-3,7%), correspondentes a unidades B ciclizadas na forma de 3,6-anidrogactose e de unidades não ciclizadas substituídas em C-2, respectivamente.

A presença do derivado 6-O-metil-galactose (3,1-3,5%), que pode pertencer tanto às unidades A quanto às B do polissacarídeo, foi também detectada, além da presença de terminais não redutores de xilose (2,2-2,3%).

TABELA 8 – ANÁLISE DE METILAÇÃO DAS AGARANAS FCS-3 E FHS-3 de *P. flagellifera*

DERIVADO (%) ^a	FCS-3	FHS-3
<i>3-ligado</i>		
2,4,6 –Gal	18,2	18,8
4,6- Gal	6,2	5,5
2,4 –Gal	5,8	5,4
4- Gal	2,3	2,0
<i>4-ligado</i>		
2-AG	9,6	13,1
AG	5,7	8,1
3,6-Gal	3,2	3,7
2,3-Gal	6,2	4,0
<i>Indefinidos</i>		
6- Gal	3,5	3,1
2- Gal	13,2	11,3
Gal	21,6	20,8
<i>Terminais não redutores</i>		
2,3,4-Xyl	2,3	2,2
2,3,4,6-Gal	2,2	2,0

^a = Grupos O-metil na posição indicada.

Comparando-se os dados de metilação obtidos das análises das frações FCS-3 e FHS-3 (Tabela 8), pode-se observar que o padrão dos derivados parcialmente metilados foi qualitativamente similar para estas frações. As principais diferenças são que FHS-3, em relação à FCS-3, apresenta maior percentagem de unidades de 3,6-anidrogactose e menor quantidade de unidades precursoras (G6S); este resultado é esperado para galactanas obtidas por extração aquosa à quente (DUARTE *et al.*, 2004; PRADO; CIANCIA; MATULEWICZ, 2008).

A fração FCS-3, por apresentar alto rendimento (56,0% em relação à FCS) e por ser homogênea em relação ao tipo e à massa molecular média dos polissacarídeos que a constituem, foi selecionada para dar prosseguimento aos estudos de estrutura química fina das galactanas sulfatadas produzidas por *P. flagellifera*, bem como para estudos de atividade antiviral. Deste modo, os resultados de metilação obtidos para esta fração serão discutidos em detalhes nos itens seguintes.

4.3.11 Dessulfatação solvolítica da agarana FCS-3 de *P. flagellifera*

Para a determinação da posição dos grupos sulfato substituintes em galactanas sulfatadas com complexo padrão estrutural, torna-se necessário proceder, previamente à análise de metilação, à remoção destes grupos para que posteriormente se realize a análise de metilação comparativa entre o polissacarídeo nativo (sulfatado) e dessulfatado. Com este objetivo, FCS-3 (22,7% de sulfato) foi submetida ao processo de dessulfatação solvolítica (solvólise) segundo Nagasawa, Inoue e Tokuyasu (1979), originando a fração FCS-3D.

Após dosagem do teor de grupos sulfato remanescentes na fração FCS-3D (3,5%), pode-se afirmar que houve um alto grau de dessulfatação do polissacarídeo (84,6% de remoção de SO₃Na) com um rendimento de 85,0%. A análise de composição monossacarídica por CG-EM (Tabela 9) mostrou que a fração dessulfatada FCS-3D apresenta composição muito semelhante à da fração nativa FCS-3. Esse resultado demonstrou que o polissacarídeo não sofreu degradação extensiva após o tratamento solvolítico, sendo FCS-3D, portanto, representativa da fração original.

TABELA 9 - ANÁLISE DE COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DA AGARANA NATIVA FCS-3 E DESSULFATADA FCS-3D DE *P. flagellifera*

MONOSSACARÍDEO (%) ^(a)	FRAÇÃO	
	FCS-3	FCS-3D
Gal	59,7	59,3
6-Me-Gal	16,0	16,2
3,6-AG	12,3	12,3
2-Me-AG	2,8	3,0
2-Me-Gal	2,2	2,0
2,3-Me-Gal	1,0	1,0
Xyl	6,0	6,0

^a = Monossacarídeos analisados na forma de acetatos de alditol por CG-EM.

4.3.12 Análise de trideuterometilação e da configuração absoluta de alguns derivados metilados obtidos a partir das galactanas das frações FCS-3 e FCS-3D

Para a determinação da estrutura química fina, a fração FCS-3 e sua correspondente dessulfatada (FCS-3D), na forma de sal de trietilamônio, foram submetidas à análise de metilação (CIUCANU E KEREK, 1984) utilizando-se ICD₃ como agente metilante. Esta estratégia de metilação permite a localização dos grupos O-metil naturais do polímero, que são diferenciados dos grupos O-metil trideuterados através do perfil de fragmentação obtido por análise de CG-EM. Os resultados desta análise estão representados na tabela 10.

Alternativamente, para auxiliar a interpretação da análise de trideuterometilação das frações FCS-3 e FCS-3D, outra estratégia de metilação foi também utilizada. Deste modo, uma mesma alíquota da fração FCS-3 foi submetida sequencialmente a per-O-metilação com ICH₃, dessulfatação e per-O-metilação com ICD₃. Esta estratégia permitiu que somente as posições originalmente ocupadas por grupos sulfato apresentassem a marcação por ICD₃ (CASSOLATO *et al.*, 2008).

A fração FCS-3 apresentou galactose não metilada como principal produto da análise de trideuterometilação. A presença deste derivado pode ser originada tanto de unidades de β -D-galactose 3-ligadas quanto de unidades de α -L-galactose 4-ligadas, ambas tri-substituídas. A determinação da configuração absoluta das unidades de galactose não metiladas presentes no polissacarídeo nativo (FCS-3) foi conduzida pelo método de aminação redutiva com aminopropanol (CASES; CERZO; STORTZ, 1995), e foi observado que essas unidades eram todas pertencentes à série D e, deste modo, foram atribuídas às unidades de 4,6-O-(1'-carboxietilideno)- β -D-galactose 3-ligadas e sulfatadas em C-2. Este resultado está de acordo com o alto teor de ácido pirúvico (5,2%, Tabela 7) apresentado por estas galactanas, bem como com a presença de uma quantidade similar do derivado 2-CD₃-Gal (21,0%) presente entre os produtos de trideuterometilação de FCS-3D (Tabela 10).

Uma importante percentagem do derivado 2,4-CD₃-6-Me-galactose (12,0 mol%) foi observada para a fração FCS-3, atribuído a unidades de β -D-galactose 3-ligadas naturalmente 6-O-metiladas. Menores proporções desse mesmo derivado sulfatado em C-2 e em C-2 e C-4 (4-CD₃-6-Me-Gal (1,3%) e 6-Me-Gal (3,5%), respectivamente) foram também observadas. A análise de trideuterometilação da fração dessulfatada (FCS-3D) confirmou estes dados, visto que foi observado o aumento do derivado 2,4,6-CD₃ (12,0 para 16,8 mol %) concomitante ao desaparecimento dos derivados 4-CD₃-6-Me-Gal e 6-Me-Gal. Adicionalmente, no que diz respeito às unidades A presentes nesta fração, a análise comparativa dos resultados de metilação de FCS-3 e FCS-3D demonstraram o aumento do derivado 2,4,6-CD₃-Gal (6,2 para 17,0 mol%), que foi acompanhado da diminuição dos derivados 4,6-CD₃-Gal (4,9 para 0%), 2,4-CD₃-Gal (5,8 para 3,0%) e 4-CD₃-Gal (2,3 para 0%). Estes dados são consistentes com a presença de unidades de β -D-galactose 3-ligadas sulfatadas em C-2 (5,2%), C-6 (2,8%) e dessulfatadas em C-2 e C-6 (2,3%), respectivamente.

A análise de trideuterometilação das agaranas FCS-3 e FCS-3D mostraram uma razão molar de 1,5:1 para as unidades A e B, respectivamente (Tabela 10). Estes resultados foram também descritos para agaranas altamente piruvatadas obtidas de uma espécie de *Callophycus*, nas quais o alto teor de acetal de ácido bem como a presença de unidades de 3,6-anidrogalactose 2-sulfatadas foram

fatores responsáveis pela baixa recuperação das unidades de 3,6-anidrogactose pelo processo de hidrólise redutiva parcial (CHIOVITTI *et al.*, 1997; FALSHAW; FURNEAUX; WONG, 2003). A agarana obtida FCS-3 apresenta ambos os substituintes que podem ser responsáveis pela baixa recuperação das unidades anidrogactosídicas mediante o processo de hidrólise redutiva. Deste modo, o conteúdo de unidades de 3,6-anidro- α -L-gactose e de seus derivados 2-O-metil e 2-O-sulfato provavelmente são maiores do que aqueles que foram determinados pelas análises de metilação das frações FCS-3 e FCS-3D (15,3 e 16,5 mol %, respectivamente, Tabela 10), bem como aqueles determinados por análise de composição monossacarídica (15,1 e 15,3 mol%, respectivamente, (Tabela 9)). A determinação cromatográfica do conteúdo de ácido pirúvico (TROYANO *et al.*, 1996) mostrou a presença de 5,2 e 5,4% deste constituinte para FCS-3 e FCS-3D, respectivamente, indicando que a agarana produzida por *P. flagellifera* é altamente piruvatada, contendo 1 unidade de 4,6-O-(1'-carboxietilideno)- β -D-gactose para cada 6 unidades presentes no polímero (Cálculos em anexo). Este fator pode explicar, ao menos em parte, a discrepância entre a razão de unidades A:B (1,5:1) encontrada para este polissacarídeo e a razão que é esperada para gactanas sulfatadas obtidas de algas marinhas, que é de 1:1 (PAINTER,1983; STORTZ; CERESO, 2000; DUARTE *et al.*, 2004; PRADO; CIANCIA; MATULEWICZ, 2008).

Diversas espécies pertencentes ao complexo *Laurencia* tiveram a estrutura química de seus polissacarídeos investigada (BOWKER; TURVEY, 1968a; BOWKER; TURVEY, 1968b; HIRASE, 1982; USOV; ELASHVILI, 1991; MILLER; FALSHAW; FURNEAUX, 1993B; VALIENTE *et al.*, 1993; USOV; ELASHVILI, 1997; VILLANUEVA *et al.*, 2010). Dentre estas, somente *Laurencia thyrifera* (MILLER; FALSHAW; FURNEAUX, 1993b) e *Laurencia gemmifera* (VALIENTE *et al.*, 1993) apresentam agaranas piruvatadas. Diferentemente da agarana da alga *P. flagellifera*, em que as unidades de gactose piruvatadas são também sulfatadas, na agarana de *L. thyrifera* a piruvatação ocorre em unidades de β -D-gactose não sulfatadas. Nas agaranas de *L. gemmifera* não foi possível determinar se as unidades piruvatadas eram sulfatadas ou não, visto que as agaranas desta espécie foram submetidas a metanólise, e este processo de hidrólise mantém o acetal de ácido pirúvico nas unidades de gactose, mas promove a dessulfatação do polissacarídeo.

Em se tratando da análise de metilação da agarana de *P. flagellifera*, foi observado o derivado 2,6-CD₃-Gal (8,0%) entre os produtos da análise de metilação da fração dessulfatada FCS-3D, podendo este pertencer tanto às unidades A quanto às unidades B do polissacarídeo. Deste modo, assim como a galactose não metilada, este derivado também foi submetido a determinação da configuração absoluta, mas utilizando-se a amina quiral α -metilbenzilamina, como descrito por Errea, Kolender e Matulewicz (2001). Esta análise demonstrou que o derivativo 2,6-CD₃-Gal é pertencente à série L. De acordo com a quantidade de xilose (6,0 mol %, tabelas 6 e 9), o derivativo 2,6-CD₃-Gal provavelmente é originado de unidades de galactose xilosiladas em C-3 (L3X6S na agarana nativa). Adicionalmente, a presença de 2,4-Gal (3,0 mol %) entre os produtos de metilação da fração FCS-3D pode indicar que uma pequena quantidade de unidades de β -D-galactose são também substituídas em C-6 por unidades glicosídicas, o que está de acordo com a presença de açúcares terminais não redutores, detectados como 2,3,4-CD₃-Xyl e 2,3,4,6-CD₃-Gal (Tabela 10). O último derivativo foi originado de unidades de galactose naturalmente 2,3-di-O-metiladas e galactose, que podem estar presentes como unidades simples glicosilando o C-6 das unidades de β -D-galactose. Em adição às unidades simples de xilose glicosilando o C-3, as unidades de α -L-galactose podem também estar parcialmente substituídas em C-3 por unidades de galactose e 2,3-di-O-metil-galactose.

Observa-se que a quantidade de unidades galactosídicas substituídas por unidades simples de xilose ou galactose em C-3 ou em C-6 (11,0 mol % no total) é maior do que a quantidade obtida dos derivados 2,3,4-Xyl e 2,3,4,6-Gal nas análises de metilação (Tabelas 8 e 10). Essa discrepância pode ser explicada por processos de perdas preferenciais durante a derivatização (NEEDS; SELVENDRAN, 1994) e também por processos de oxidação (YORK *et al.*, 1990). A presença de cadeias laterais de 2,3-di-O-metilgalactose foram previamente reportadas para as xilogalactanas de duas espécies de Corallinales: *Jania rubens* (NAVARRO; STORTZ, 2008) e *Lithothamnion heterocladum* (NAVARRO; STORTZ, 2011).

TABELA 10 – ANÁLISE DE TRIDEUTEROMETILAÇÃO DA AGARANA NATIVA (FCS-3) E DESSULFATADA (FCS-3D) DE *P. flagellifera*

DERIVADO ^(a)	ANALISADO COMO ^(b)	UNIDADE CORRESPONDENTE ^(c)			
		FCS-3	MOL (%)	FCS-3D	MOL (%)
<i>3-ligado</i>					
2,4,6-Gal	2,4,6-CD ₃ -Gal	G	6,2	G + G2S + G6S + G2S,6S	17,0
	2,4-CD ₃ -6-Me-Gal	G6M	12,0	G6M + G2S,6M + G2S,4S,6M	16,8
4,6-Gal	4,6-CD ₃ -Gal	G2S	4,9		-
	4-CD ₃ -6-Me-Gal	G2S,6M	1,3		-
2,4-Gal	2,4-CD ₃ -Gal	G6S/G6R	5,8	G6R	3,0
4-Gal ^d	4-CD ₃ -Gal	G2S,6S	2,3		-
6-Gal	6-Me-Gal	G2S,4S,6M	3,5		-
2-Gal	2-CD ₃ -Gal		-	GP,2S	21,0
Gal	Gal	GP,2S	21,6		-
<i>4-ligado</i>					
2-AG	2-CD ₃ -AG	LA	7,1	LA + LA2S	12,5
	2-Me-AG	LA2M	2,5	LA2M	2,5
AG	3,6-AG	LA2S	5,7	LA2S	1,5
2,3,6-Gal	2,3,6- CD ₃ -Gal		-	L2S + L6S + L3S,6S	11,0
	2-Me-3,6-CD ₃ -Gal		-	L2M,3S,6S + L2M,6S	3,7
3,6-Gal	3,6-CD ₃ -Gal	L2S	3,2		-
2,3-Gal	2,3-CD ₃ -Gal	L6S	5,2		-
	2-Me-3-CD ₃ -Gal	L2M,6S	1,0		-
2,6-Gal	2,6-CD ₃ -Gal		-	L3R,6S	8,0
2-Gal	2-CD ₃ -Gal	L3S,6S + L3R,6S	10,2		-
	2-Me-Gal	L2M,3S,6S	3,0		-
Terminal					
2,3,4-Xyl	2,3,4-CD ₃ -Xyl	R	2,3	X	1,2
2,3,4,6-Gal	2,3,4,6-CD ₃ -Gal	R	1,2		1,0
	2,3-Me-4,6-CD ₃ -Gal	R	1,0		0,8

/ = e/ou. – = não detectado.

^a Metil e/ou trideuterometil nas posições indicadas.

^b Me = metil, CD₃ = trideuterometil.

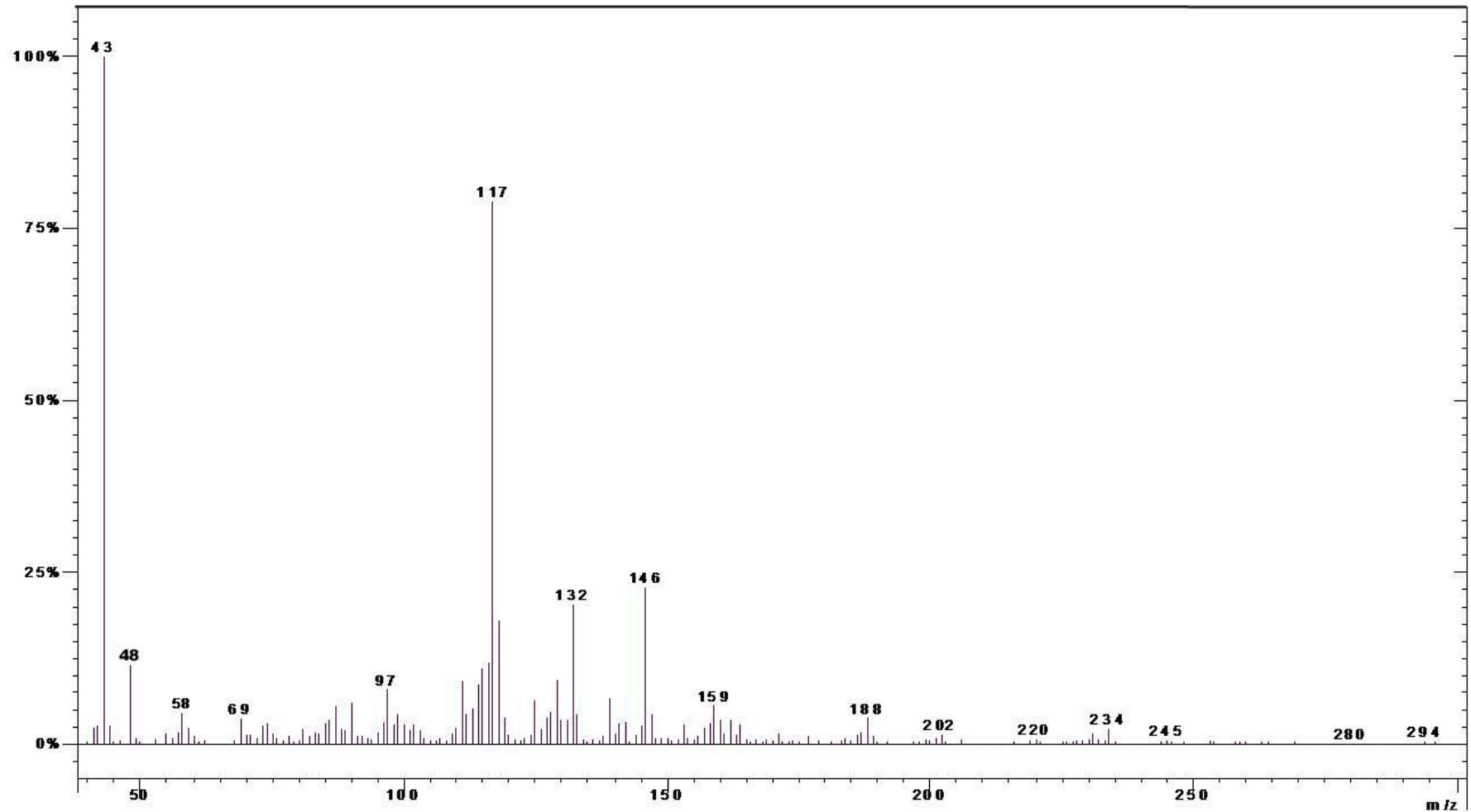
^c Nomenclatura de Knutsen *et al.*, (1994).

^d Determinado após hidrólise ácida, redução com NaBD₄, acetilação e análise de GC-MS.

A comparação dos resultados das análises de trideuterometilação obtidos das frações FCS-3 e FCS-3D demonstraram que dentre as unidades de α -L-galactose que apresentam grupos sulfato em C-6 (19,4 mol % no total), somente 32% são precursoras de unidades anidrogalactosídicas (L6S e L2M,6S), enquanto 68% representa unidades não-precursoras, pois apresentam grupos sulfato ou glicosilação no C-3 (L3S,6S e L3R,6S), ou são metiladas e sulfatadas em C-2 e C-3, respectivamente (Tabela 10).

A presença de sulfatação no C-6 das unidades de α -L-galactose xilosiladas em C-3 foi confirmada pela análise seqüencial de metilação, dessulfatação e trideuterometilação do polissacarídeo nativo (dados não mostrados). A análise do perfil de fragmentação obtido por CG-EM mostrou o derivado 2,6-Gal composto inteiramente por 2-Me-6-CD₃-Gal (Figura 21), sendo a posição do CD₃ interpretada como a localização dos grupos sulfato no polissacarídeo nativo. Adicionalmente, este experimento também confirmou que toda galactose piruvatada era também sulfatada em C-2, visto que todo o derivado 2-Gal presente em FCS-3D está presente como 2CD₃-Gal (Figura 22).

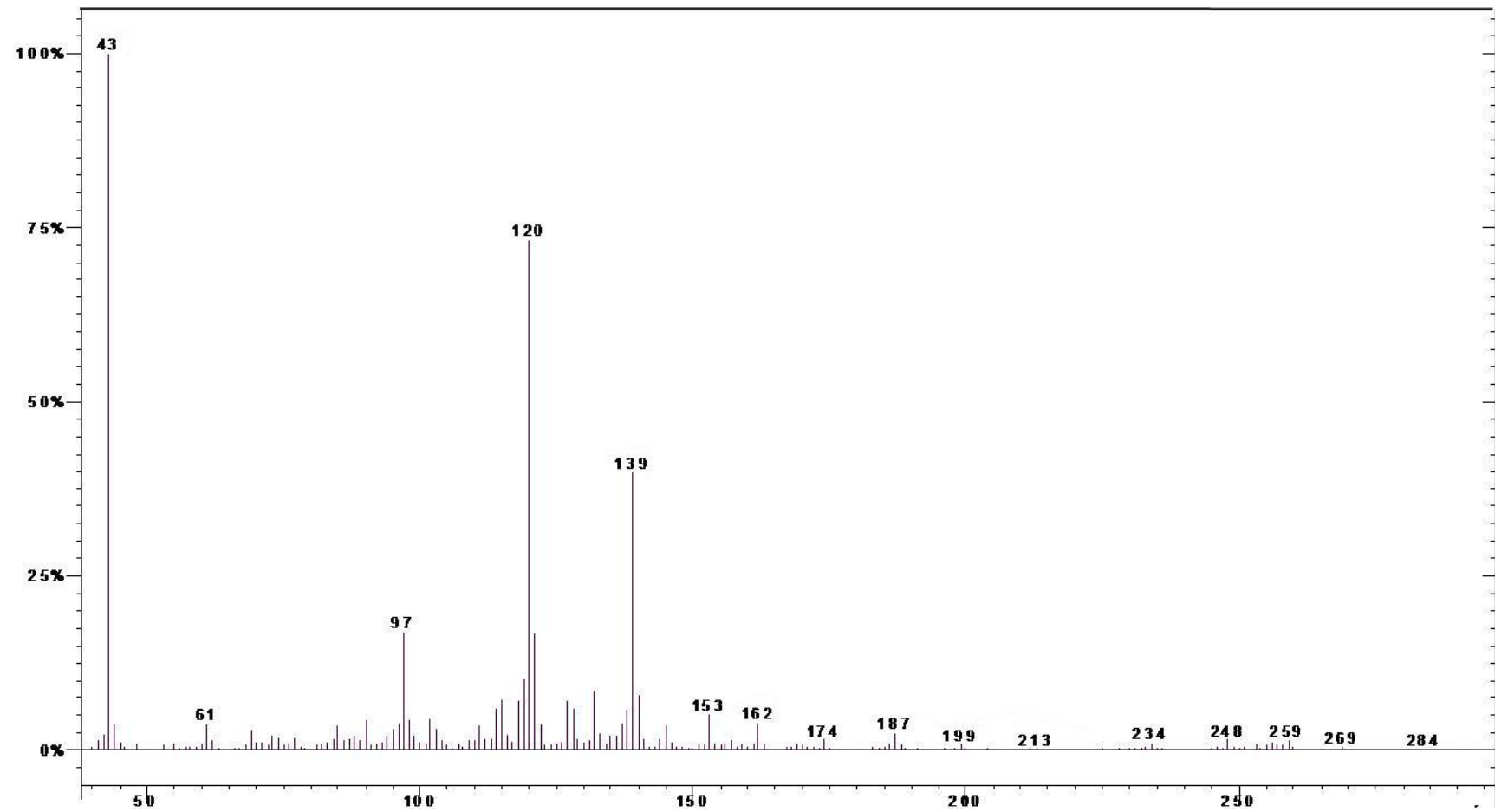
FIGURA 21 – PERFIL DE FRAGMENTAÇÃO DO DERIVADO 2,6-GAL



Análise por GC-MS do derivado 2,6-di-O-metilgalactitol obtido a partir da agarana FCS-3 submetida sequencialmente à per-O-metilação com ICH_3 , dessulfatação e metilação com ICD_3 .

Os valores de m/z de 117 e 48 correspondem a grupos metil e trideuterometil nas posições 2 e 6-Gal, respectivamente, do derivado 2,6-Gal.

FIGURA 22 – PERFIL DE FRAGMENTAÇÃO DO DERIVADO 2-GAL



Análise por GC-MS do derivado 2-O-metilgalactitol obtido a partir da agarana FCS-3 submetida sequencialmente à per-O-metilação com ICH_3 , dessulfatação e metilação com ICD_3 .
O valor de m/z de 120 corresponde a CD_3 na posição 2 do derivado 2-Gal.

4.3.13 Tratamento alcalino da agarana nativa FCS-3 obtida de *P. flagellifera*

4.3.13.1 Estudo da cinética de ciclização da fração FCS-3

O tratamento alcalino promove uma dessulfatação seletiva nas unidades de α -galactose, ou seja, apenas nos C-6 (NOSEDA; CERZO, 1995).

Com a finalidade de quantificar as unidades precursoras de 3,6-anidro- α -L-galactose, ou seja, as unidades de α -L-galactose com sulfato em C-6 e hidroxila livre em C-3, as galactanas sulfatadas de FCS-3 foram submetidas ao processo de tratamento alcalino, sendo as unidades precursoras convertidas aos seus respectivos derivados de 3,6-anidro- α -L-galactose.

Como já descrito anteriormente, o caráter enantiomérico das unidades B não influencia a velocidade de ciclização, ao passo que o padrão de sulfatação das unidades A pode exercer efeitos de aceleração ou retardo na velocidade de ciclização das unidades precursoras.

A ciclização alcalina de compostos modelo contendo as unidades de β -D-galactose não sulfatadas produzem constantes de velocidade de ciclização na ordem de 2,5 a $4,9 \times 10^{-4} \cdot s^{-1}$ e tempos de meia-vida de 23 a 47,2 min. A presença de grupos sulfato no C-4 das unidades A aumenta a constante da velocidade de ciclização para $26 \times 10^{-4} \cdot s^{-1}$ e o tempo de meia de vida é diminuído para 4,5 min. A presença de grupos sulfato no C-2 faz com que a constante de velocidade de ciclização diminua para $0,7 \times 10^{-4} \cdot s^{-1}$ e com que o tempo de meia vida aumente para 170 min.

De acordo com os dados obtidos pela análise de metilação, há diversas possibilidades para a formação das díades compostas pelas unidades precursoras presentes na galactana FCS-3. Com o objetivo de obter informações sobre detalhes estruturais sobre a composição das díades que apresentam as unidades de α -L-galactose 6-sulfato e seu derivado 2-O-metil, foi realizado o estudo da cinética de ciclização de FCS-3.

Para as galactanas de FCS-3, o processo de ciclização das unidades precursoras foi conduzido em NaOH 1M, a 80 °C, sendo o teor de 3,6-anidrogalactose acompanhado pelo método do resorcinol, acompanhando-se a reação em 550 nm (YAPHE; ARSENAULT, 1965).

Os valores de absorvância obtidos do acompanhamento do tratamento alcalino da fração FCS-3 foram utilizados para a construção da curva de cinética de ciclização desta fração. Os valores de absorvância foram plotados no eixo y, enquanto os valores de tempo de incubação (min.) foram plotados no eixo x (Figura 23). A partir desses mesmos valores de absorvância, quando aplicados à fórmula $\ln(A_0 - A_\infty / A_t - A_\infty)$ e plotados no eixo y em função do tempo (min., eixo x) (Figura 24), foi obtida a constante de velocidade da reação (k) e o tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) da reação. A equação da reta fornecida por este gráfico foi $y = 0,0259x$, onde $k = 0,0259$.

A reação de ciclização da fração FCS-3 segue, como previamente descrito, uma cinética de pseudo primeira ordem, e apresentou uma constante de ciclização (a 80 °C e NaOH 1M) de $4,3 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ ($0,0259/60$) e um tempo de meia-vida de 26,8 min, que foi calculado pela equação $t_{1/2} = \ln 2/k$, sendo $k = 0,0259$.

Tendo em vista os resultados obtidos para a agarana presente na fração FCS-3, pode-se observar que, apesar de a maioria das unidades A destas galactanas se apresentar sulfada em C-2 (33,6%), as unidades precursoras L6S e L6S2M (5,2 e 1,0 %, respectivamente) estão ligadas às unidades de G, G6M e/ou G6R (6,2, 12,0 e 3,0 mol %, respectivamente (Tabela 10)).

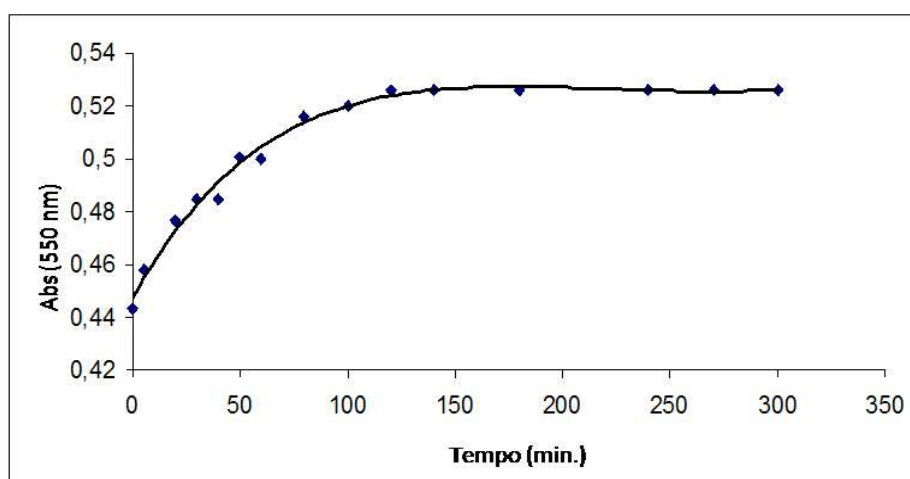


FIGURA 23 – ACOMPANHAMENTO DA CICLIZAÇÃO DAS UNIDADES PRECURSORAS DE 3,6-AG EM FUNÇÃO DO TEMPO NA AGARANA FCS-3

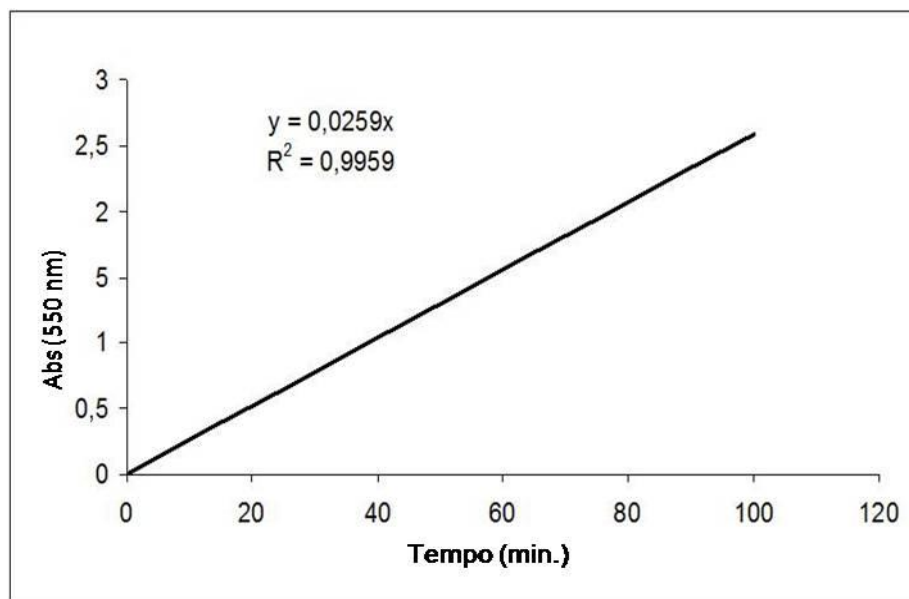


FIGURA 24 - DETERMINAÇÃO DA CONSTANTE DE VELOCIDADE DA REAÇÃO DE CICLIZAÇÃO DA AGARANA FCS-3 A 80 °C

TABELA 11 – TEMPO DE MEIA-VIDA DA REAÇÃO DE CICLIZAÇÃO DE DIFERENTES GALACTANAS A 80°

TEMPO DE MEIA-VIDA			
1C ₃ ^a	PC75 ^b	FCS-3 ^c	1T2 ^d
4,5	23	26,8	170

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

^b = 1T₂: *Lambda*-carragenana (CIANCIA *et al.*, 1993).

^c = FCS-3: Agarana sulfatada obtida de *P. flagellifera*.

^d = PC75: Porfirana obtida de *Porphyra columbina* (NOSEDA *et al.*, 2000).

4.3.13.2 Tratamento alcalino da agarana FCS-3 em escala preparativa

Após o tratamento alcalino em escala analítica para o estudo da cinética de ciclização, a fração FCS-3 foi submetida a esse tratamento químico em escala preparativa. Deste modo, FCS-3 foi submetida a reação com NaOH 1M, a 80 °C por

3 horas, sendo o teor de 3,6-anidrogactose dosado pelo método do resorcinol (YAPHE; ARSENAULT, 1965).

A fração de galactanas sulfatadas álcali-modificadas foi denominada FCS-3T e apresentou um rendimento de 80%.

A determinação da composição monossacarídica da fração FCS-3T (Tabela 12), quando comparada à de FCS-3, mostrou um aumento de 6,1% para as unidades de 3,6-anidrogactose (12,3 para 18,4%) e de 1,0% para as unidades de 2-O-metil-3,6-anidrogactose (2,8 para 3,8%); esses aumentos foram acompanhados das reduções das unidades de galactose (59,7 para 53,7%) e de 2-O-metil-galactose (2,2 para 1,2%). Esses resultados indicam que as unidades precursoras presentes na fração FCS-3 são constituídas por ~ 6,0% de galactose-6-sulfato e ~ 1,0% de 2-O-metil-galactose-6-sulfato, estando esses dados de acordo com os obtidos pelas análises de metilação da galactana FCS-3.

TABELA 12 – ANÁLISE DE COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DA AGARANA NATIVA (FCS-3) E APÓS TRATAMENTO ALCALINO (FCS-3T) OBTIDA DE *P. flagellifera*

MONOSSACARÍDEO (%) ^(a)	FRAÇÃO	
	FCS-3	FCS-3T
Gal ^(b)	59,7	53,7
6-Gal	16,0	15,9
AG	12,3	18,4
2-AG	2,8	3,8
2-Gal	2,2	1,2
2,3-Gal	1,0	1,0
Xyl	6,0	6,2

^a = Monossacarídeos analisados por CG-EM na forma de acetatos de alditol.

^b = Gal, 6-Gal e AG correspondem à galactose, 6-O-metilgalactose e 3,6-anidrogactose, respectivamente, etc.

4.3.14 Análises de RMN da fração FCS-3, FCS-3D e FCS-3T

Os assinalamentos dos espectros de RMN de ^1H (Figura 25) e ^{13}C (Figura 26) e da fração FCS-3 foram realizados utilizando informações obtidas a partir das frações: nativa, dessulfatada (FCS-3D) e álcali-tratada (FCS-3T), bem como dos experimentos de HSQC, COSY, HMBC e dados da literatura.

Na Figura 25 está representado o espectro de RMN de ^1H das frações FCS-3, FCS-3D e FCS-3T. No espectro de RMN de ^1H da fração FCS-3 (Figura 25a) pode ser observada a presença de sinais majoritários em 5,16; 5,20; 5,25 e 5,30 ppm, além dos sinais de menor intensidade em 4,99; 5,39, 5,60 e 5,65 ppm. Após dessulfatação solvolítica, que originou a fração FCS-3D, os últimos três sinais desapareceram, o que indica que estes são correspondentes a unidades sulfatadas (Figura 25b). A região α -anomérica do espectro da fração FCS-3D foi modificada também pelo aumento dos sinais em 5,16 e 5,30 ppm, pelo decréscimo do sinal em \sim 5,20 (5,19) ppm e pelo aparecimento do sinal em 5,56 ppm. Os sinais em \sim 4,99 (4,98) e \sim 5,25 (5,24) ppm foram também observados. De modo diferente, o espectro de RMN da fração álcali-tratada (FCS-3T) mostrou um aumento dos sinais em \sim 5,16 (5,15) e em \sim 5,20 (5,19) ppm, concomitante ao significativo decréscimo do sinal em \sim 5,30 (5,29) ppm. Em todos os espectros mencionados acima foram observados sinais em 1,46-1,51 ppm, correspondentes aos grupos metil de acetal de ácido pirúvico na configuração R (IZUMI, 1973; GAREGG, 1979), bem como sinais em 3,40 a 3,53 ppm, correspondentes a grupos metoxil das unidades galactopiranosídicas (Figura 25a, b, c).

Os espectros de RMN de ^{13}C da fração FCS-3 (Figura 26) e FCS-3D (Figura 27) mostraram-se complexos, apresentando pelo menos dez sinais na região anomérica. No espectro de RMN de ^{13}C da fração FCS-3, dois sinais anoméricos evidentes estão presentes em 100,6 e 97,9 ppm. O primeiro é um sinal alargado e corresponde à sobreposição dos C-1 de unidades de β -D-galactopiranosose 2-sulfato (C-2 em 77,7 ppm) e α -L-galactopiranosose, de acordo com o espectro de RMN de HSQC (Figura 28a), que apresenta as correlações do sinal em 100,6 ppm com seus prótons geminais α - e β -anoméricos em 5,30 e 4,64; 4,75 ppm, respectivamente.

Unidades anidrogactopiranosídicas constituindo as díades de G(6M) \rightarrow LA G(6M) \rightarrow LA2M foram assinaladas com base nas correlações em 102,0/4,59;

102,3/4,59 e 102,5/4,49, atribuídas às unidades β -D-galactosídicas e em 97,9/5,16 e 98,3/5,20 ppm para unidades de 3,6-anidro- α -L-galactopirranose e seu derivado 2-O-metil, respectivamente (Tabela 13). A correlação C-1/H-1 em 98,7/5,20 ppm também foi atribuída às unidades de 3,6-anidrogalactopirranose. O deslocamento de +0,8 ppm no espectro de ^{13}C foi atribuído ao efeito das unidades de β -D-galactopirranose vizinhas sulfatadas em C-2, podendo estas serem piruvatadas ou não. Esse efeito de deslocamento para campo baixo no C-1 das unidades de 3,6-anidrogalactose, quando vizinhas às unidades de β -D-galactose 2-sulfato foi descrito por Usov e Elashvili (1991) para as agaranas produzidas pela alga vermelha *Laurencia nipponica*.

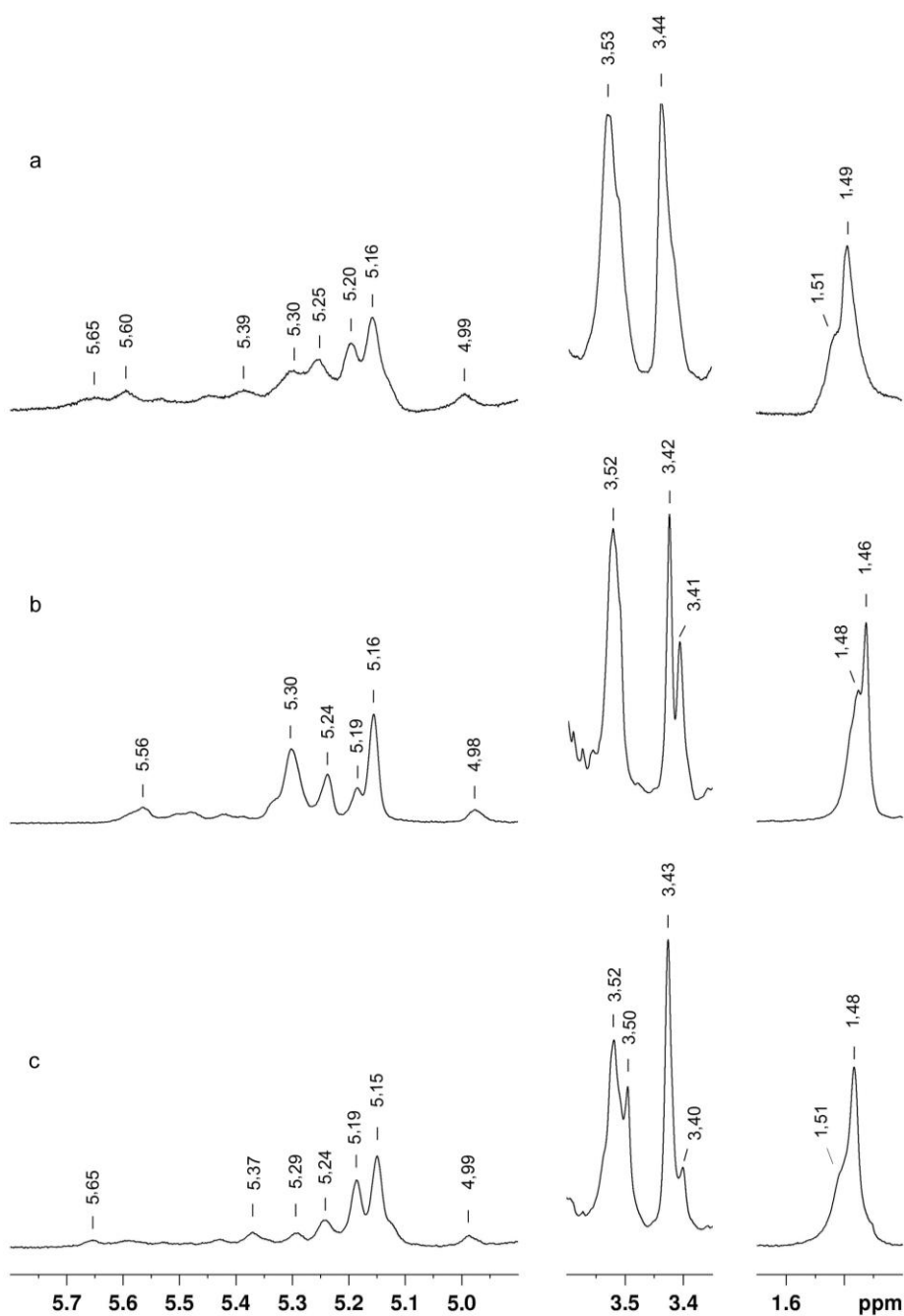
Em se tratando da fração FCS-3, após dessulfatação (Figura 27), a perda do sulfato em C-2 das unidades vizinhas, provocou o deslocamento da ressonância das unidades anidrogalactosídicas mencionadas acima. Deste modo, uma nova correlação anomérica em 97,8/5,24 ppm (Figura 28b) foi assinalada para as unidades de 3,6-anidrogalactose (C-2-C-6/H-2 em 69,4/4,13; 79,6; 76,9, 75,2; 69,0 ppm) ligadas e/ou adjacentes a unidades de β -D-galactose piruvatadas (C-1-C-2/H-1-H-2, C-3, C-4-C-6/H-4-H-6 em 101,7-102,3/4,59; 69,4/3,63; 79,0; 71,0/4,34; 66,2/3,60; 64,8/4,07 e 3,96 ppm) (LAHAYE *et al.*, 1989; GONÇALVES *et al.*, 2002).

O assinalamento do sinal em 5,24 ppm é consistente com o efeito de deslocamento para mais ppm (campo baixo) que as unidades de galactose piruvatadas provocam no C-1 das unidades de 3,6-anidrogalactopirranose, como previamente observado para a espécie produtora de agaranas piruvatadas *Gracilaria dura* (MURANO *et al.*, 1993).

Adicionalmente, o espectro de RMN de ^{13}C da fração FCS-3 (Figura 26), apresenta um sinal anomérico de baixa intensidade em 96,4 ppm, que foi atribuído ao C-1 das unidades de 3,6-anidro- α -L-galactose, quando ligadas a unidades de β -D-galactose 4-sulfato (G2S,4S,6M, Tabela 10) (USOV; YAROTSKY; SHASHKOV, 1980), bem como a unidades de 3,6-anidro- α -L-galactose 2-sulfato. O deslocamento de -1,5 ppm (*upfield* – para campo alto) observado para o C-1 das unidades de 3,6-anidrogalactose que apresentam sulfatação no C-2 é similar ao observado para outras galactanas, como *Cryptonemia crenulata* (ZIBETTI *et al.*, 2005), *Jania rubens* (NAVARRO; STORTZ, 2008) e *Cryptonemia seminervis* (ZIBETTI *et al.*, 2009), que apresentaram deslocamentos de -1,3 a -1,7 ppm. Após dessulfatação (Figura 27),

houve quase o desaparecimento do sinal em 96,4 ppm, o que está de acordo com os assinalamentos previamente feitos.

FIGURA 25 – ESPECTRO DE RMN DE ^1H DA FRAÇÃO FCS-3 NATIVA (a), DESSULFATADA (FCS-3D) (b) E ÁLCALI-TRATADA (FCS-3T) (c) OBTIDA DE *P. flagellifera*



* Deslocamentos expressos em relação à acetona ($\delta = 2,224$ ppm).

O espectro de HSQC da fração FCS-3 (Figura 28a) mostrou ainda correlações que foram assinaladas como L3R,6S, L3S,6S e L6S (100,6/5,30 e 101,2/5,25 ppm), L2S (99,2/5,39 ppm), L2M,6S, L2M,3S,6S (96,9/5,60 e/ou 97,1/5,60 ppm). O sinal em 103,0 ppm (próton geminal em 4,61 ppm) foi atribuído às unidades de β -D-galactose (substituídas ou não em C-6) ligadas a unidades α -L-galactosídicas (LAHAYE; YAPHE; ROCHAS, 1985).

No espectro de RMN de ^{13}C da agarana dessulfatada (FCS-3D, Figura 27), o sinal em 97,8 ppm, correspondente às unidades de 3,6-anidro- α -L-galactopirranose, se mostrou aumentado, enquanto os sinais em 96,4 e 98,7 ppm desapareceram, em acordo com a remoção dos grupos sulfato no C-2 destas mesmas unidades e das unidades de β -D-galactose vizinhas, respectivamente. Adicionalmente, o sinal em 77,7 ppm, correspondente ao C-2 de unidades de β -D-galactose 2-sulfatadas, diminuiu significativamente (quase desapareceu), concomitante ao aumento dos sinais anoméricos 101,7-103,2 ppm, correspondentes a unidades de β -D-galactose sem substituição no C-2 (Figura 27).

FIGURA 26 – ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DA AGARANA NATIVA FCS-3 OBTIDA DE *P. flagellifera*

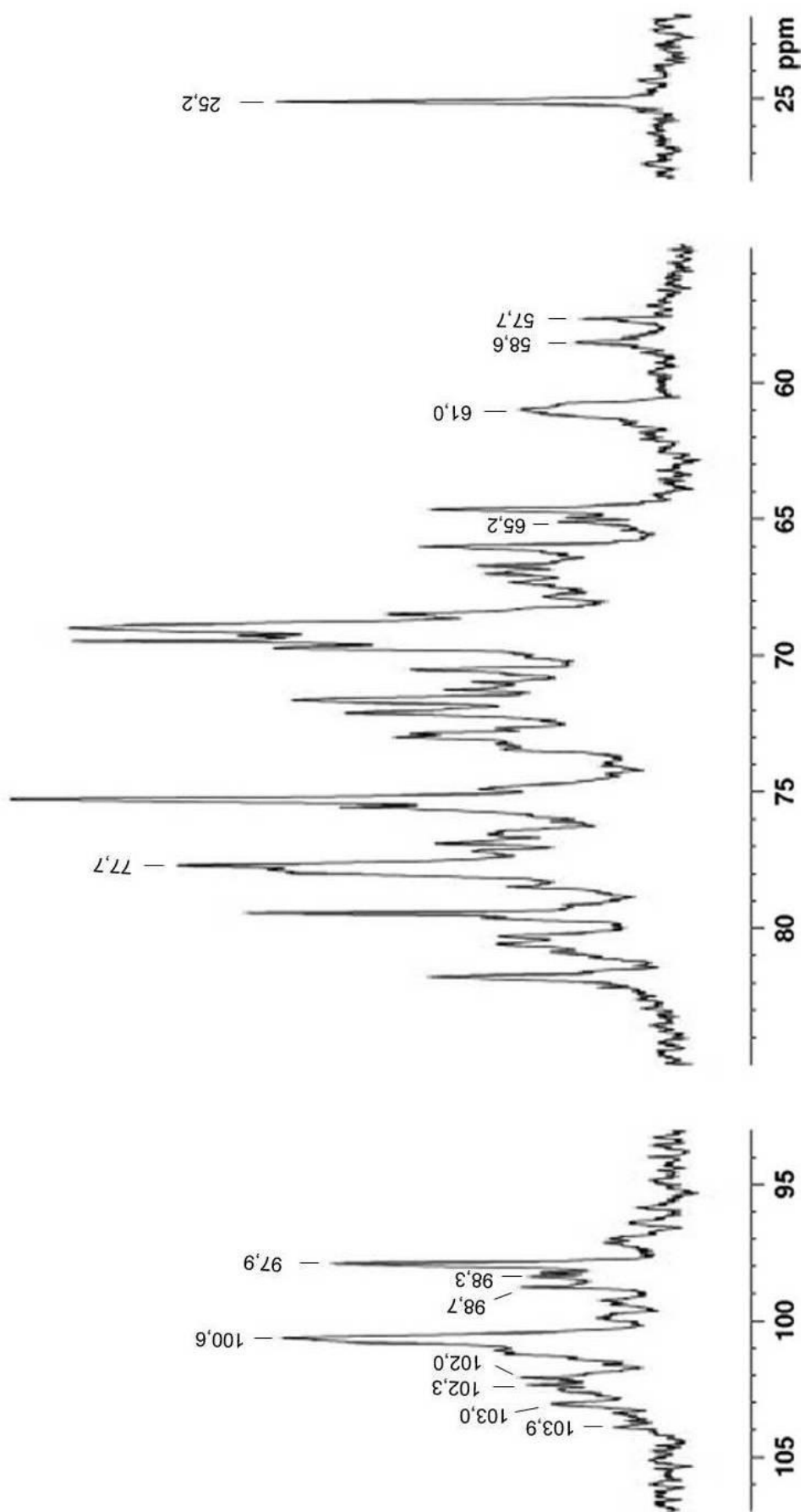


FIGURA 27 – ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DA AGARANA DESSULFATA FCS-3D OBTIDA DE *P. flagellifera*

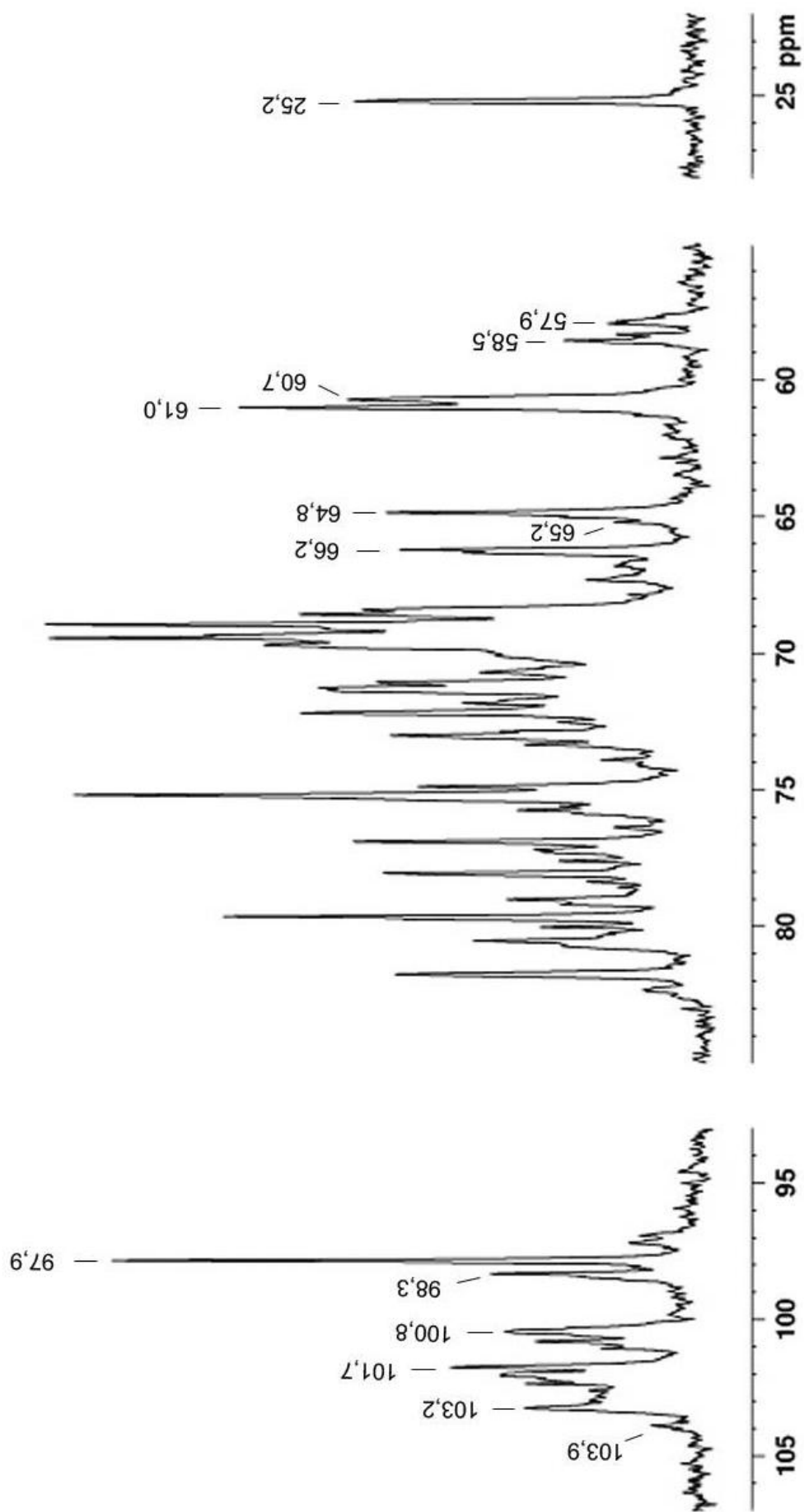
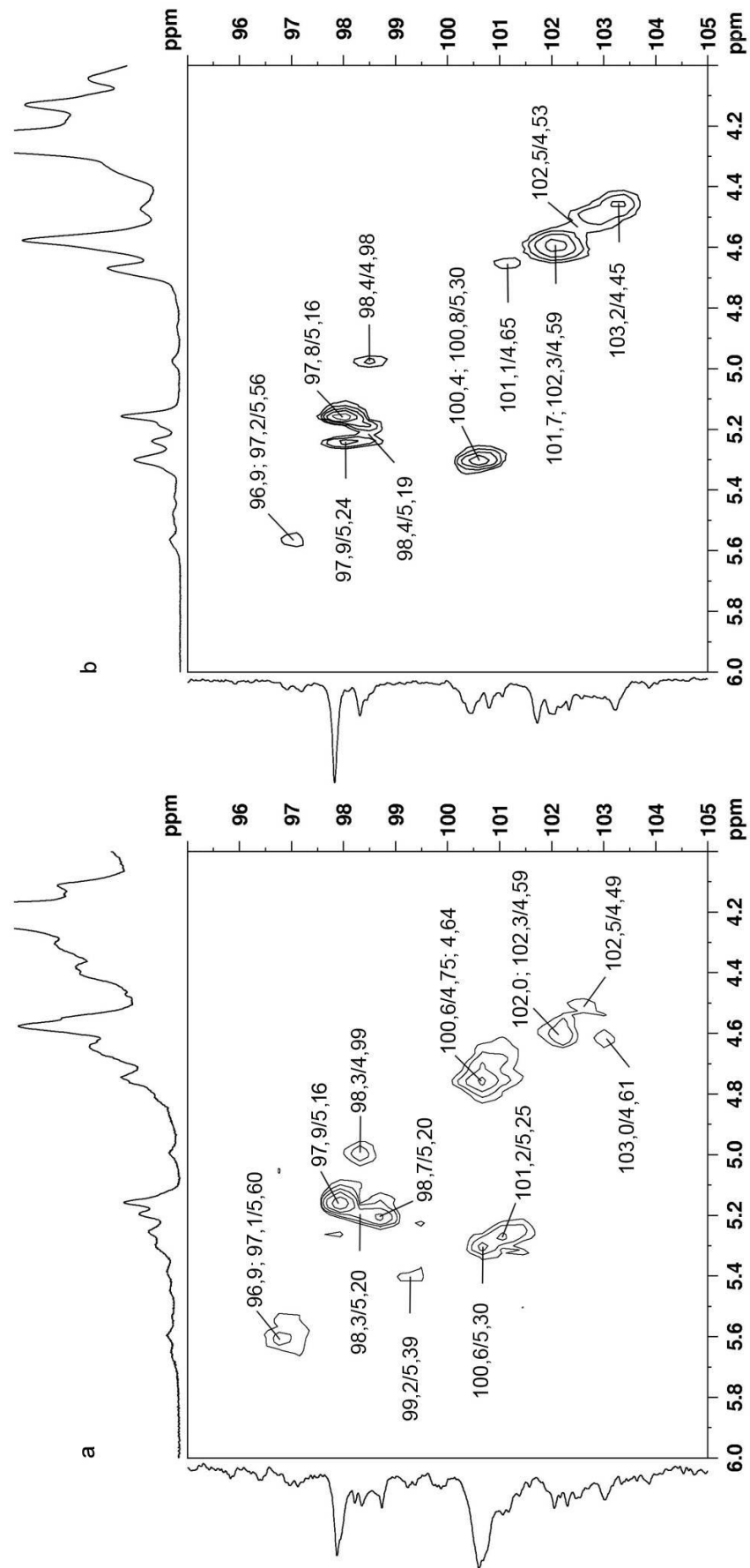


FIGURA 28 – REGIÃO ANOMÉRICA DO ESPECTRO DE HSQC DE AGARANA NATIVA FCS-3 E DESSULFATADA FCS-3D
 OBTIDA DE *P. flagellifera*



Analisando o espectro de HSQC da fração FCS-3D (Figura 28b), foi possível assinalar as correlações dos C-1-C-6/H-1-H-6 das unidades G (101,7-102,3/4,59; 69,7/3,63; 81,7/3,77 68,4/4,12; 74,9/3,72; 61,0/3,76 ppm) e G6M (101,7-102,3/4,59; 69,7/3,63; 81,7/3,77; 68,6/4,12; 73,0/3,85; 71,2/3,68 ppm) ligadas a LA (97,8/5,16; 69,4/4,13; 79,6/4,58; 76,9/4,67; 75,2/4,58; 69,0/4,19 e 4,03 ppm). A correlação anomérica em 102,5/4,53 foi atribuída a unidades de G, G6M e/ou GP ligadas a LA2M (C-1/H-1 em 98,4/5,19 ppm), sendo observados os sinais de C-2-C-6 desta última unidade em 78,4; 78,0; 77,3; 72,5 e 68,9 ppm, respectivamente. Adicionalmente, o espectro de HSQC da fração FCS-3D apresentou as correlações de C-1/H-1 em 102,9/4,49 e em 103,2/4,45 ppm, que foram atribuídas a unidades de β -D-galactose (piruvatadas, 6-O-metiladas e/ou 6-O-glicosiladas) ligadas a unidades de L-galactose glicosiladas em C-3 ou não substituídas (C-1/H-1 em 100,4; 100,8/5,30 ppm, C-2-C-6 em 69,0; 70,7; 79,0; 71,7; 60,7 ppm (Figura 28b)). Correlações em 96,9; 97,2/5,56 ppm foram assinaladas como correspondentes a unidades de 2-O-metil-galactose.

Os sinais correspondentes a unidades simples de xilose que estão glicosilando o C-3 das unidades de α -L-galactose puderam ser localizados no espectro de RMN de ^{13}C e de HSQC da fração FCS-3D, sendo estes 101,1/4,65; 73,4/3,40; 75,5/3,50; 69,4 e 65,2/3,33 e 4,0 ppm, correspondentes ao C-1-C-3/H-1-H-3, C-4 e C-5/H-5, H-5', respectivamente (SHASHKOV *et al.*, 1988). A xilosilação em C-3 das unidades de α -L-galactose foi descrita para agaranas obtidas de outras espécies de algas, como *Laurencia nipponica* (USOV; ELASHVILI, 1991), *Chondria macrocarpa* (FURNEAUX; STEVENSON, 1990), e para uma espécie produtora de carragenana do gênero *Callophycus* (CHIOVITTI *et al.*, 1997). Diferentemente, para a agarana obtida de *Laurencia undulata*, foi descrita a presença de unidades de xilose substituindo o C-4 das unidades de β -D-galactose (HIRASE, *et al.*, 1982). No presente trabalho, os assinalamentos para as unidades estão de acordo com os que foram realizados por Usov e Elashvili (1991), que utilizaram um pentassacarídeo obtido por hidrólise redutiva parcial a partir das agaranas produzidas pela alga *Laurencia nipponica*.

Ainda, analisando-se o espectro de RMN de ^{13}C e de HSQC da fração FCS-3D, o sinal em 103,9 ppm (com seu próton geminal em 4,62 ppm) foi atribuído a unidades simples de β -D-galactose e/ou β -D-xilose como cadeias laterais

substituindo o C-6 das unidades de β -D-galactose e/ou algumas das unidades de α -L-galactose que são substituídas em C-3. Devido à baixa intensidade, esta correlação pôde ser observada no espectro de HSQC apenas quando este foi examinado em altas intensidades; estes dados estão de acordo com as análises de metilação (Tabela 10). O sinal anomérico em 98,4/4,98 ppm foi atribuído a unidades simples de α -galactose (VINOGRADOV; KUBLER-KIELB; KORENEVSKY, 2008) e/ou 2,3-di-O-metil-galactose (NAVARRO *et al.*, 2011) glicosilando o C-6 das unidades de β -D-galactose e/ou parte de algumas das unidades de α -L-galactose que são glicosiladas em C-3.

O sinal de alta intensidade observado em campo alto, em 25,2 ppm, que foi observado no espectro de RMN de ^{13}C da fração FCS-3 e sua derivada dessulfatada FCS-3D (Figuras 26 e 27), foi assinalado como referente ao carbono metílico do grupo acetal de ácido pirúvico que está presente na configuração R (GAREGG; LINDBERG; KVARNSTRÖM, 1979). Adicionalmente, para FCS-3 e FCS-3D, foi observado também o sinal em 175,5 ppm, correspondente ao carbono do grupo carboxílico presente no acetal de ácido pirúvico (LAHAYE *et al.*, 1989).

Nos espectros de HSQC das frações FCS-3 e FCS-3D (Figura 28 a,b), podem ser observadas as correlações em 25,2/1,49; 1,51 ppm e em 25,2/1,46; 1,48 ppm, respectivamente, que é consistente com a presença de unidades de β -D-galactopiranosose carregando acetal de ácido pirúvico (IZUMI, 1973; LAHAYE *et al.*, 1989). Através do espectro de HMBC pôde ser confirmado que os grupos metil e carboxila mencionados acima são correspondentes a grupos de acetal de ácido pirúvico, visto que foram observadas as conectividades entre os sinais em 175,5/1,46; 1,48 ppm e em 100,8/1,46; 1,48 ppm (Figura 29b). Deste modo, o sinal do carbono acetálico pôde ser localizado com precisão no espectro de RMN de ^{13}C da fração FCS-3D, estando em 100,8 ppm (GORIN *et al.*, 1982; CHIOVITTI *et al.*, 1997).

No espectro de RMN de ^{13}C das frações FCS-3 e FCS-3D foram observados os sinais em 66,0 e 66,2 ppm, respectivamente, correspondentes ao C-5 das unidades de 4,6-O-(1'-carboxietilideno)- β -D-galactopiranosose, e em 64,7 e 64,8 ppm, respectivamente, correspondente ao C-6 destas mesmas unidades (LAHAYE *et al.*, 1989).

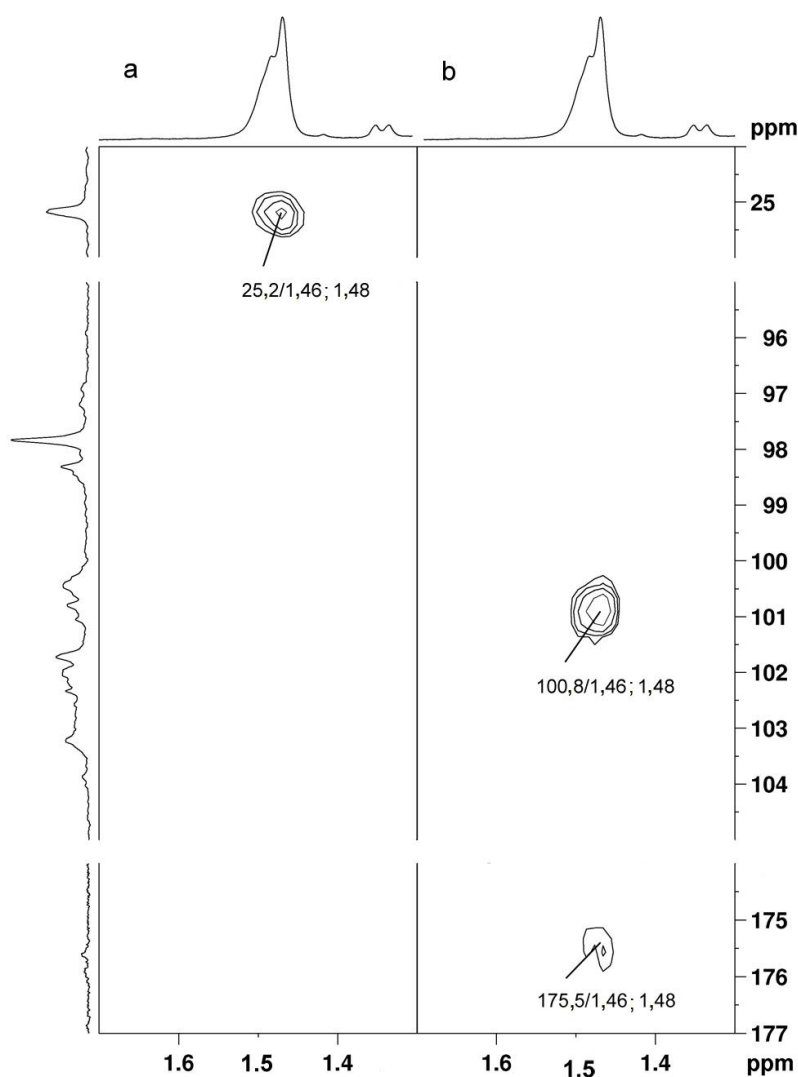


FIGURA 29 – REGIÕES DOS ESPECTROS DE HSQC (a) E HMBC (b) DA AGARANA DESSULFATADA FCS-3D

O espectro de RMN DEPT da fração FCS-3 (Figura 30) (e FCS-3D (Figura 31)) apresentou diversos sinais invertidos, sendo eles: 71,3 (71,2); 69,0 (68,9); 64,7 (64,8) e 61,0 (60,7) ppm, que foram atribuídos aos C-6 das seguintes unidades: 6-O-metil-galactose, 3,6-anidro- α -L-galactopiranosose, 4,6-O-(1'-carboxietilideno)- β -D-galactopiranosose e unidades galactopiranosídicas sem substituição, respectivamente.

Os sinais em 65,2 e 65,0 ppm foram assinalados como o C-5 das unidades de xilose (BOCK; PEDERSEN; PEDERSEN, 1984).

TABELA 13 – DESLOCAMENTOS QUÍMICOS (ppm) NA REGIÃO ANOMÉRICA DOS ESPECTROS DE RMN DA AGARANA NATIVA FCS-3 E DESSULFATADA FCS-3D OBTIDA DE *P. flagellifera*

Díades e/ou unidades	Fração			
	FCS-3		FCS-3D	
	Unidade A C-1/H-1	Unidade B C-1/H-1	Unidade A C-1/H-1	Unidade B C-1/H-1
G(6M)→LA	102,0; 102,3/4,59	97,9/5,16	102,3; 101,7/4,59	97,8/5,16
G(6M)(R)→LA2M	102,5/4,49	98,3/5,20	102,5/4,53	98,4/5,19
G(P)2S→LA	100,6/4,64; 4,75	98,7/5,20		
LA2S		96,4		
G2S,4S,6M→LA	100,6/4,64; 4,75	96,4		
GP→LA			102,3; 101,7/4,59	97,8/5,24
G(6M)(6S)→L6S	103,0/4,61	100,6/5,30 101,2/5,25		
L2S		99,2/5,39		
L3R,6S, L3S,6S , L6S		100,6/5,30 101,2/5,25		
G(P)(6M)(6R)→L(3R)		-	102,9/4,49 103,2/4,45	100,4; 100,8/5,30
L2M,6S, L2M,3S,6S		96,9/5,60 97,1/5,60		
L2M				96,9; 97,2/5,56

O experimento de DEPT da fração FCS-3 apresentou também a inversão dos sinais em 66,8; 67,4 e 67,2, que foram atribuídos ao C-6 de unidades de galactose substituídas neste carbono. O sinal em 67,0 ppm, que se mostrou não invertido foi atribuído ao C-2 das unidades de α -L-galactose 6-sulfato xilosiladas no C-3 (L3X,6S), estando este assinalamento de acordo com o que foi previamente descrito para o oligossacarídeo obtido a partir da agarana de *Laurencia nipponica* (USOV; ELASHVILI, 1991).

No espectro de RMN da fração FCS-3D foi observado o desaparecimento dos sinais em 67,4 e 67,2 ppm, indicando que esses são correspondentes a unidades de galactose sulfatadas no C-6. O sinal em 66,8 ppm que apenas diminuiu após a dessulfatação, foi atribuído às unidades de β -D-galactose 6-sulfato, quando ligadas a unidades de 3,6-anidro- α -L-galactose (LAHAYE *et al.*, 1989; PRADO; CIANCIA; MATULEWICZ, 2008) e também a unidades de β -D-galactose 6-O-glicosiladas por unidades de simples de xilose, 2,3-di-O-metil-galactose e/ou galactose (USOV; BILAN; SHASHKOV, 1997; ZIBETTI *et al.*, 2005; ZIBETTI *et al.*, 2009). O assinalamento do C-6 das unidades de α -L-galactose 6-sulfato foi realizado com base no desaparecimento desse sinal no espectro de RMN de ^{13}C da fração alcali-tratada (FCS-3T, Figura 32).

Considerando os resultados apresentados no parágrafo acima, o sinal em 67,4 ppm foi assinalado como correspondente ao C-6 das unidades de α -L-galactose 6-sulfato glicosiladas em C-3 (L3R, 6S) (USOV; ELASHVILI, 1991) e α -L-galactose 3,6-sulfato (L3S,6S).

FIGURA 30- ESPECTRO DE RMN DE DEPT DA AGARANA NATIVA FCS-3 OBTIDA DE *P. flagellifera*

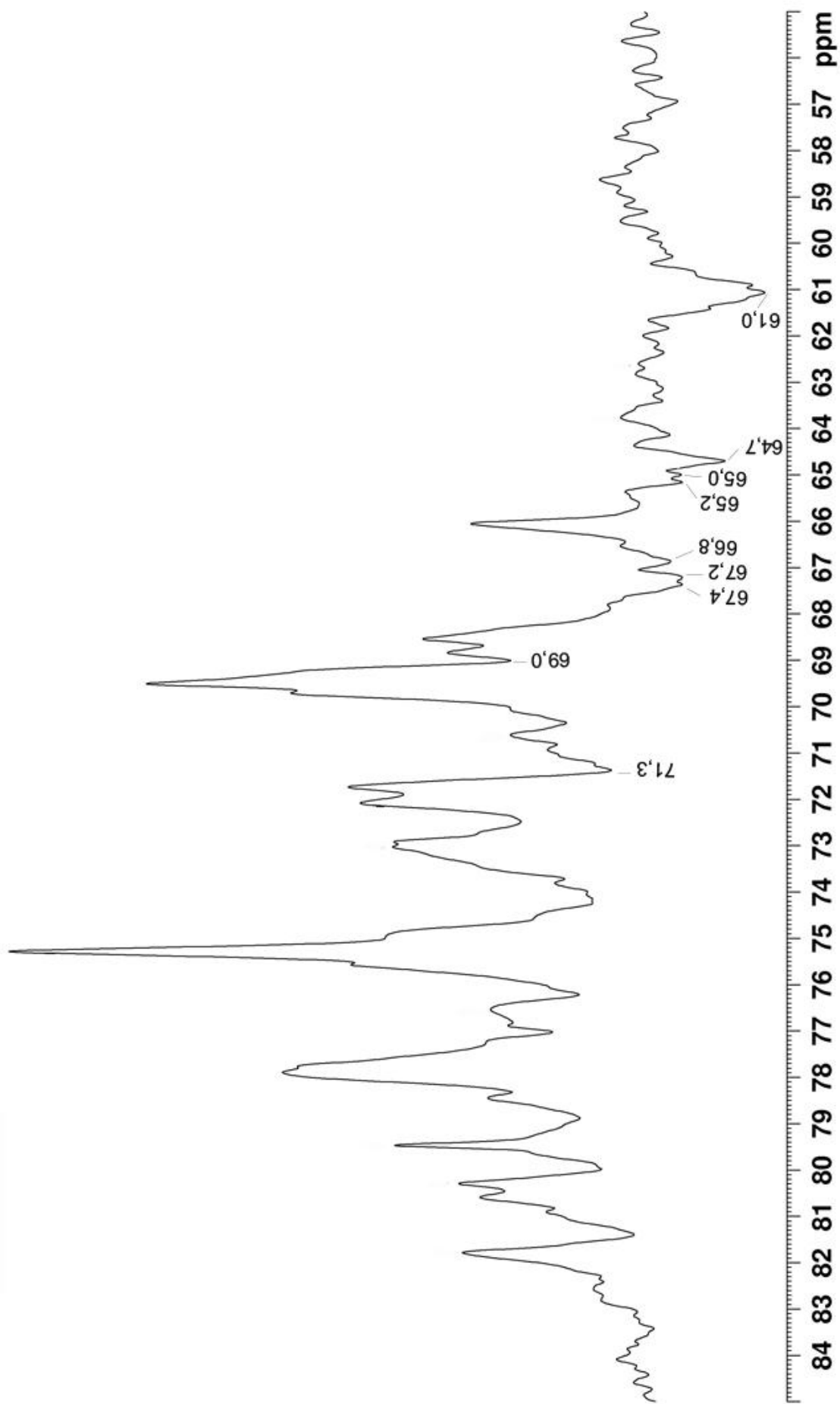
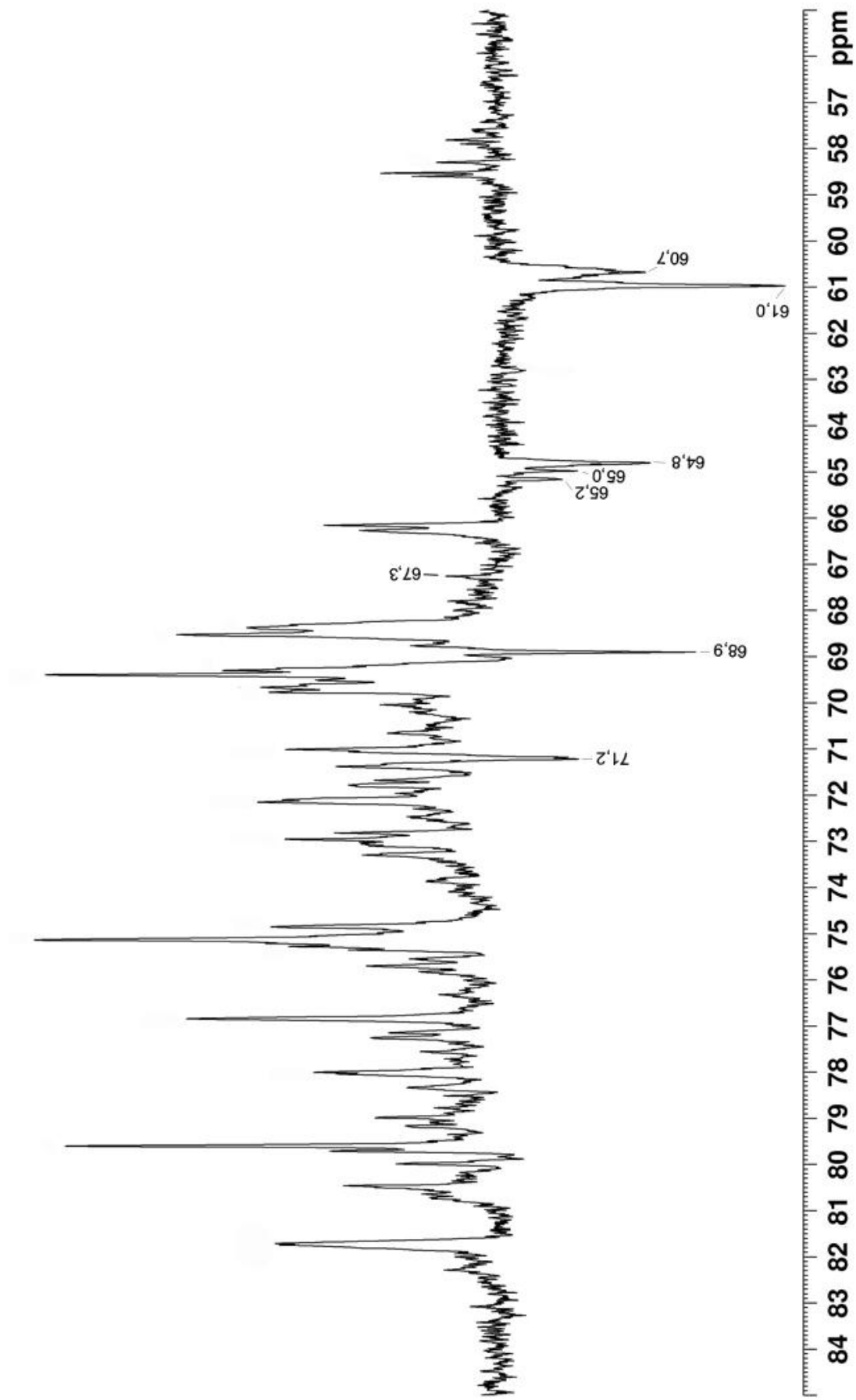


FIGURA 31– ESPECTRO DE RMN DE DEPT DA AGARANA DESSULFATADA FCS-3D (*P. flagellifera*)



Adicionalmente, o sinal em 67,3 ppm, que se mostrou não invertido no experimento de DEPT da fração FCS-3D foi atribuído ao C-2 das unidades de α -L-galactose substituídas em C-3 por unidades de simples de xilose (L3X).

No que diz respeito aos grupos O-metil presentes na agarana da alga *P. flagellifera*, o espectro de RMN de ^{13}C da fração nativa, foram observados dois sinais alargados em 58,6 e em 57,7 ppm (Figura 26). O espectro de HSQC mostra que o primeiro sinal correlaciona com os prótons em 3,44 e em 3,53 ppm (sinal alargado e com um ombro à direita), sendo estas correlações atribuídas aos grupos metoxil presentes nas unidades de 6-O-metilgalactose e 2-O-metil-3,6-anidro- α -L-galactose, respectivamente (LAHAYE *et al.*, 1989). A correlação $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ em 57,7/3,53 ppm foi atribuída ao grupo metoxil das unidades de 2-O-metilgalactose (NAVARRO; STORTZ, 2008).

Após a dessulfatação solvolítica, o espectro de ^1H da fração FCS-3D apresentou um novo sinal em 3,41 ppm, além daqueles em 3,52 e 3,42 ppm, que já estavam presentes na fração FCS-3. As correlações no espectro de HSQC, da fração FCS-3D, em 58,6/3,42 e 58,6/3,41 ppm foram atribuídas ao grupo metoxil das unidades de 6-O-metil- β -D-galactose quando estas se encontram ligadas a unidades de 3,6-anidro- α -L-galactose e α -L-galactoses, respectivamente, enquanto que as correlações em 57,8; 57,9/3,52 ppm e 58,6/3,52 ppm correspondem aos grupos metoxil presentes no C-2 de unidades de 2-O-metil- α -L-galactose e 3,6-anidro-2-O-metil- α -L-galactose, respectivamente.

O espectro de RMN de ^1H da fração álcali-tratada (FCS-3T, Figura 25c), quando comparado ao da fração FCS-3D (Figura 25b), mostrou um decréscimo do sinal em 3,40 ppm, que foi acompanhado do aumento do sinal em 3,43 ppm, demonstrando que no polissacarídeo nativo as unidades de 6-O-metil- β -D-galactose se encontram ligadas tanto a unidades precursoras quanto a não-precursoras das unidades de 3,6-anidro- α -L-galactose, respectivamente.

Considerando-se que os sinais de metoxil (3,53-3,50 e 3,44-3,40 ppm) se encontram parcialmente sobrepostos aos sinais dos C-2 e C-3 das unidades de xilose (H-2 e H-3 em 3,40 e 3,50 ppm, respectivamente), a integração das áreas desses grupos O-metil não foram utilizados para realizar a quantificação relativa desses componentes.

Levando-se em consideração o efeito negativo que o acetal de ácido pirúvico promove na recuperação das unidades de 3,6-anidrogactose e seu derivado 2-O-metil, o conteúdo desses açúcares anidro foi calculado utilizando a integração das áreas relativas obtidas do espectro de próton da fração dessulfatada. Para isso, foi utilizada a soma das áreas relativas do 3,6-anidro- α -L-gactose e seu derivado 2-O-metil (0,84:0,45:0,25, obtidas dos sinais em 5,16; 5,24 e 5,19 ppm, respectivamente) dividida pela soma das áreas obtidas para as unidades de α -L-gactose e seu derivado 2-O-metil (1,0:0,21, obtidas dos sinais em 5,30 e 5,56 ppm, respectivamente). A razão calculada foi 1,27:1 e indica que a percentagem total de unidades de 3,6-anidro- α -L-gactose presente no polissacarídeo é de 28%, em relação às unidades A e B. Deste total, 15,3% representa as unidades de 3,6-anidro- α -L-gactose que constituem as díades G(6M)(6R) \rightarrow LA e 8,2% representa as unidades de LA ligadas e/ou adjacentes a GP. As unidades de LA2M (4,5% das unidades anidrogactosídicas) podem estar ligadas a unidades de G, G6M e/ou G6R (Tabela 10).

Os resultados descritos no parágrafo acima demonstram que o conteúdo de unidades 3,6-anidrogactosídicas é de 60 a 80% maior do que os que foram obtidos pelas análises utilizando hidrólise redutiva total (Tabelas 6 e 10), estando estes dados de acordo com os resultados obtidos, ou seja, a baixa recuperação de unidades anidrogactosídicas quando este procedimento de hidrólise é aplicado a gactanas que apresentam altos teores de unidades de β -D-gactose contendo acetal de ácido pirúvico e/ou unidades de 3,6-anidrogactose 2-sulfato (CHIOVITTI *et al.*, 1997). Em contrapartida, os teores das unidades de α -L-gactose e seu derivado 2-O-metil (18,2 e 3,8%) se encontram de acordo com dados obtidos pelas análises de metilação (18,6 e 4,0 mol %, respectivamente) (Tabela 10).

Tendo em vista os resultados apresentados, pode-se concluir que para a agarana FCS-3, que se apresenta altamente piruvatada, a utilização da integração das áreas da região α -anomérica do espectro de RMN de ^1H da fração dessulfatada FCS-3D) fornece dados que retrata de maneira mais fiel o conteúdo de unidades de 3,6-anidrogactose, quando comparados esses resultados aos obtidos das análises de metilação e composição monossacarídica.

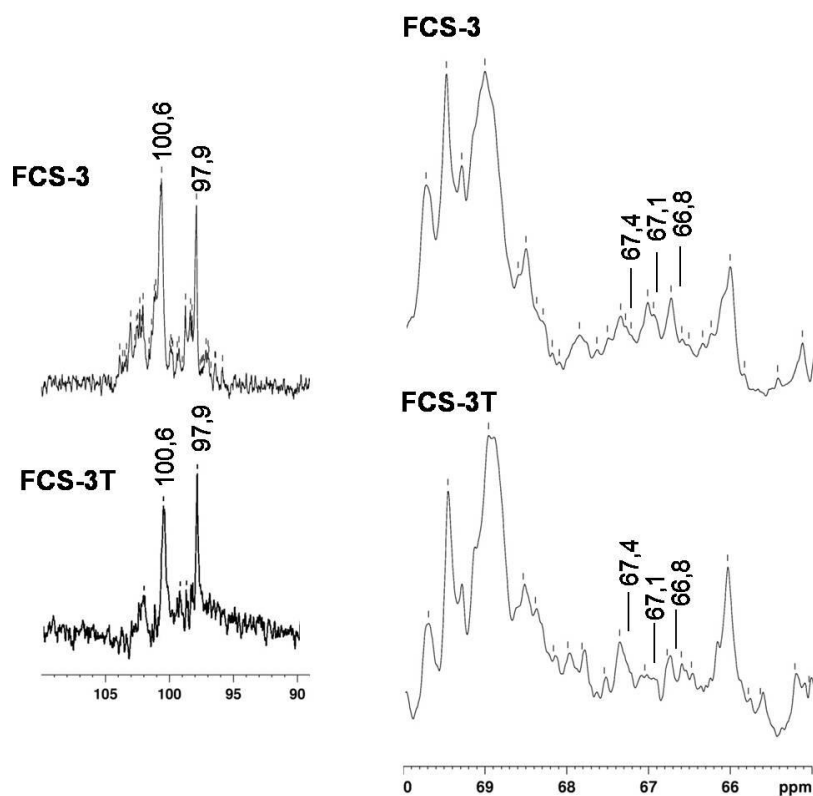


FIGURA 32 – ANÁLISE DE RMN DE ^{13}C DA AGARANA NATIVA FCS-3 E APÓS TRATAMENTO ALCALINO FCS-3T OBTIDA DE *P. flagellifera*

4.4 POLISSACARÍDEOS DE *L. aldingensis* e *L. filiformis*

As frações polissacarídicas obtidas das algas *L. aldingensis* (AC e AH) e *L. filiformis* (LC e LH) (item 4.1), após tratamento com KCl 2,0M, deram origem às frações precipitadas (ACP, AHP, LCP e LHP) e solúveis em KCl 2,0M (ACS, AHS, LCS e LHS) (item 4.2).

As algas vermelhas do complexo *Laurencia P. flagellifera* e *P. papillosa* produzem, além de galactanas sulfatadas, polissacarídeos do tipo xilomananas sulfatadas (CARDOSO *et al.*, 2007). Sendo assim, as frações precipitadas com KCl 2,0M obtidas a partir das algas *L. aldingensis* (ACP e AHP) e *L. filiformis* (LCP e LHP) foram submetidas à análises químicas e espectroscópicas (RMN de ^{13}C) para verificar se estas espécies também produzem polissacarídeos do tipo xilomananas sulfatadas.

Os polissacarídeos solúveis em KCl 2,0M obtidos tanto da alga *L. aldingensis* (ACS, AHS) quanto da alga *L. filiformis* (LCS, LHS) se apresentaram como constituintes majoritários absolutos destas espécies, com rendimentos de 86,0 a 98,5% (item 4.2, Tabela 2). Deste modo, os polissacarídeos solúveis em KCl 2,0M obtidos destas espécies de *Laurencia* serão utilizados para a caracterização dos polissacarídeos biossintetizados por estas algas.

4.4.1 Análise de composição monossacarídica das frações precipitadas e solúveis em KCl 2,0 M obtidas das algas *L. aldingensis* e *L. filiformis*

As frações polissacarídicas precipitadas com KCl 2,0M das algas *L. aldingensis* (ACP e AHP) e *L. filiformis* (LCP e LHP) foram analisadas quanto a composição monossacarídica (Tabela 14) e essa análise mostrou que assim como nas respectivas frações solúveis (ACS e AHS para *L. aldingensis*, e LCS e LHS para *L. filiformis*), galactose está presente como componente majoritário (48,7 a 69,3%), seguido de 3,6-anidrogactose (11,1 a 17,9%) e 6-O-metilgalactose (6,1 a 13,3%). Menores percentagens de 4-O-metilgalactose (traços a 2,7%) e xilose (3,7-6,8%) também estão presentes nestas frações. A presença de glicose (1,0-16,8%), que é maior nas frações obtidas por extração aquosa a 25°C e precipitadas com KCl (13,4% em ACP e 16,8% em LCP) pode ser devido a presença de amido das florídeas, que é o polissacarídeo de reserva das algas vermelhas (PERCIVAL, 1979; McCANDLESS, 1981; NAVARRO; STORTZ, 2008; PRADO; CIANCIA; MATULEWICZ, 2008).

As frações precipitadas com KCl apresentam de 3,4 a 8,0% de manose em suas composições. Já as frações solúveis em KCl 2,0M apresentaram ~1,5% deste monossacarídeo, exceto LHS, que se apresentou livre deste constituinte.

Apesar da significativa presença de manose nas frações KCl-precipitadas, a análise de composição monossacarídica indica que estas são constituídas majoritariamente por galactanas sulfatadas, e tendo em vista os baixos rendimentos apresentados por estas frações (1,5 a 14%), não foi possível por esta análise detectar a presença de xilomananas sulfatadas em *L. filiformis* e *L. aldingensis*.

TABELA 14 - ANÁLISE DE COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES PRECIPITADAS E SOLÚVEIS EM KCl 2,0 M

ALGA	FRAÇÃO	MONOSSACARÍDEO (MOL %) ^(a)						
		Gal	6-Me-Gal	3,6-AG	4-Me-Gal	Xyl	Glc	Man
<i>L. aldingensis</i>	ACP	54,2	6,1	14,0	2,4	5,7	13,4	4,2
	ACS	59,3	11,0	14,2	2,7	6,5	4,6	1,7
	AHP	69,3	5,6	13,6	tr	3,7	4,4	3,4
	AHS	62,5	13,3	15,9	tr	5,6	1,4	1,3
<i>L. filiformis</i>	LCP	48,7	7,1	11,1	4,1	4,2	16,8	8,0
	LCS	66,9	9,1	14,8	1,2	6,4	1,6	-
	LHP	64,0	7,6	12,9	-	4,7	3,6	7,2
	LHS	61,0	13,2	15,3	1,2	6,8	1,0	1,5

^a = Monossacarídeos analisados por CG-EM na forma de acetatos de alditol, estando o monossacarídeo 2-Me-AG presente como traços em todas as frações.

tr = percentagens menores que 1% foram consideradas traços.

- = não detectado

4.4.2 Caracterização química das frações brutas, precipitadas e solúveis em KCl 2,0M obtidas a partir das algas *L. aldingensis* e *L. filiformis*.

Após tratamento com KCl 2,0M, as frações solúveis em KCl foram as que apresentaram os maiores rendimentos (86 a 98,5%) (item 4.2, Tabelas 2 e 15). De modo geral, essas frações apresentaram maiores teores de carboidratos (59,3% a 66,3%) e de grupos sulfato (20 a 21,4%), quando comparadas às frações precipitadas em KCl 2,0 (37,6 a 54,2% de carboidratos e 10,3 a 17,9% de grupos sulfato). Além disso, os teores protéicos das frações solúveis em KCl 2,0M (3,2 a 7,6%) foram bem inferiores aos observados nas frações KCl-precipitadas (16,3 a 30,1%). Deste modo, o tratamento com KCl 2,0M foi eficiente para a precipitação das proteínas presentes nas frações de galactanas obtidas das algas *L. aldingensis* e *L. filiformis* por extrações aquosas a 25 °C e 80 °C.

Adicionalmente, as frações solúveis em KCl 2,0M apresentaram valores de rotação específica entre $-41,0^\circ$ e $-47,0^\circ$ sendo estes valores altamente negativos um indicativo de que estas frações são compostas majoritariamente por galactanas sulfatadas do tipo agaranas. Nas frações precipitadas em KCl 2,0M, os valores de rotação óptica se apresentaram menos negativos, provavelmente devido à presença de altos teores de proteínas ou mesmo devido à presença de galactanas do tipo carragenanas que poderiam estar presentes como contaminantes e foram precipitadas após a adição de KCl 2,0M.

TABELA 15 – RENDIMENTO, ANÁLISES E ROTAÇÃO ESPECÍFICA DAS FRAÇÕES OBTIDAS DE *L. aldingensis* E *L. filiformis* POR EXTRAÇÃO AQUOSA (25 °C E 80 °C) E APÓS TRATAMENTO COM KCl 2,0M

Alga	Fração	Rendimento (%) ^(a)	Carboidratos (%)	NaSO ₃ (%)	Proteínas (%)	$[\alpha]_D^{25}$
<i>L. aldingensis</i>	AC ^(b)	6,6	58,8	17,3	10,4	-31,5
	ACP ^(c)	1,5	42,4	13,6	16,3	-17,0
	ACS ^(d)	98,5	61,3	20,0	5,7	-41,0
	AH ^(e)	32,0	63,4	19,6	5,5	-36,5
	AHP ^(c)	3,0	54,2	15,3	18,2	-21,0
	AHS ^(d)	97,0	66,3	21,0	3,2	-39,5
<i>L. filiformis</i>	LC ^(b)	19,0	58,4	18,6	8,3	-44,5
	LCP ^(c)	7,0	41,8	10,3	30,1	-34,0
	LCS ^(d)	93,0	66,0	21,4	7,6	-45,0
	LH ^(e)	26,0	64,3	19,2	4,8	-43,0
	LHP ^(c)	14,0	37,6	17,9	23,7	-31,0
	LHS ^(d)	86,0	62,3	20,5	4,3	-47,0

^a Rendimento em relação às algas secas e moídas para os extratos brutos, e em relação ao total de polissacarídeos recuperados após o tratamento com KCl 2,0M para as frações solúveis e precipitadas em KCl.

^{b, e} = Extratos brutos obtidos por extrações aquosas a 25 e 80°C, respectivamente.

^{c, d} = Frações precipitadas e solúveis em KCl 2,0M, respectivamente.

4.4.3 Análise de RMN de ^{13}C dos polissacarídeos precipitados em KCl 2,0 M obtidos das algas *L. aldingensis* e *L. filiformis*

As frações precipitadas ACP (Figura 33) e AHP (não mostrada), obtidas da alga *L. aldingensis*, apresentaram espectros de RMN de ^{13}C típicos de galactanas do tipo agaranas. Estas frações apresentaram alta viscosidade, resultando em espectros com uma baixa definição dos sinais. No entanto, puderam ser identificados sinais correspondentes às díades de galactanas contendo unidades de β -D-galactose (C-1 em 103,0 ppm) ligadas a α -L-galactose (C-1 em 100,7 ppm) (LAHAYE; YAPHE; ROCHAS, 1985), de β -D-galactose (C-1 em 101,8 ppm) ligadas a 3,6-anido- α -L-galactose (C-1 em 97,9 ppm) (LAHAYE *et al.*, 1989). Unidades de β -D-galactose 2-sulfato também podem estar presentes (C-1 em 100,7 ppm), estando estas ligadas a unidades de 3,6-anido- α -L-galactose (C-1 em 97,9 ppm) (DUARTE *et al.*, 2004). Sinais que se sobressaem em 69,0-69,4 ppm (C-2 de α -L-galactose ligada a β -D-galactose e C-6 de 3,6-anido- α -L-galactose ligada a unidades de β -D-galactose) e em 60,3-61,2 ppm correspondentes ao C-6 de unidades de galactose não substituídas foram também identificados nestas frações.

Os espectros de RMN de ^{13}C das frações LCP (não mostrado) e LHP (Figura 34), obtidas da alga *L. filiformis*, também apresentaram sinais típicos de galactanas sulfatadas do tipo agaranas, onde pode-se observar na região anomérica sinais em 103,0 correspondendo a unidades de β -D-galactose ligadas a unidades de α -L-galactose (C-1 em 100,7 ppm). Ressalta-se que o sinal em 100,7 ppm pode corresponder também ao C-1 de unidades de β -D-galactose 2-sulfato ligadas a 3,6-anidro- α -L-galactose (C-1 em 98,0 ppm). O sinal em 102,0 ppm pode ser correspondente ao C-1 de unidades de β -D-galactose, também ligadas a unidades de 3,6-anidro- α -galactose (C-1 em 98,0 ppm) (LAHAYE *et al.*, 1989). A fração LHP apresentou um sinal em 94,7 ppm, que pode ser correspondente a unidades de 3,6-anidro- α -D-galactose (MILLER, 1998). A presença de 3,6-anidrogalactose da série D pode indicar a presença de carragenanas co-precipitadas em conjunto com as agaranas ou mesmo a presença de um polissacarídeo do tipo híbrido D/L.

A análise RMN de ^{13}C da fração LHP (Figura 34) mostra ainda sinais que sobressaem, sendo estes em 75,3 ppm (C-5 de unidades de β -D-galactose ligadas a

α -L-galactose e também C-5 de unidades de 3,6-anidro- α -L-galactose ligadas a unidades de β -D-galactose), em 69,5 ppm (C-2 de unidades de β -D-galactose ligadas a α -L-galactose e C-2 de unidades de 3,6-anidro- α -L-galactose ligadas a unidades de β -D-galactose), e em 69,0-69,2 ppm (C-2 de α -L-galactose ligada a β -D-galactose e C-6 de 3,6-anidro- α -L-galactose ligada a unidades de β -D-galactose). O grupo de sinais em 60,9-61,2 ppm corresponde ao C-6 não substituído de unidades de galactose.

Tendo em vista os resultados obtidos pelas análises de composição monossacarídica (Tabela 14) somados ao baixo rendimento apresentado pelas frações de *L. aldingensis* e de *L. filiformis* precipitadas em KCl 2,0M, bem como os espectros de RMN de ^{13}C destas frações, nos quais não foi possível detectar a presença de sinais correspondentes a xilomananas sulfatadas, pode-se atribuir que, diferentemente das algas *P. flagellifera* e *P. papillosa*, *L. aldingensis* e *L. filiformis* bissintetizam apenas polissacarídeos do tipo agaranas sulfatadas, não sendo detectada a presença de xilomananas sulfatadas nestas duas espécies de *Laurencia*.

FIGURA 33 – ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DA FRAÇÃO PRECIPITADA COM KCL 2,0M ACP DE *L. aldingensis*

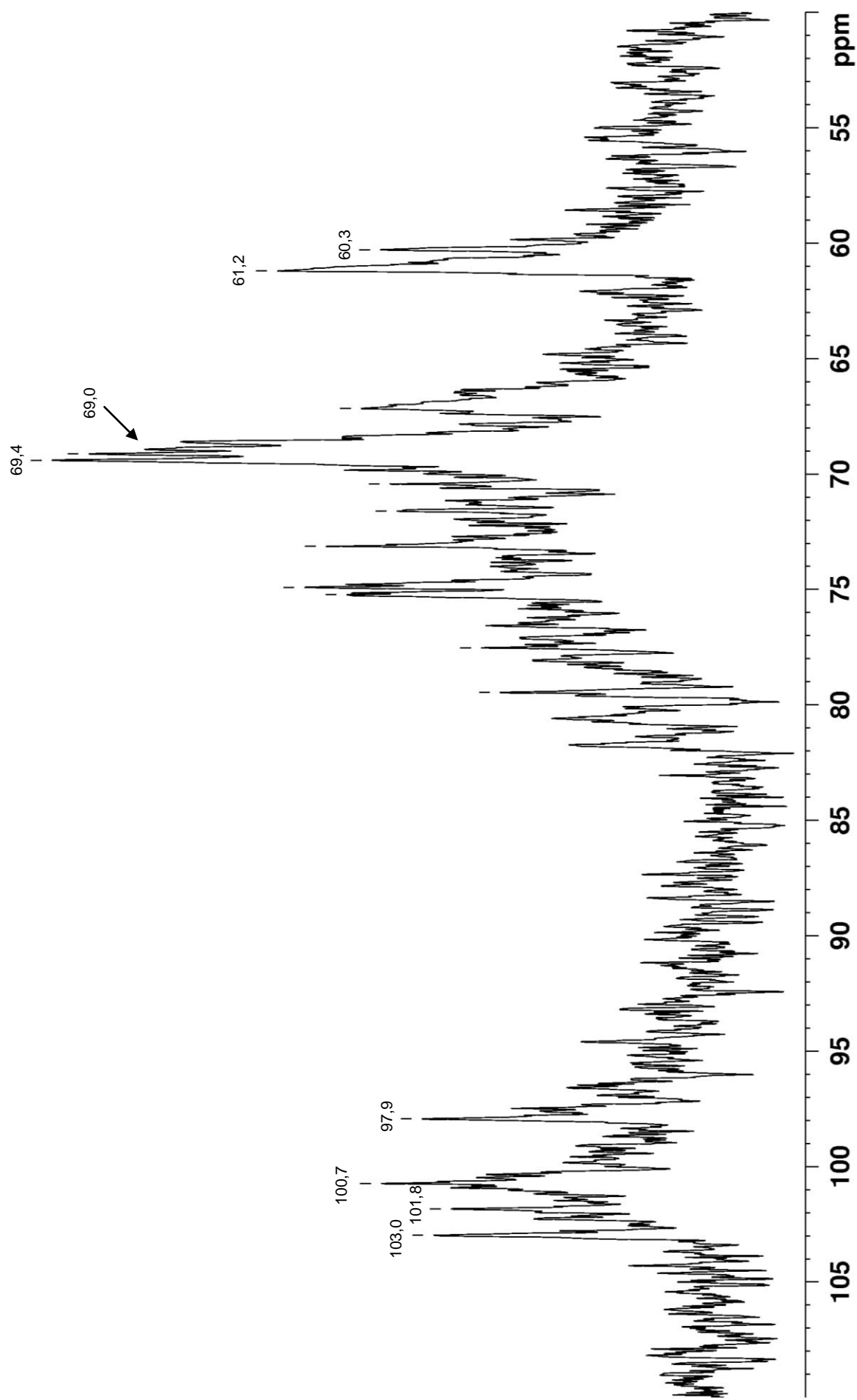
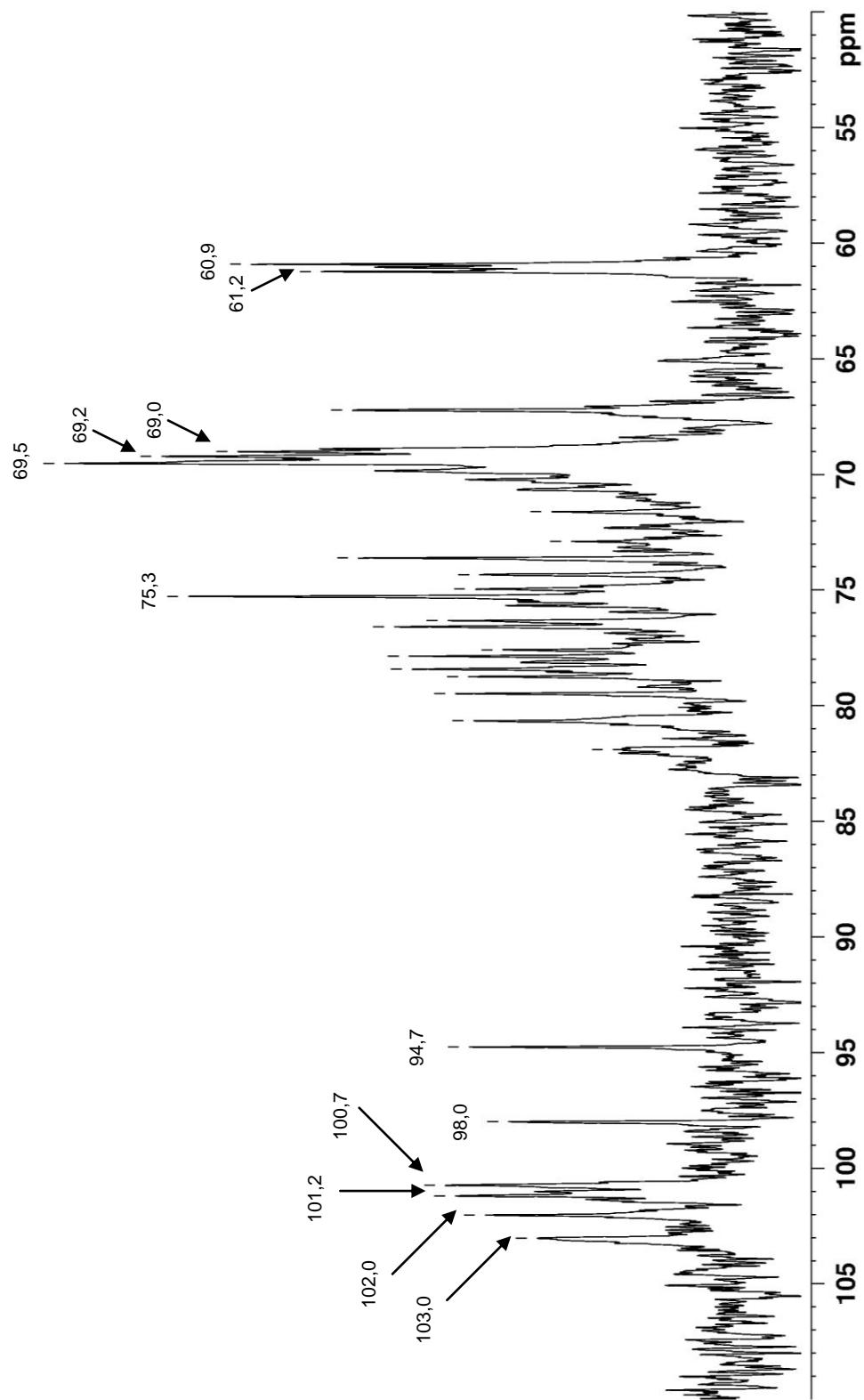


FIGURA 34 - ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DA FRAÇÃO PRECIPITADA COM KCL 2,0M LHP de *L. filiformis*



4.4.4 Análise de RMN de ^{13}C das frações solúveis em KCl 2,0M obtidas de *L. aldingensis* e *L. filiformis*

Os espectros de RMN de ^{13}C das frações solúveis em KCl obtidas das algas *L. aldingensis* (ACS e AHS, Figura 35) e *L. filiformis* (LCS e LHS, Figura 36) se mostraram similares aos espectros obtidos das respectivas frações precipitadas em KCl, sendo também típicos de galactanas sulfatadas do tipo agaranas. Destaca-se para a fração LHS a ausência do sinal em 94,7 ppm, que poderia corresponder a presença de carragenanas, bem como a diminuição do sinal em 102,0 ppm, que pode corresponder a unidades de β -D-galactose ligadas a 3,6-anidro- α -L-galactose (97,9 ppm).

Devido à alta viscosidade da fração AHS, esta apresentou um espectro com uma baixa resolução dos sinais em relação à linha de base. Já o espectro de RMN de ^{13}C da fração LHS (Figura 36) mostrou uma melhor definição dos sinais quando comparado aos espectros das respectivas frações precipitadas em KCl 2,0M.

Com uma maior definição dos sinais, foi possível observar nos espectros de RMN de ^{13}C das frações AHS e LHS os sinais 65,2 e 65,0 ppm, respectivamente, que podem ser atribuídos ao C-5 de unidades de xilose, e em 58,7 e 58,5 ppm, respectivamente, correspondentes a grupos metil (USOV; BILAN; SHASHKOV, 1997). O assinalamento dos sinais correspondentes ao C-5 das unidades de xilose foram confirmados por análises de composição monossacarídica e experimento de RMN de ^{13}C DEPT.

As frações solúveis em KCl 2,0M, tanto de *L. aldingensis* quanto de *L. filiformis*, por apresentarem os maiores rendimentos, maiores teores de carboidratos e grupos sulfato, bem como menores teores protéicos, foram selecionadas para dar continuidade ao processo de caracterização química dos polissacarídeos produzidos por estas espécies de *Laurencia*.

FIGURA 35 – ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DA FRAÇÃO SOLÚVEL EM KCL 2,0M AHS OBTIDA DE *L. aldingensis*

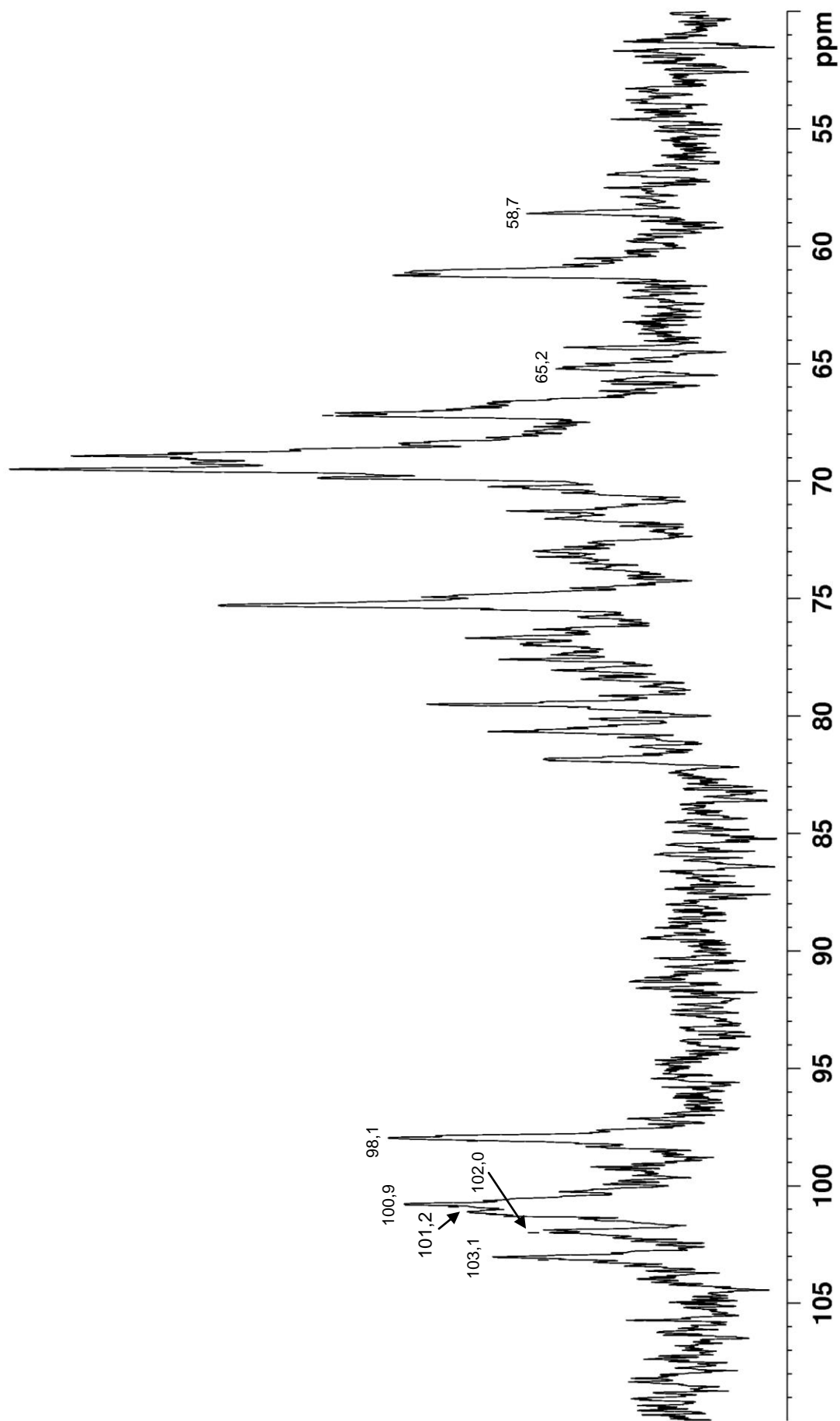
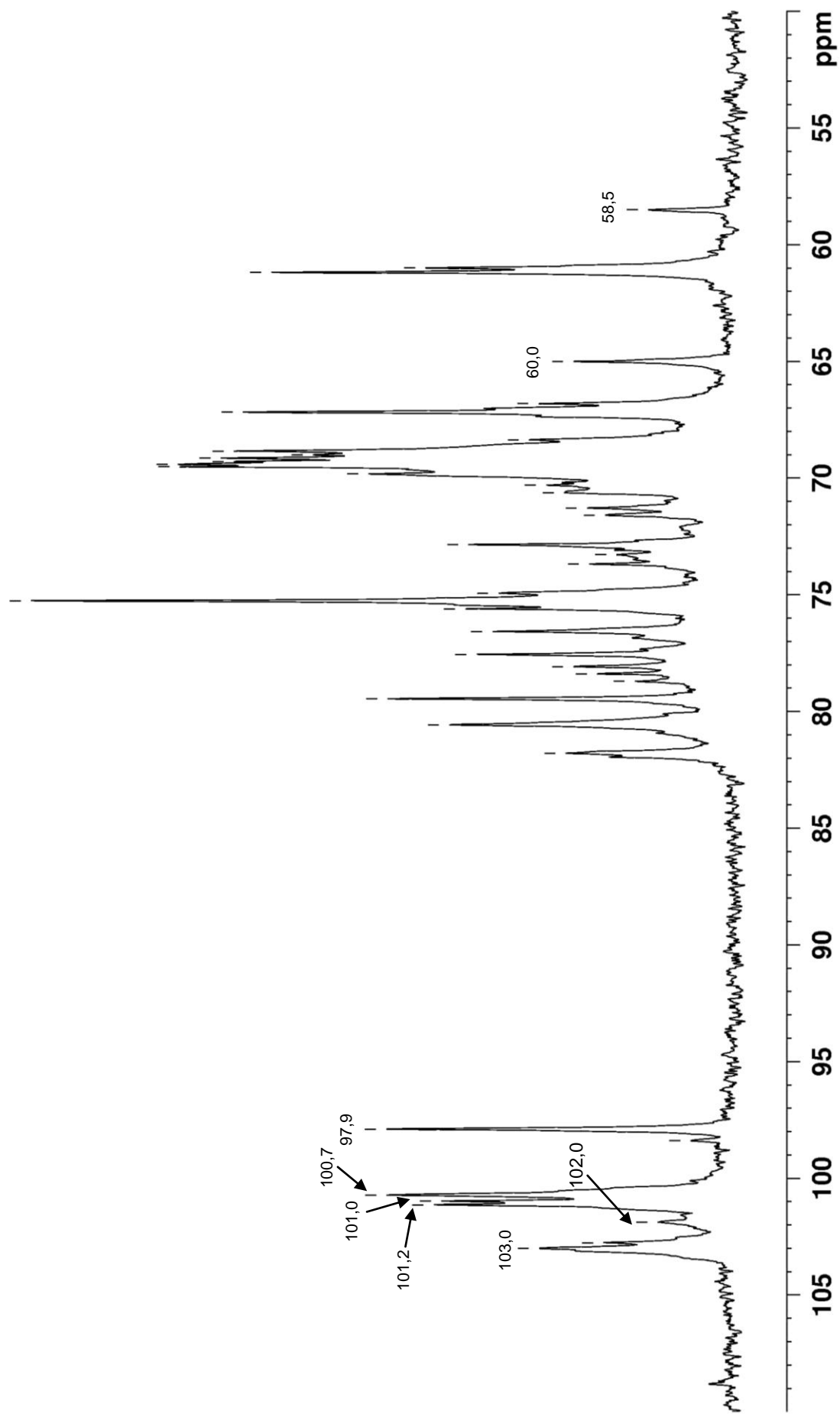


FIGURA 36 – ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DA FRAÇÃO SOLÚVEL EM KCL 2,0M LHS OBTIDA DE *L. filiformis*



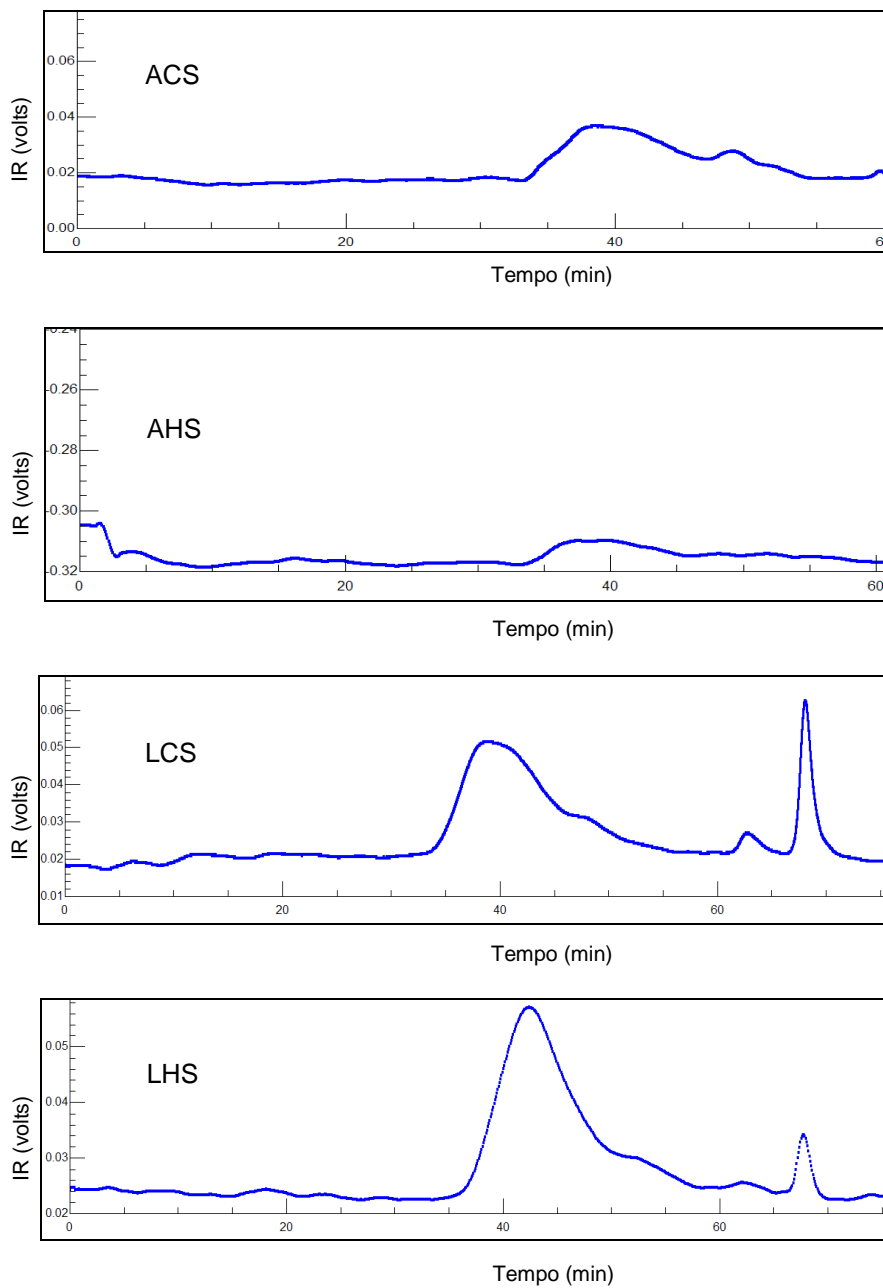
4.4.5 Análise da massa molecular das frações solúveis em KCl 2,0M obtidas de *L. aldingensis* e *L. filiformis*

A análise da massa molecular por HPSEC mostrou que tanto as frações solúveis obtidas de *L. aldingensis* (ACS e AHS, figuras 37a e 37b, respectivamente) quanto as obtidas de *L. filiformis* (LCS e LHS, figuras 37c e 37d, respectivamente) se apresentam heterogêneas em relação a massa molecular dos polissacarídeos que as compõem.

A fração AHS, por se apresentar altamente viscosa, apresentou grande parte de seus polissacarídeos retidos na membrana durante a filtração prévia à análise, fornecendo um cromatograma com perfil próximo à linha de base. Mesmo com grande parte dos polissacarídeos retidos na membrana de filtração foi possível observar o perfil heterogêneo dos polissacarídeos de AHS que foram filtrados e submetidos à análise de homogeneidade.

Tendo em vista os resultados das análises de HPSEC-IR, se fez necessário o processo de fracionamento dos polissacarídeos presentes nestas frações para dar prosseguimento às análises das galactanas sulfatadas biossintetizadas pelas algas *L. aldingensis* e *L. filiformis*.

FIGURA 37 – ANÁLISE DA MASSA MOLECULAR POR HPSEC-IR DAS FRAÇÕES SOLÚVEIS EM KCl 2,0M OBTIDAS DE *L. aldingensis* (ACS e AHS) E *L. filiformis* (LCS e LHS)



4.4.6 Fracionamento de AHS (*L. aldingensis*) e LHS (*L. filiformis*) por cromatografia de troca iônica

Tendo em vista os resultados apresentados acima, as frações de maiores rendimentos obtidas de *L. aldingensis* (AHS) e de *L. filiformis* (LHS) foram selecionadas para dar prosseguimento às análises dos polissacarídeos biossintetizados por estas espécies. Deste modo, AHS e LHS foram, separadamente, submetidas ao processo de fracionamento por cromatografia de troca iônica em DEAE-Sephacel. Neste processo, a coluna foi eluída inicialmente com água destilada e em seguida com concentrações crescentes de NaCl, que variaram de 0,25 a 2,0 M, sendo o gradiente de NaCl aumentado de 0,25 em 0,25M para cada eluição.

4.4.7 Análises químicas das subfrações obtidas a partir de AHS(*L. aldingensis*) por cromatografia de troca iônica

As subfrações com os maiores rendimentos obtidas após o fracionamento de AHS foram AHS-0,75 (53,4%) e AHS-1,0 (23,1%), eluídas nas concentrações de 0,75 e 1,0M de NaCl, respectivamente (Tabela 16).

As frações eluídas nas concentrações de 0,25 a 1,25M (AHS-0,25 a AHS 1,25) apresentaram teores de carboidratos de 59,2 a 66,4% e teores de grupos de sulfato de 9,9 a 21,3%. Já a fração eluída com NaCl 1,5M (0,6% de rendimento) apresentou apenas 28,7% de carboidratos e, provavelmente esta fração é constituída por impurezas ou mesmo pigmentos, que foram eluídos apenas no final do processo cromatográfico. Os valores de rotação óptica para as frações obtidas por este fracionamento cromatográfico ficaram entre -23,5 e -40,5.

As frações AHS-0,75 e AHS-1,0 foram as que apresentaram os maiores rendimentos (53,4 e 23,1%, respectivamente). Estas são constituídas por 66,0 e 59,6% de carboidratos, respectivamente, e apresentam 19,6 e 18,2% de grupos sulfato, respectivamente. Ambas as frações não apresentam proteínas como constituintes, e os valores de rotação óptica (-40,5 e -39,5) são indicativos de que estas frações são compostas por agaranas sulfatadas (Tabela 16).

TABELA 16 – RENDIMENTO, ANÁLISES QUÍMICAS E ROTAÇÃO ESPECÍFICA DAS SUBFRAÇÕES OBTIDAS A PARTIR DE AHS (*L. aldingensis*) POR CROMATOLOGRAFIA DE TROCA IÔNICA

Fração	Eluente [NaCl (M)] ^(a)	Rendimento (%)	Carboidrato (%)	NaSO ₃ (%)	Proteínas (%)	[α] _D ²⁵
AHS ^(b)			66,3	21,1	3,2	-31,5
AHS-0,25	0,25	8,1	62,2	9,9	6,2	-23,5
AHS-0,5	0,5	6,0	62,3	19,3	4,7	-32,5
AHS-0,75	0,75	53,4	66,0	19,6	-	-40,5
AHS-1,0	1,0	23,1	59,2	18,2	-	-39,5
AHS-1,25	1,25	4,2	66,4	21,3	2,0	-35,5
AHS-1,5	1,5	0,6	28,7	13,6	7,8	-27,0

^a = as frações eluídas com H₂O e NaCl 1,75 e 2,0M não apresentaram rendimentos.

^b = incluída para fins comparativos.

4.4.8 Composição monossacarídica das subfrações de AHS (*L. aldingensis*) obtidas por cromatografia de troca iônica

A análise de composição monossacarídica mostrou que todas as frações obtidas a partir de AHS por cromatografia de troca iônica apresentam galactose como monossacarídeo majoritário (56,4 a 65,5%), seguido de 3,6-anidrogactose (11,9 a 16,3%) e de 6-O-metilgalactose (6,8 a 16,8%). Xilose (2,9 a 5,9%), glucose (2,0 a 5,2%) e manose (1,4 a 7,3%) também estão presentes em menores percentagens. A presença minoritária dos açúcares naturalmente O-metilados 2-Me-3,6-anidrogactose (traços a 1,8%) e 2-metil-gactose (traços a 1,0%) foi encontrada distribuída entre as frações eluídas com NaCl 0,5 a 1,0M (AHS-0,5-AHS1,0). Destaca-se a presença de 7,1% de 4-O-metilgalactose na fração AHS-0,25.

As frações AHS-0,75 e AHS-1,0 (53,5 e 23,1% de rendimento, respectivamente) são compostas majoritariamente por galactose (64,3 e 65,5%, respectivamente), apresentando também como constituintes 6-O-metilgalactose

(14,0 e 14,8%, respectivamente) e 3,6-anidrogactose (16,3 e 14,3%, respectivamente). Menores percentagens de xilose (3,4-3,6%) e 2-metil-3,6-anidrogactose (1,0-1,8%) também estão presentes nestas frações. AHS-1,0 apresenta ainda 1,0% de manose e 1,0% de 2-metil-gactose, sendo que este último monossacarídeo está presente em AHS-0,75 apenas como traços.

TABELA 17 – COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS SUBFRAÇÕES OBTIDAS A PARTIR DE AHS POR CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA

FRAÇÃO	MONOSSACARÍDEO (MOL %) ^(a)								
	Gal	6-Me-Gal	3,6-AG	2-Me-AG	4-Me-Gal	2-Me-Gal	Xyl	Glc	Man
AHS	62,5	13,3	15,9	1,0	tr	tr	4,6	1,4	1,3
AHS-0,25	56,4	6,8	11,9	-	7,1	-	5,9	4,6	7,3
AHS-0,5	63,0	16,2	14,9	tr	tr	tr	2,9	2,0	1,0
AHS-0,75	64,3	14,0	16,3	1,8	-	tr	3,6	-	-
AHS-1,0	64,5	14,8	14,3	1,0	-	1,0	3,4	-	1,0
AHS-1,25	59,4	15,6	12,7	-	-	-	4,2	5,2	2,9
AHS-1,5	63,3	11,4	15,0	-	-	-	4,8	4,4	1,1
AHS-1,75	59,8	16,8	13,2	-	-	-	4,1	4,7	1,4

^a = Monossacarídeos analisados por CG-EM na forma de acetatos de alditol.

tr = percentagens menores que 1% foram consideradas traços.

- = não detectado.

4.4.9 Análise das massas moleculares de AHS-0,75 e AHS-1,0

As análises de homogeneidade por HPSEC-MALLS das frações AHS-0,75 (Figura 38a) e AHS-1,0 (Figura 38b) apresentaram um perfil homogêneo com relação à massa molecular média de seus polissacarídeos, sendo os valores de sua massas moleculares médias de 260,0 kDa e 370,0 kDa, respectivamente.

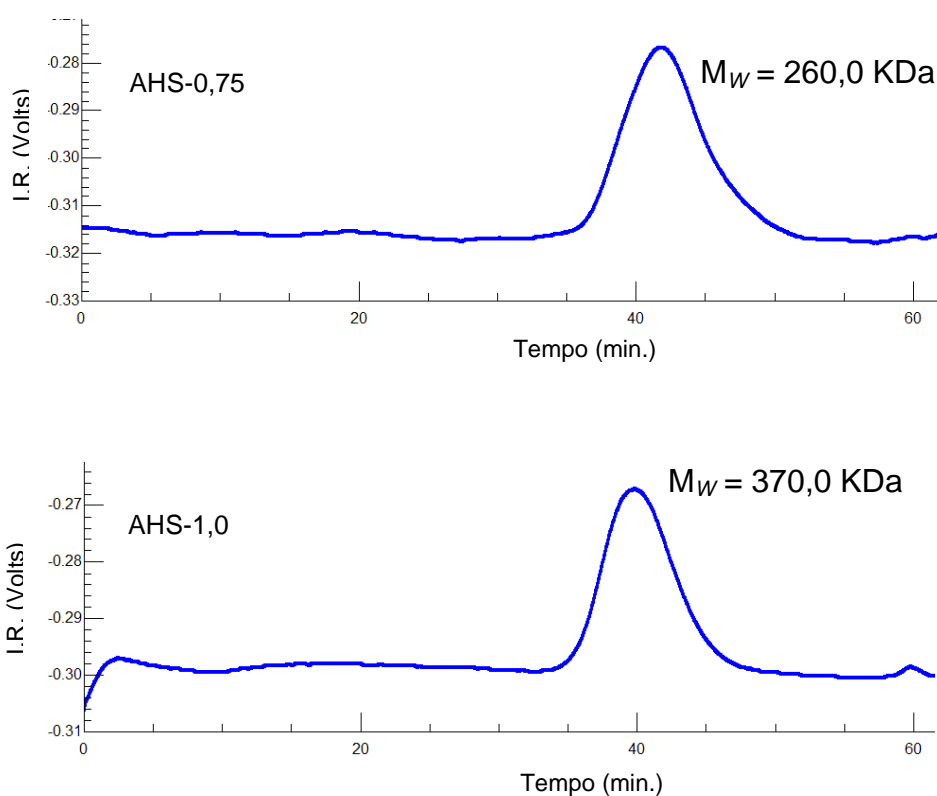


FIGURA 38 – ANÁLISE DE HPSEC-MALLS DAS SUFRAÇÕES AHS-0,75 E AHS-1,0 OBTIDAS DE *L. aldingensis*

4.4.10 Fracionamento e análises químicas das subfrações de LHS (*L. filiformis*) obtidas por cromatografia de troca iônica

As frações eluídas com NaCl nas concentrações 0,25 a 1,0M (LHS-0,25-LHS-1,0) apresentaram de 60,0 a 65,8% de carboidratos, 8,8 a 22,1% de grupos sulfato e rotação específicas de $-25,5^{\circ}$ a $-46,0^{\circ}$. Já as frações eluídas com NaCl 1,25 e 1,5M (LHS-1,25 e LHS-1,5) apresentaram baixos teores de carboidratos (10,8-12,4%) e rotações ópticas com valores negativos baixos, o que sugere que estas são compostas por contaminantes ou mesmo por pigmentos que se aderem ao gel de DEAE-Sephacel e foram eluídas no final do processo cromatográfico.

A fração LHS-0,75, eluída com NaCl 0,75M, apresentou rendimento majoritário absoluto (65,3%, Tabela 18) em relação à fração de partida LHS. LHS-0,75 apresenta 61,0% de carboidratos e 20,8% de grupos sulfato em sua

composição. O valor de rotação específica para esta fração foi de -44,0, que é típico de frações polissacarídicas ricas em agaranas (Tabela 18). Nota-se que esta fração apresenta constituição semelhante à da fração de origem LHS (62,3% de carboidratos e 20,5% de grupos sulfato, Tabela 15), mas diferentemente de LHS (4,3% de proteínas), LHS-0,75 apresenta apenas traços de conteúdo proteico.

TABELA 18 – RENDIMENTO, ANÁLISES QUÍMICAS E ROTAÇÃO ESPECÍFICA DAS SUBFRAÇÕES OBTIDAS A PARTIR DE LHS POR CROMATOLOGRAFIA DE TROCA IÔNICA

Fração	Eluente ^a [NaCl (M)]	Rendimento (%)	Carboidrato (%)	NaSO ₃ (%)	Proteínas (%)	[α] _D ²⁵
LHS	-	-	62,3	20,5	4,3	-47,0
LHS-0,25	0,25	3,8	65,8	8,8	6,0	-25,5
LHS-0,5	0,5	19,2	60,0	22,1	tr	-46,0
LHS-0,75	0,75	65,3	61,0	20,8	tr	-44,0
LHS-1,0	1,0	4,1	63,0	19,3	2,8	-43,0
LHS-1,25	1,25	1,4	12,4	10,2	2,7	-7,0
LHS-1,5	1,5	1,0	10,8	19,0	3,0	-4,0

^a = as frações eluídas com H₂O e NaCl 1,75 e 2,0M não apresentaram rendimentos.

tr = percentagens menores que 1% foram consideradas traços.

nd = não determinado.

A tabela 19 mostra a análise de composição monossacarídica das subfrações obtidas a partir de LHS por cromatografia em DEAE-Sephacel. Todas as frações apresentam galactose como monossacarídeo majoritário (55,0 a 73,7%), seguido de 3,6-anidrogactose (11,7 a 17,9%). 6-metil-galactose está presente em todas as frações (8,1 e 18,2%), exceto em LHS-1,0, que se apresenta livre deste monossacarídeo. Xilose também é observada para todas as frações (3,3-8,0%), diferentemente de glucose (1,9-10,3%), manose (1,3-12,4) e 4-metil-galactose (1,7-5,4), estando estes monossacarídeos distribuídos em algumas das frações obtidas a partir de LHS. Destaca-se o alto teor de glucose (10,3%) apresentado pela fração

LHS-0,25, sendo que este componente provavelmente é originado do amido das florídeas, polissacarídeo de reserva das algas vermelhas. O alto teor de glucose em LHS-0,25 pode ser o fator responsável pela rotação específica com valor negativo relativamente baixo para esta fração (-25,5).

A fração majoritária LHS-0,75 (65,3% de rendimento) é constituída principalmente por galactose (61,2%) e apresenta menores quantidades de 6-Me-galactose (15,2%), 3,6-anidrogactose (16,8%) e xilose (6,8%). Esta fração apresenta composição monossacarídica semelhante à da fração de origem LHS, mas diferentemente desta, LHS-0,75 se apresenta livre de 4-Me-galactose, glucose e manose (1,2; 1,0 e 1,5% para LHS, respectivamente).

TABELA 19 – COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS SUBFRAÇÕES OBTIDAS A PARTIR DE LHS POR CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA

Fração	Monossacarídeo (mol %) ^(a)						
	Gal	6-Me-Gal	3,6-AG	4-Me-Gal	Xyl	Glc	Man
LHS	61,0	13,2	15,3	1,2	6,8	1,0	1,5
LHS-0,25	37,0	13,6	12,2	5,4	8,0	10,3	12,4
LHS-0,5	55,0	18,2	17,9	-	5,1	1,9	1,9
LHS-0,75	64,3	15,2	16,8	-	6,8	-	tr
LHS-1,0	73,7	8,5	13,3	-	3,3	-	1,3
LHS-1,25	56,4	8,1	13,3	1,7	6,7	7,2	5,5
LHS-1,5	64,5	-	11,7	-	7,7	8,7	7,1

- = não detectado.

^a = Monossacarídeos analisados por CG-EM na forma de acetatos de alditol.

As análises químicas em conjunto com as de composição monossacarídica indicam que a fração LHS-0,75 é semelhante à fração de origem LHS, sendo, portanto, representativa das agaranas biossintetizadas por *L. filiformis*.

A análise de massa molecular por HPSEC da fração LHS-0,75 mostrou que esta fração se apresenta heterogênea em relação à massa molecular média de seus

polissacarídeos (Figura 39). Deste modo, esta fração foi novamente submetida à cromatografia por troca iônica em DEAE-SEPHACEL.

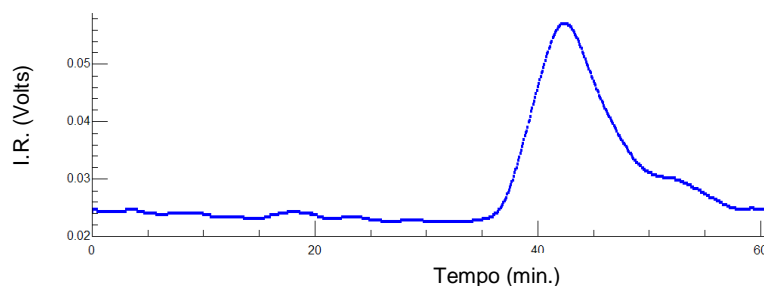


FIGURA 39 – ANÁLISE DE HPSEC-IR DA FRAÇÃO LHS-0,75 OBTIDA DE *L. filiformis*

4.4.11 Refracionamento de LHS-0,75 (*L. filiformis*) por cromatografia de troca iônica

O refracionamento cromatográfico em DEAE-Sephacel da fração LHS-0,75 foi realizado utilizando-se as concentrações de 0,5-0,8 M de NaCl, e o gradiente salino foi aumentado de 0,1 em 0,1M.

4.4.12 Análises químicas das subfrações obtidas a partir de LHS-0,75 por refracionamento em DEAE-Sephacel

O refracionamento de LHS-0,75 deu origem às subfrações LHS2-0,5 (que leva o 2 no nome para diferenciá-la da fração eluída com 0,5M de NaCl no primeiro fracionamento por DEAE-Sephacel), LHS-0,6 e LHS-0,7 (10,8, 33,4 e 37,7% de rendimento, respectivamente). As subfrações obtidas após a repurificação apresentaram de 55,0 a 63,0% de carboidratos e ~22,0% de grupos sulfato (Tabela 20). Apenas a fração LHS-0,5 apresentou 1,6% de proteínas, estando as outras frações obtidas do fracionamento cromatográfico livres deste componente.

TABELA 20 – RENDIMENTO E ANÁLISES QUÍMICAS DAS SUBFRAÇÕES OBTIDAS A PARTIR DO REFRACIONAMENTO DE LHS-0,75 (*L. filiformis*) POR CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA.

FRAÇÃO	ELUENTE (NACL EM M)	RENDIMENTO (%)	CARBOIDRATO (%)	NASO ₃ (%)	PROTEÍNAS (%)
LHS-0,75	-	-	61,0	20,8	tr
LHS2-0,5	0,5	10,8	55,0	22,0	1,6
LHS-0,6	0,6	33,4	63,0	21,6	-
LHS-0,7	0,7	37,7	62,0	21,3	-

tr = percentagens menores que 1% foram consideradas traços

A análise de composição monossacarídica para todas as subfrações obtidas a partir de LHS-0,75 (Tabela 21) mostrou galactose como componente majoritário (59,7 a 66,5%), seguido de 6-Me-galactose (11,0 a 18,9%), 3,6-anidrogalactose (13,7 a 17,0%) e xilose (5,9 a 6,6%). Manose, que estava presente apenas como traços na fração LHS-0,75, após o fracionamento em DEAE-Sephacel se mostrou presente apenas em LHS2-0,5 (1,1%).

TABELA 21 – COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS SUBFRAÇÕES OBTIDAS A PARTIR DO REFRACIONAMENTO DE LHS-0,75 POR CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA.

FRAÇÃO	MONOSSACARÍDEO (MOL%) ^(a)				
	Gal	6-Me-Gal	3,6-AG	Xyl	Man
LHS-0,75	64,3	15,2	16,8	6,8	tr
LHS2-0,5	59,7	18,9	13,7	6,6	1,1
LHS-0,6	62,9	14,2	17,0	5,9	-
LHS-0,7	66,5	11,0	16,0	6,5	-

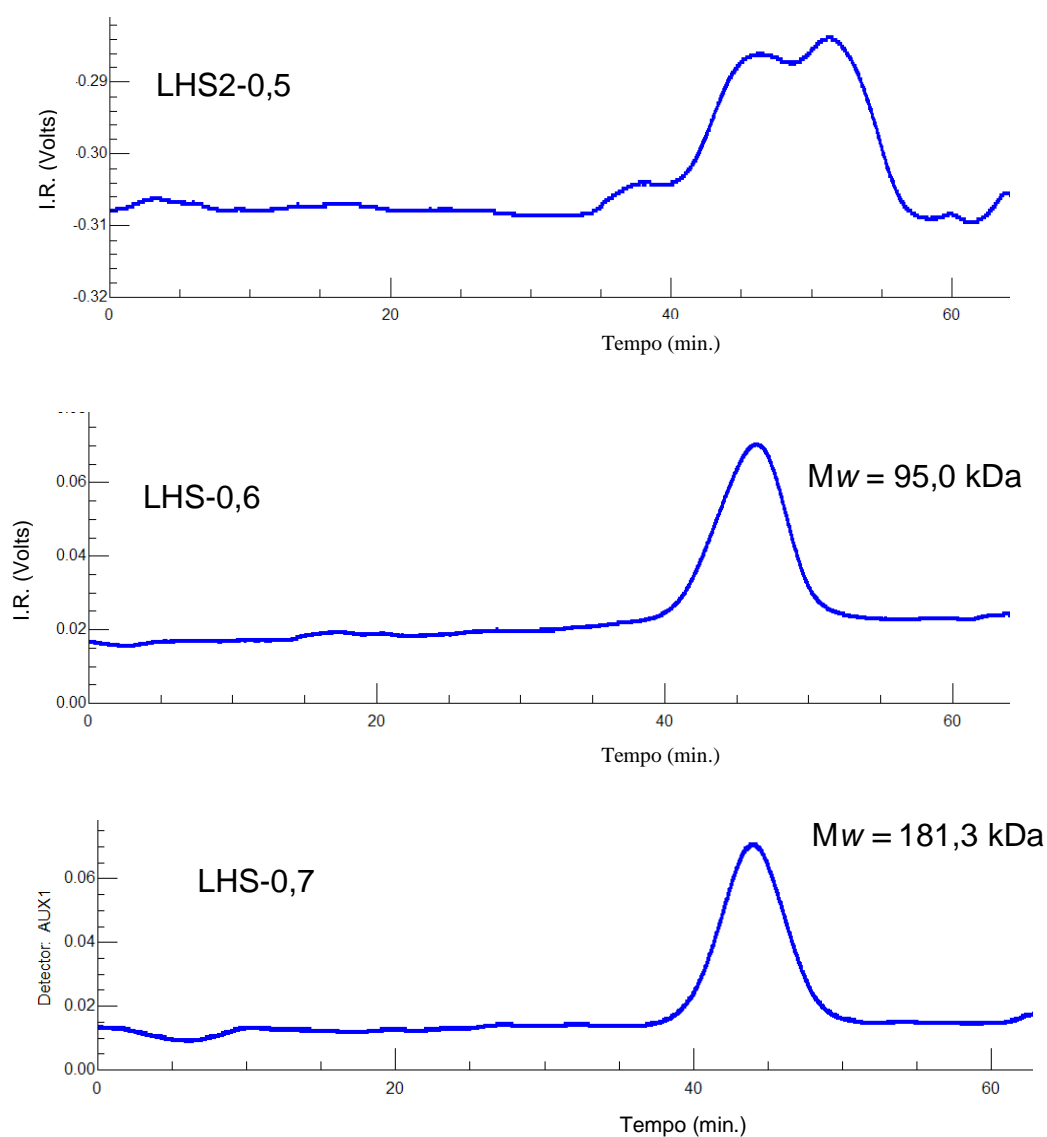
- = não detectado.

^a = Monossacarídeos analisados por CG-EM na forma de acetatos de alditol.

4.4.13 Análise da massa molecular das subfrações LHS2-0,5, LHS-0,6 e LHS-0,7

As subfrações LHS2-0,5, LHS-0,6 e LHS-0,7, obtidas a partir do refracionamento de LHS-0,75 por cromatografia de troca iônica foram submetidas a análises de massa molecular. A análise de HPSEC da fração LHS2-0,5 (10,8% de rendimento) apresentou um perfil polidisperso (Figura 40a), indicando que polissacarídeos com tamanhos diferentes estão presentes nesta fração. De modo diferente, as frações LHS-0,6 (Figura 40b) e LHS-0,7 (Figura 40c) apresentaram um cromatograma com perfil homogêneo. LHS-0,6 apresenta massa molecular média de 95,0 kDa, e a massa molecular média de LHS-0,7 é de 181,3 kDa.

FIGURA 40 – ANÁLISE DE HPSEC-IR DAS SUBFRAÇÕES LHS2-0,5, LHS-0,6 E LHS-0,7



Tendo em vista os resultados apresentados acima, as frações LHS-0,6 e LHS-0,7 foram selecionadas para dar prosseguimento aos estudos das agaranas produzidas por *L. filiformis*.

4.5 ANÁLISES QUÍMICAS DAS GALACTANAS HOMOGÊNEAS OBTIDAS A PARTIR DE *L. aldingensis* E *L. filiformis*.

4.5.1 Dessulfatação das galactanas homogêneas obtidas das algas *L. aldingensis* e *L. filiformis*

Com objetivo de localizar a posição dos grupos sulfato presentes nas frações polissacarídicas homogêneas obtidas das algas *L. aldingensis* (AHS-0,75 e AHS-1,0) e *L. filiformis* (LHS-0,6 e LHS-0,7), bem como simplificar as análises de RMN, estas frações, na forma de sal de piridônio, foram submetidas ao processo de dessulfatação solvolítica, conforme descrito por Nagasawa, Inoue e Tokuyasu (1979).

No que diz respeito à dessulfatação das frações homogêneas obtidas a partir da alga *L. aldingensis*, o processo de dessulfatação conduzido por hidrólise de 5 horas não foi efetivo na remoção dos grupos sulfato destas frações. Foi observada uma dessulfatação de 70,0% para a fração AHS-0,75 (19,6 para 5,8% de grupos sulfato) e de apenas 42,3% para a fração AHS-1,0 (18,2 para 10,5%). Deste modo, as frações AHS-0,75 e AHS-1,0 foram, na forma de sal de piridônio, submetidas novamente ao processo de dessulfatação solvolítica, mas nesta segunda tentativa de dessulfatar essas frações, a hidrólise foi conduzida por 7 horas. O aumento do tempo de solvólise se mostrou eficiente na remoção dos grupos sulfato dessas frações, visto que AHS-0,75 apresentou 85,2% de dessulfatação (19,6% para 2,9%) com um rendimento de 91,4%; AHS-1,0 apresentou 79,1% de dessulfatação (18,2 para 3,8%) com um rendimento de 95%.

As frações LHS-0,6 e LHS-0,7 foram submetidas à hidrólise solvolítica por 5 horas. A fração LHS-0,6 apresentou 19,3% de grupos sulfato como constituinte da fração nativa (Tabela 22). Após dessulfatação, foi verificado para LHS-0,6D a

presença de 5,1% desses grupos e, deste modo pode-se observar que houve a remoção de 73,5% de sulfato desta fração e o rendimento do processo foi de 83,8%.

A fração LHS-0,7 (21,3% de sulfato, tabela 20) apresentou 88,7% de dessulfatação (2,4% de sulfato em LHS-0,7D), apresentando um rendimento de 80,1%.

TABELA 22 - COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES HOMOGÊNEAS NATIVAS E DESSULFATADAS OBTIDAS DAS ALGAS *L. aldingensis* E *L. filiformis*

Fração	Monossacarídeos (mol %) ^(a)				
	Gal	6-Me-Gal	3,6-AG	2-AG	Xyl
AHS-0,75 ^(b)	64,3	14,0	16,3	1,8	3,6
AHS-0,75D ^(c)	62,5	15,0	17,4	1,7	3,4
AHS-1,0 ^(b, d)	64,5	14,8	14,3	1,0	3,4
AHS-1,0D ^(c)	65,5	13,0	17,0	tr	3,5
LHS-0,6 ^(b)	65,3	14,2	17,0	tr	3,5
LHS-0,6D ^(c)	66,2	13,8	16,1	tr	3,9
LHS-0,7 ^(b)	66,7	10,0	16,0	tr	6,5
LHS-0,7D ^(c)	65,9	11,8	14,7	tr	6,3

^a = Monossacarídeos analisados por CG-EM na forma de acetatos de alditol.

^b = Frações nativas.

^c = Frações dessulfatadas.

^d = AHS-1,0 M apresenta 1,0% de 2-O-metilgalactose e 1,0% de manose, estando este último presente também em AHS-1,0MD.

A análise de composição monossacarídica das frações dessulfatadas demonstrou que o processo de dessulfatação utilizado tanto para as frações homogêneas obtidas da alga *L. aldingensis* quanto para as obtidas da alga *L. filiformis* foi efetivo na remoção dos grupos sulfato sem apresentar degradação extensiva dos polissacarídeos, visto que as análises de composição monossacarídica das frações dessulfatadas se mostraram bem similares às análises das respectivas frações nativas (Tabela 22).

4.5.2 Análises de RMN das galactanas homogêneas obtidas das algas *L. aldingensis* e *L. filiformis* e de suas correspondentes frações dessulfatadas

Na figura 41 podem ser observadas as regiões anoméricas dos espectros de RMN de ^{13}C das frações AHS-0,75 e AHS-1,0, bem como de suas correspondentes frações dessulfatadas. Pode-se observar que AHS-0,75 e AHS-1,0 apresentam espectros de RMN de ^{13}C bem semelhantes, o que está de acordo com as análises químicas e de composição monossacarídica. Nos espectros de RMN de ^{13}C das frações homogêneas nativas obtidas de *L. aldingensis*, pode-se observar na região anomérica sinais principais em 103,0 ppm, correspondentes a unidades de β -D-galactose ligadas a unidades de α -L-galactose (100,7 a 101,2 ppm), bem como o sinal em 101,9 ppm, correspondente a unidades de β -D-galactose ligadas a unidades de 3,6-anidro- α -L-galactose (97,9 ppm). Ressalta-se que o grupo de sinais em 100,7-102,2 ppm também pode corresponder a unidades de β -D-galactose 2-sulfato. O sinal em 96,6 ppm pode corresponder a unidades de 3,6-anidro- α -L-galactose 2-sulfato, visto que este sinal desaparece após a dessulfatação. Após dessulfatação, são observados quatro sinais principais na região anomérica, que são correspondentes às díades G(6M) \rightarrow L (103,1 e 100,5 ppm, respectivamente) e G(6M) \rightarrow LA (101,9 e 97,8 ppm, respectivamente).

As frações homogêneas obtidas da alga *L. filiformis* (LHS-0,6 e LHS-0,7) também apresentaram espectros de RMN de ^{13}C bem similares, assim como suas correspondentes frações dessulfatadas. Nas regiões anoméricas das frações nativas obtidas da alga *L. filiformis* foi possível observar os sinais correspondentes a G(6M) \rightarrow L (103,0 e 100,7-101,2 ppm, respectivamente) e G2S \rightarrow LA (100,7-101,2 e 97,9 ppm, respectivamente).

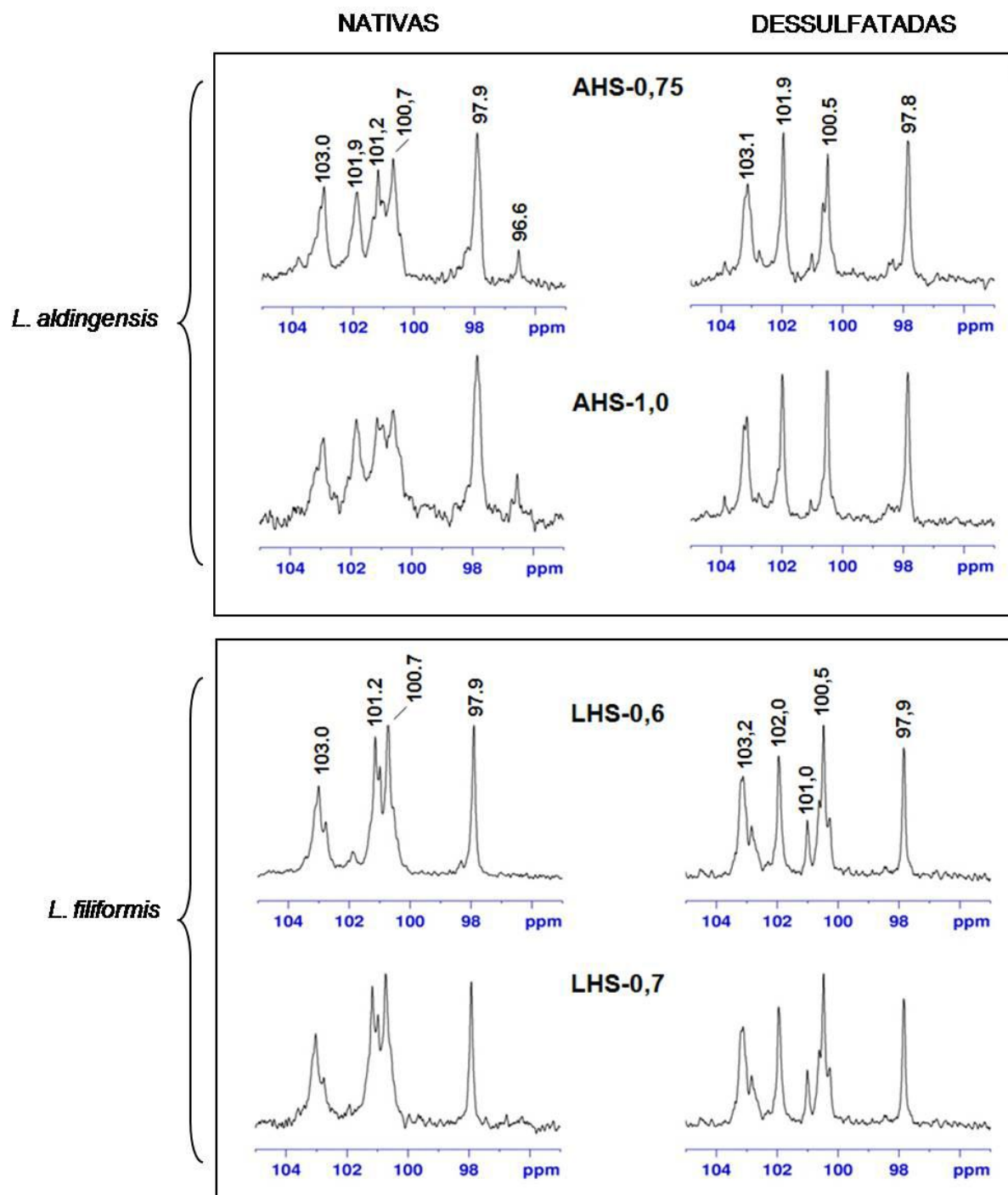


FIGURA 41 – REGIÕES ANOMÉRICAS DOS ESPECTROS DE RMN DE ^{13}C DAS AGARANAS HOMOGÊNEAS NATIVAS E DESSULFATADAS OBTIDAS A PARTIR DE *L. aldingensis* E *L. filiformis*

Diferentemente de *L. aldingensis*, nas frações obtidas de *L. filiformis* as unidades de α -L-3,6-anidrogactose estão majoritariamente ligadas a unidades de β -D-gactose 2-sulfato, visto que o sinal em 102,0 ppm, que é um sinal de baixa

intensidade no polissacarídeo nativo, apresenta um aumento significativo após a dessulfatação.

Outra diferença observada para os polissacarídeos obtidos de *L. filiformis*, quando comparados aos de *L. aldingensis*, é a ausência do sinal em 96,6 ppm, indicando a ausência de unidades de 3,6-anidro- α -galactose sulfatadas. Na região anomérica dos espectros de RMN de ^{13}C das frações homogêneas dessulfatadas obtidas de *L. filiformis* foram observados os sinais correspondentes às mesmas díades assinaladas para os espectros das frações dessulfatadas obtidas de *L. aldingensis*, exceto o sinal preponderante em 101,0 ppm, que pode ser atribuído ao C-1 de unidades de xilose glicosilando o C-3 de unidades de α -L-galactose. Nas frações obtidas de *L. aldingensis*, os espectros das frações dessulfatadas apresentam esse sinal em 101,0 ppm, mas com uma intensidade bem menor, além do sinal em 103,9 ppm, que pode ser correspondente à glicosilação (xilose e/ou galactose) no C-6 das unidades de β -D-galactose. Nos espectros de RMN das frações obtidas de *L. filiformis* o sinal em 103,9 ppm não foi observado.

4.5.3 Análise de metilação das agaranas AHS-0,75 (*L. aldingensis*) e LHS-0,7 (*L. filiformis*)

As frações homogêneas, em relação à massa molecular média, obtidas das algas *L. aldingensis* e *L. filiformis* foram submetidas à análise de trideuterometilação utilizando-se a mesma metodologia que foi utilizada para a análise da agarana FCS-3 de *P. flagellifera*. Utilizando-se iodeto de metila trideuterado foi possível determinar o padrão das ligações glicosídicas dos polissacarídeos presentes nestas frações, bem como localizar a posição dos grupos O-metil naturais presentes nestes polímeros. Além disso, através da análise comparativa entre os polissacarídeos nativos e suas correspondentes frações dessulfatas foi possível determinar a posição dos grupos sulfato presentes no polissacarídeo original.

4.5.3.1 Análise de trideuterometilação da agarana AHS-0,75 (*L. aldingensis*)

Através da análise de trideuterometilação da fração AHS-0,75 (Tabela 23), foi possível determinar que os grupos O-metil naturais no C-6 são pertencentes às unidades A desta galactana. Diferentemente dos grupos 6-O-metil naturais, a localização dos grupos 2-O-metil pôde ser realizada apenas no polissacarídeo dessulfatado, provavelmente devido à baixa percentagem destes e, além disso, esses grupos podem estar distribuídos em diferentes produtos de metilação do polissacarídeo nativo. Pela análise de metilação do polissacarídeo dessulfatado pôde ser observado que os grupos O-metil naturais no C-2 estão presentes nas unidades B da agarana AHS-0,75.

No que diz respeito às unidades A presentes na fração AHS-0,75, foi verificada a presença majoritária de 2,4,6-CD₃-Gal (15,5%), 2,4-CD₃-6-Me-Gal (13,0%) e 4,6-CD₃-Gal (14,1%), correspondentes a unidades de G, G6M e G2S, respectivamente, sendo a presença deste último derivado confirmada pela análise de trideuterometilação do polissacarídeo dessulfatado, que mostrou o desaparecimento de 4,6-CD₃-Gal concomitante ao aumento de 2,4,6-CD₃-Gal. Menores percentagens de G2S6M (1,5% de 4-CD₃-6-Me-Gal) e G2S6S (1,7% de 4-CD₃-Gal) também foram observadas para AHS-0,75, sendo estes derivados ausentes na fração dessulfatada, na qual foi observado o aumento do derivado 2,4,6-Gal, analisados como 2,4-CD₃-6-Me-Gal e 2,4-6-CD₃-Gal. O derivado 2,4-Gal analisado como 2,4-CD₃-Gal (6,0% na fração nativa) também foi observado na fração dessulfatada, mas em menor percentagem (4,0%). Deste modo, parte deste derivado no nativo corresponde a unidades de G6S e parte pode ser atribuído a unidades de galactose glicosiladas no C-6.

As unidades B são compostas, em parte, por 3,6-anidrogactose (10,9% de 2-CD₃-AG) e seus derivados 2-O-metil (1,9% de 2-AG) e 2-sulfato (4,2% de AG). A presença deste último foi confirmada pela análise de trideuterometilação do polissacarídeo dessulfatado, na qual foi observada a ausência do derivado AG bem como o aumento proporcional do derivado 2-AG, analisado como 2-CD₃-AG (10,9 para 15,3 %). Com relação às unidades B não ciclizadas, no polissacarídeo nativo estas se apresentam principalmente como unidades precursoras (L6S) e α-L-galactose (12,0% de 2,3-CD₃-Gal e 8% de 2,3,6-CD₃-Gal, respectivamente), sendo

este resultado confirmado pela análise de metilação do polissacarídeo dessulfatado, a qual mostrou o aumento do derivado 2,3,6-Gal, analisado como 2,3,6-CD₃-Gal (8,0 para 23,4%) .

A presença do derivado 2-CD₃-Gal entre os produtos de metilação da fração nativa corresponde, em parte, a unidades de L6S3R, o que é consistente com a presença do derivado 2,6-Gal (4,6 % de 2,6-CD₃-Gal) no dessulfatado. As glicosilações das unidades A no C-6 e das unidades B no C-3 são constituídas por unidades simples de xilose e galactose presentes como terminais não redutores, sendo verificada a presença destas unidades a partir dos derivados 2,3,4-CD₃-Xyl e 2,3,4,6-Gal (~de 3,5 e ~1,6%, respectivamente), presentes no polissacarídeo nativo e dessulfatado. O restante do derivado 2-CD₃-Gal permanece indefinido, podendo corresponder a unidades de β-D-galactose 3-ligadas 4,6-sulfatadas ou unidades de α-L-galactose 4-ligadas 3,6-sulfatadas.

O somatório destas unidades terminais não redutoras é inferior ao somatório das unidades A e B que podem estar glicosiladas, mas, como já mencionado anteriormente, as unidades de xilose podem estar subestimadas devido a perdas seletivas ou mesmo oxidação destas unidades (NEEDS; SELVENDRAN, 1994; YORK *et al.*, 1990). Em relação às unidades de galactose tetra-metiladas, essas também podem estar subestimadas devido à alta volatilidade destes derivados.

Embora a hidrólise redutiva seja o método utilizado para a análise de galactanas contendo 3,6-anidrogalactose, alguns pontos devem ser considerados, como por exemplo: 1) presença de cetal de ácido pirúvico (; 2) presença de L-galactose 6-sulfato. Nestes casos, são observadas baixas recuperações de 3,6-anidrogalactose e de 2,3-O-metilgalactose, respectivamente. Deste modo, a maior quantidade de unidades A em relação às unidades B obtida pela análise de metilação da fração nativa AHS-0,75 (relação de 1,33:1) se deve à interferência na recuperação do derivado 2,3-metilgalactose pelo procedimento de hidrólise redutiva (STEVENSON, FURNEAUX, 1991). Após a dessulfatação, com a ausência do derivado 2,3-Gal, a relação de unidades A:B na agarana AHS-0,75D foi de 1,04:1, sendo esta relação bem próxima da esperada para galactanas sulfatadas obtidas de algas marinhas.

TABELA 23– ANÁLISE DE TRIDEUTEROMETILAÇÃO DA FRAÇÃO AHS-0,75 (*L. aldingensis*)

DERIVADO ^(a)	COMPOSTO POR ^(b)	UNIDADE CORRESPONDENTE NO NATIVO (MOL%) ^(c)	FRAÇÃO	
			AHS-0,75	AHS-0,75D
<i>3-LIGADAS</i>				
2,4,6-Gal	2,4,6-CD ₃ -Gal	G	15,5	30,7
	2,4-CD ₃ -6-Me-Gal	G6M	13,0	14,0
4,6-Gal	4,6-CD ₃ -Gal	G2S	14,1	-
	4-CD ₃ -6-Me-Gal	G2S6M	1,5	-
2,4-Gal	2,4-CD ₃ -Gal	G6S/G6R	6,0	4,0
4-Gal ^(d)	4-CD ₃ -Gal	G2S,6S	1,7	-
<i>4-LIGADAS</i>				
2-AG	2-CD ₃ -AG	LA	10,9	15,3
	2-Me-AG	LA2M	1,9	1,7
AG	3,6-AG	LA2S	4,2	-
2,3,6-Gal	2,3,6-CD ₃ -Gal	L	8,0	23,4
	2-Me-3,6-CD ₃ -Gal	L2M	-	1,8
2,3-Gal	2,3-CD ₃ -Gal	L6S	12,0	-
2,6-Gal	2,6-CD ₃ -Gal		-	4,2
2-Gal	2-CD ₃ -Gal	L6S3R	4,2	-
<i>INDEFINIDO</i>				
2-Gal	2-CD ₃ -Gal	G4S6S e/ou L3S6S	1,9	-
<i>TERMINAIS NÃO REDUTORES</i>				
Xyl	2,3,4-CD ₃ -Xyl	R	3,5	3,4
Gal	2,3,4,6-CD ₃ -Gal	R	1,6	1,5

/ = e/ou. – = não detectado.

^a Metil e/ou trideuterometil nas posições indicadas.^b Me = metil, CD₃ = trideuterometil.^c Nomenclatura de Knutsen *et al*, (1994).^d Determinado após hidrólise ácida, redução com NaBD₄, acetilação e análise de CG-EM.

4.5.3.2 Análise de trideuterometilação da fração LHS-0,7 (*L. filiformis*)

A análise de trideuterometilação da fração LHS-0,7 mostrou para as unidades A desta galactana a presença majoritária de 2,4,6-CD₃-Gal (15,8%), 2,4-CD₃-6Me-Gal (10,9%) e 4,6-CD₃-Gal (20,6%), correspondente às unidades de G, G6M e G2S, respectivamente. Menores percentagens de 2,4-CD₃-Gal (2,9%) e 4-CD₃-Gal (2,8%) também foram observadas e correspondem a unidades de G6S e G2S6S, respectivamente. A presença dos referidos grupos sulfato foi confirmada pela análise de trideuterometilação da fração dessulfatada (LHS-0,7D), sendo observado o desaparecimento dos derivados mono e di-O-metilados, paralelamente ao aumento do derivado 2,4,6-Gal analisado como 2,4,6-CD₃-Gal (15,8 para 36,7%).

As unidades B desta agarana são compostas principalmente por unidades de α-L-galactose 6-sulfato (16,2% de 2,3-CD₃-Gal), sendo encontradas unidades de galactose não substituídas em menor proporção (1,6 % de 2,3,6-CD₃-Gal). As unidades 3,6-anidrogalactosídicas representam 14,9%, sendo 13,8% de 3,6-anidrogalactose (analisada como 2-CD₃-AG) e 1,1% de 3,6-anidrogalactose sulfatadas em C-2 (derivado 3,6-AG). A presença destes grupos sulfato foi confirmada pela análise do polissacarídeo dessulfatado, sendo observado o desaparecimento do derivado AG concomitante ao proporcional aumento do derivado 2-AG, analisado como 2-CD₃-AG (13,8 para 15,1%).

A presença do derivado 2-Gal, analisado como 2-CD₃-Gal (8,1%), pode ser atribuído a unidades de LG3X6S, visto que, no polissacarídeo dessulfatado, foi observado o desaparecimento deste derivado concomitante ao aparecimento do derivado 2,6-Gal, analisado como 2,6-CD₃-Gal (8,4%). As unidades de xilose representam 6,0 e 6,3% na agarana nativa e dessulfada, respectivamente.

Assim como a análise de metilação da fração AHS-0,75, a análise da fração LHS-0,7 também mostrou uma maior proporção de unidades A em relação à razão esperada de 1:1, sendo de 1,3:1. Este fator também deve ser atribuído ao fato da baixa recuperação do derivado 2,3-CD₃-Gal pelo processo de hidrólise redutiva (STEVENSON, FURNEAUX, 1991). Após dessulfatação, com o desaparecimento do derivado 2,3-Gal, a análise de metilação da fração LHS-0,7D apresentou uma razão de unidades A:B de 1,03:1, que é bem próximo do valor teórico esperado para agaranas sulfatadas.

TABELA 24 - ANÁLISE DE TRIDEUTEROMETILAÇÃO DA AGARANA NATIVA LHS-0,7 E DESSULFATADA LHS-0,7D DE *L. filiformis*.

DERIVADO ^(a)	COMPOSTO POR ^(b)	UNIDADE CORRESPONDENTE NO NATIVO (MOL%) ^(c)	FRAÇÃO	
			LHS-0,7	LHS-0,7D
<i>3-LIGADAS</i>				
2,4,6-Gal	2,4,6-CD ₃ -Gal	G	15,8	36,7
	2,4-CD ₃ -6-Me-Gal	G6M	10,9	10,6
4,6-Gal	4,6-CD ₃ -Gal	G2S	20,6	-
2,4-Gal	2,4-CD ₃ -Gal	G6S	2,9	-
4-Gal ^(d)	4-CD ₃ -Gal	G2S6S	2,8	-
<i>4-LIGADAS</i>				
2-AG	2-CD ₃ -AG	AG	13,8	15,1
AG	3,6-AG	AG2S	1,1	-
2,3,6-Gal	2,3,6-CD ₃ -Gal	L	1,6	22,9
2,3-Gal	2,3-CD ₃ -Gal	L6S	16,2	-
2,6-Gal	2,6-CD ₃ -Gal		-	8,4
2-Gal	2-CD ₃ -Gal	L6S3X	8,1	-
<i>TERMINAL</i>				
Xyl	2,3,4-CD ₃ -Xyl	X	6,2	6,0

— = não detectado.

^a Metil e/ou trideuterometil nas posições indicadas.

^b Me = metil, CD₃ = trideuterometil.

^c Nomenclatura de Knutsen *et al*, (1994).

^d Determinado após hidrólise ácida, redução com NaBD₄, acetilação e análise de GC-MS.

4.5.4 Ciclização das unidades precursoras de 3,6-anidrogactose por tratamento alcalino

4.5.4.1 Tratamento alcalino das frações AHS-0,75 e LHS-0,7 em escala analítica

As agaranas AHS-0,75 (de *L. aldingensis*) e LHS-0,7 (de *L. filiformis*) foram, separadamente, submetidas à reação de tratamento alcalino.

Para a determinação do melhor tempo reacional a ser utilizado para o tratamento alcalino, bem como verificar a composição das díades que compõem as unidades precursoras presentes nestes polissacarídeos, a reação de ciclização foi realizada em escala analítica e acompanhada por RMN de ^1H , sendo utilizadas as frações brutas e solúveis em KCl 2,0M AHS (*L. aldingensis*), LHS (*L. filiformis*) e também os polissacarídeos padrões de porfirana e *lambda*-carragenana. O aumento do teor de 3,6-anidrogactose foi acompanhado pela quantificação das áreas correspondentes a este açúcar nos respectivos espectros de RMN de ^1H .

Os polissacarídeos padrões que foram utilizados foram obtidos das algas *Porphyra columbina* (porfirana) e *Gigartina skottsbergii* (*lambda*-carragenana).

A porfirana apresenta as unidades A constituídas por β -D-gactose e seu derivado 6-O-metilado, enquanto as unidades B se apresentam na forma de 3,6-anidrogactose ou estas estão na forma precursora de α -L-gactose 6-sulfato. A porfirana é um polissacarídeo modelo para estudos ciclização, visto que não apresenta grupos sulfato nas unidades de β -D-gactose e, deste modo a unidade A da díade precursora não interfere na ciclização da unidade B. O tempo de meia-vida de ciclização das unidades B deste tipo de polissacarídeo é de 23 minutos e, desta forma, é comumente utilizado um tempo de 3 horas para o tratamento alcalino em escala preparativa para polissacarídeos que apresentam as unidades precursoras presentes em díades G(6M)→L6S.

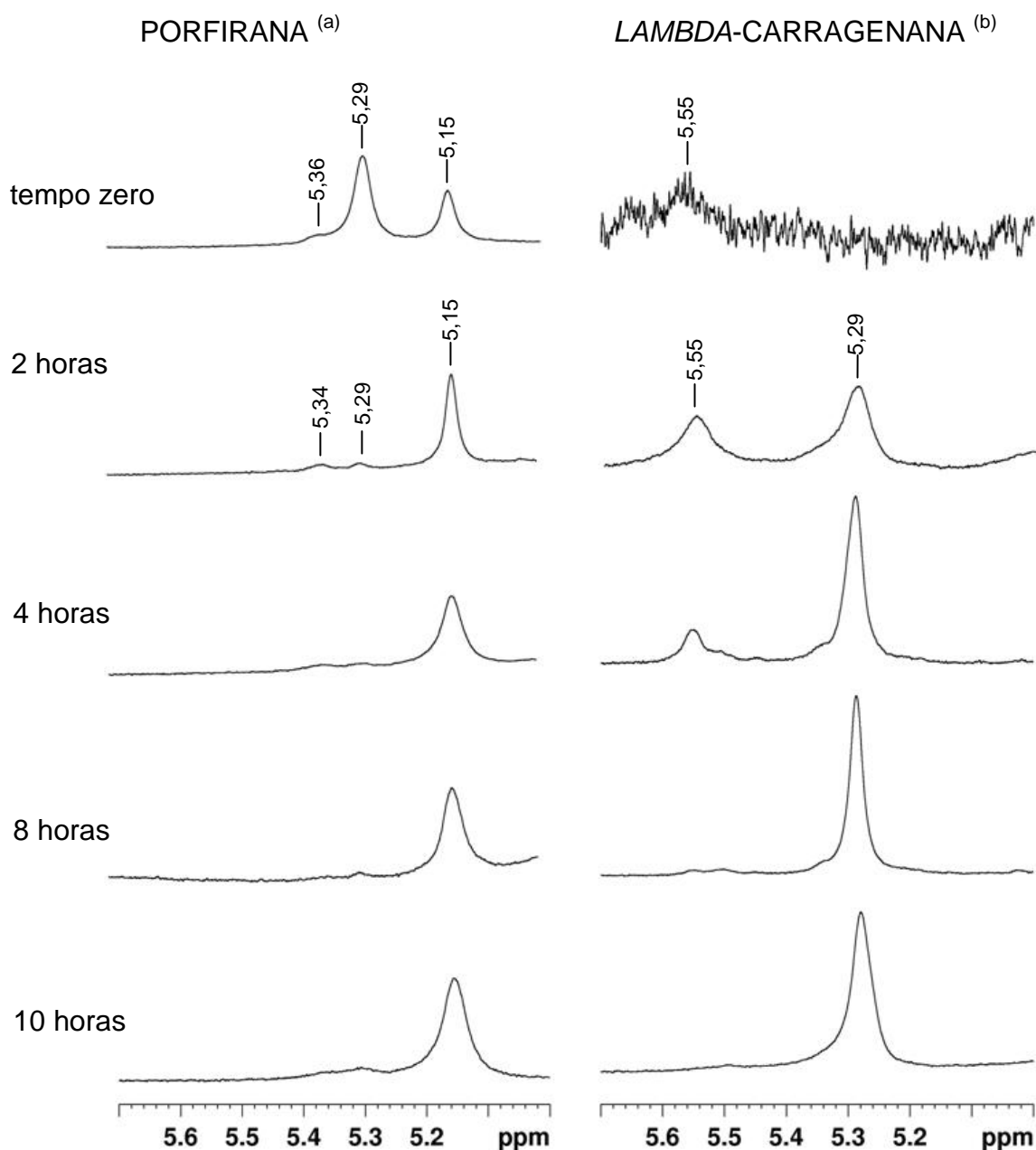
Diferentemente, os polissacarídeos de *lambda*-carragenana apresentam as unidades A constituídas por unidades de β -D-gactose 2-sulfato, enquanto as unidades B são constituídas por α -D-galactopiranose 2,6-dissulfato e 3,6-anidro- α -D-galactopiranose 2-sulfato. Na *lambda*-carragenana, o sulfato presente em C-2 das unidades A preclui a ciclização das unidades precursoras destas díades (DG2S,6S) e, deste modo, o tempo de meia-vida da reação de ciclização de

polissacarídeos do tipo *lambda*-carragenana é de 170 minutos. Tendo essa informação, a reação de tratamento alcalino em escala preparativa para polissacarídeos que apresentam díades precursoras que apresentam grupos sulfato em C-2 das unidades de β -D-galactose deve ser realizado utilizando-se um maior tempo reacional.

O acompanhamento da reação de ciclização do padrão de porfiranas (Figura 42) mostrou que este polissacarídeo apresentou praticamente todas as suas unidades precursoras ciclizadas com apenas 2 horas de reação. Já o padrão de *lambda*-carragenana precisou de um tempo reacional de 8 horas para que suas unidades precursoras fossem convertidas à forma anidrogalactosídica (Tabela 25).

O acompanhamento das reações de ciclização das unidades precursoras presentes nas frações AHS e LHS mostrou um perfil semelhante ao apresentado pelo padrão de porfiranas, visto que com duas horas de reação suas unidades precursoras foram convertidas à unidades de 3,6-anidrogalactose (Figura 43). O espectro de ^1H da fração AHS no tempo zero apresentou uma baixa definição devido à alta viscosidade apresentada por seus polissacarídeos. Os espectros desta mesma fração, quando álcali-tratada, apresentaram uma melhor definição dos sinais.

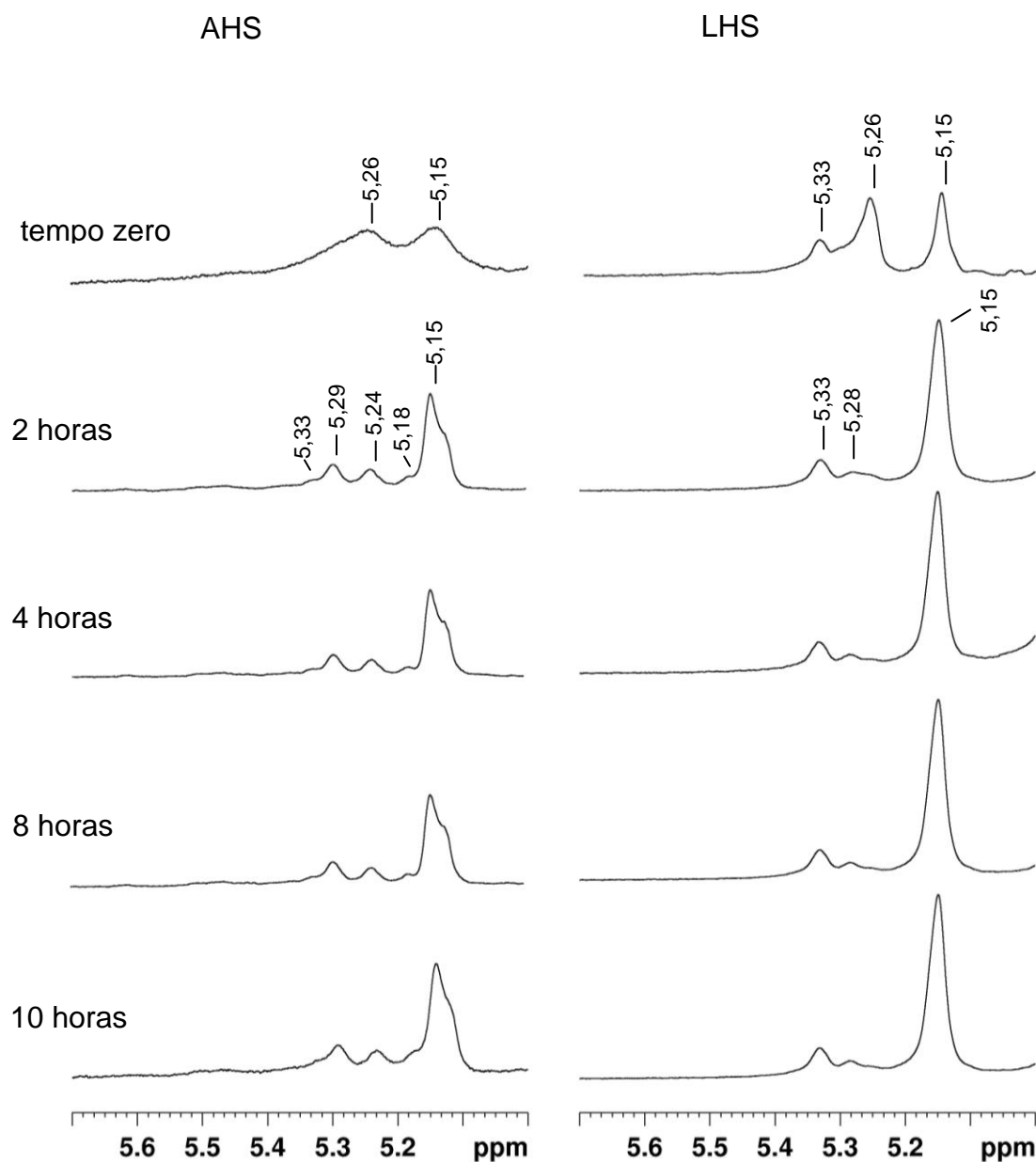
Tendo em vista estes resultados, pode-se concluir que as unidades precursoras presentes nas agaranas de *L. aldingensis* e *L. filiformis* estão presentes em díades nas quais as unidades A são compostas por G ou G6M. Além disso, foi determinado o melhor tempo reacional a ser utilizado para o tratamento alcalino das frações AHS-0,75 e LHS-0,7 em escala preparativa, sendo utilizado o tempo de 3 horas.



^a = 5,15 ppm = LA; 5,29 ppm: L6S.

^b = 5,29 ppm: DA2S; 5,55 ppm: DA2S,6S.

FIGURA 42 – ESPECTROS DE RMN DE ¹H (REGIÃO α -ANOMÉRICA) DE PORFIRANA E *LAMBDA*-CARRAGENANA EM FUNÇÃO DO TEMPO DA REAÇÃO DE CICLIZAÇÃO POR TRATAMENTO ALCALINO



Os deslocamentos em 5,15; 5,26 e 5,33 ppm correspondem a LA, L6S e L6S3X, respectivamente.

FIGURA 43 – ESPECTROS DE RMN DE ^1H (REGIÃO α -ANOMÉRICA) DE AHS-0,75 (*L. aldingensis*) E LHS-0,7 (*L. filiformis*) EM FUNÇÃO DO TEMPO DA REAÇÃO DE CICLIZAÇÃO POR TRATAMENTO ALCALINO

TABELA 25 – PERCENTAGEM DE 3,6-ANIDROGALACTOSE EM PORFIRANA, LAMBDA-CARRAGENANA, AHS (*L. aldingensis*) E LHS (*L. filiformis*) DETERMINADA POR RMN DE ¹H EM FUNÇÃO DO TEMPO DA REAÇÃO DE CICLIZAÇÃO POR TRATAMENTO ALCALINO

Fração	3,6-Anidrogalactose (%) ^(a)					
	Tempo zero	2 h	4 h	8 h	10 h	28 h ^(b)
Porfirana	33,5	80,6	80,0	71,9	80,0	
<i>Lambda-carragenana</i>	Nd	58,0	75,0	90,0	91,0	91,0
AHS	41,7	69,4	71,8	71,2	71,2	
LHS	32,5	73,0	75,7	75,7	75,7	

^a = % de 3,6-anidrogalactose calculada em relação à região α -anomérica do espectro de ¹H.

^b = No tempo de 28 horas as frações de porfiranas, AHS e LHS foram degradadas (dados de RMN).

4.5.4.2 Tratamento alcalino das frações AHS-0,75 e LHS-0,7 em escala preparativa

Após a determinação do melhor tempo reacional pelo acompanhamento do tratamento alcalino por espectrometria de RMN de ¹H, as frações AHS-0,75 e LHS-0,7 foram submetidas ao tratamento alcalino em escala preparativa utilizando os tempos reacionais de 3 horas.

A análise de composição monossacarídica destas frações, quando comparadas às respectivas frações dos polissacarídeos nativos estão apresentadas na tabela 26.

Comparando-se a fração álcali tratada AHS-0,75T à sua correspondente fração nativa, pôde-se observar o aumento de 15,3% das unidades de 3,6-anidrogalactose (16,8 para 32,1%), que foi concomitante à diminuição de 16,9% das unidades de galactose (64,3 para 47,4%).

Para a fração LHS-0,7T, quando comparada à fração nativa LHS-0,7, foi observado o aumento de 23,9% das unidades de 3,6-anidrogalactose (16,0 para 39,9%), que foi acompanhado da diminuição de 24,7% das unidades de galactose (69,7 para 45,0%).

Deste modo, pode-se concluir que as frações AHS-0,75 e LHS-0,7 apresentam cerca de 16,0 e 24% de unidades precursoras, respectivamente.

TABELA 26 – ANÁLISE DE COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS AGARANAS AHS-0,75 E LHS-0,7 E SEUS RESPECTIVOS PRODUTOS OBTIDOS APÓS TRATAMENTO ALCALINO.

Fração	Monossacarídeo (mol %) ^(a)				
	Gal	6-Me-Gal	3,6-AG	2-Me-AG	Xyl
AHS-0,75 ^(b)	64,3	14,0	16,8	1,8	3,4
AHS-0,75T ^(c)	47,4	15,2	32,1	1,9	3,4
LHS-0,7 ^(b)	69,7	10,0	16,0	tr	4,3
LHS-0,7T ^(c)	45,0	11,1	39,9	tr	4,0

^a = Monossacarídeos analisados por CG-EM na forma de acetatos de alditol.

^{b,c} = Antes e após tratamento alcalino, respectivamente.

4.6 Análises de RMN das agaranas AHS-0,75 (*L. aldingensis*) e LHS-0,7 (*L. filiformis*)

4.6.1 Análises de RMN da agarana AHS-0,75 (*L. aldingensis*)

Pela análise de RMN de ¹H da fração AHS-0,75, foi possível verificar a presença de três sinais principais na região α -anomérica: 5,15; 5,25 e 5,30 ppm, correspondentes a unidades de 3,6-anidro- α -L-galactose, α -L-galactose 6-sulfato e α -L-galactose. Estes assinalamentos foram realizados com base no quase desaparecimento do sinal em 5,25 ppm após dessulfatação (AHS-0,75D), concomitante ao aumento do sinal em 5,30 ppm. Além disso, no espectro de RMN de ¹H da fração AHS-0,75T, o sinal 5,25 ppm apresentou uma grande diminuição, acompanhada do aumento do sinal em 5,15 ppm, correspondente à conversão das unidades precursoras (L6S) a unidades ciclizadas.

No espectro de RMN de ¹H da fração LHS-0,7, foram observados apenas três sinais: 5,15, 5,25 e 5,33, correspondentes a unidades de α -L-3,6-anidrogalactose, α -L-galactose 6-sulfato e α -L-galactose 3-xilosilada, respectivamente, sendo os assinalamentos das unidades precursoras (L6S) realizados do mesmo modo descrito

no parágrafo acima. O assinalamento das unidades não precursoras (LG6S3X em LHS-0,7 e LHS-0,7T; e LG3X em LHS-0,7D) em 5,33 ppm foi realizado de acordo com os dados obtidos dos espectros de COSY e HSQC destas frações, sendo que estes dados estão de acordo com os assinalamentos observados para o pentassacarídeo da alga *L. nipponica*, que também apresenta unidades de LGS3X (USOV, ELASHVILI, 1991). No espectro da fração AHS-0,75, este assinalamento também foi realizado, mas destaca-se que este sinal em 5,33 ppm está presente em menor intensidade nos espectros das garanas de *L. aldingensis*.

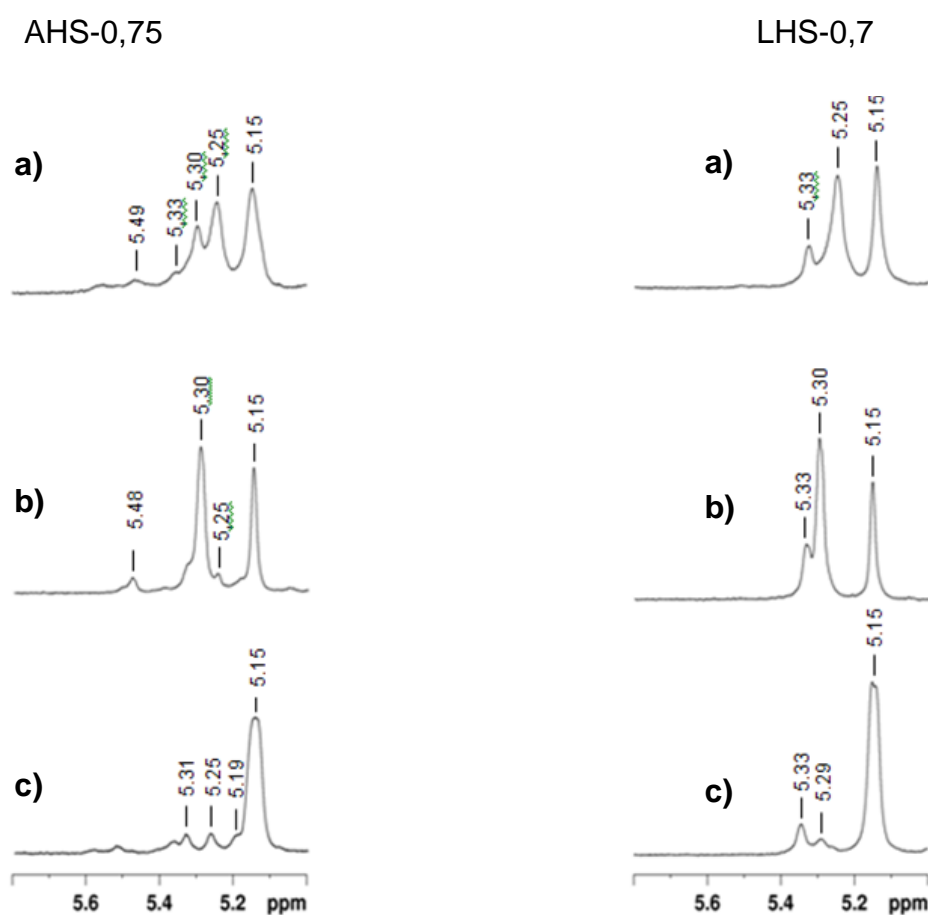


FIGURA 44 – REGIÃO α -ANOMÉRICA DOS ESPECTROS DE RMN DE ^1H DAS AGARANAS AHS-0,75 (*L. aldingensis*), LHS-0,7 (*L. filiformis*) (a) E SEUS CORRESPONDENTES PRODUTOS DESSULFATADOS (b) E ÁLCALI-TRATADOS (c)

Os espectros de RMN de ^{13}C das frações AHS-0,75 e AHS-0,75D estão representados na figura 45. Na região anomérica, são observados sinais principais, que são correspondentes às díades G(6M)→L(6S) (sinais em 103,0 e 100,7-101,2 ppm, respectivamente), G(6M)→LA (sinais em 101,9 e 97,9 ppm, respectivamente). Destaca-se que o grupo de sinais em 100,7-101,2 ppm também é correspondente a unidades de G2S e de xilose em C-3 das unidades de α -L-galactose 6-sulfato. O sinal em 96,5 ppm pode ser atribuído a unidades de LA2S, visto que este sinal desaparece após a dessulfatação do polissacarídeo. O sinal em 98,3 ppm pode ser atribuído a unidades LA2M, estando todos estes dados de acordo com as análises de metilação (Tabela 23).

Após a dessulfatação do polissacarídeo, são observados os sinais anoméricos em 103,0 e 100,5 ppm, correspondente à díade de G(6M)→L, em 101,9 e 97,8 ppm correspondente a G(6M)→LA e os sinais em 102,7 e 98,3 ppm, que podem corresponder à díade G(6M)→LA2M. O sinal em 101,0 ppm corresponde a unidades de L-galactose glicosiladas em C-3, ao passo que o sinal 103,9 pode ser atribuído a unidades de galactose 6-O-glicosiladas. De acordo com os dados obtidos pelas análises de metilação da fração AHS-0,75, as glicosilações nas unidades de galactose podem ser por unidades terminais de xilose ou de galactose.

Após dessulfatação foi verificado o desaparecimento do sinal em 78,0 ppm, correspondente ao C-2 de unidades de β -D-galactose sulfatadas neste carbono. O sinal em 67,1 ppm, que no espectro da fração nativa é um sinal grande e alargado quase desapareceu no espectro do polissacarídeo dessulfatado, demonstrando a remoção dos grupos sulfato no C-6 das unidades de galactose. Estes dados estão de acordo com a análise de metilação do polímero. Após a dessulfatação, restaram dois sinais de pequena intensidade em 66,7 e 67,3 ppm. Este último sinal não se mostrou invertido na análise de RMN de DEPT e, através das análises dos espectros de COSY e HSQC, em conjunto, foi possível atribuir esse sinal ao C-2 de unidades de α -L-galactose glicosiladas em C-3. O sinal 58,5 ppm foi atribuído ao C-6 das unidades de 6-O-metil- β -D-galactose, como determinado pela análise de trideuterometiçã, que demonstrou que os grupos 6-O-metil pertenciam às unidades A desta agarana.

A análise do espectro de RMN da fração alcali-tratada AHS-0,75T (Figura 46b), quando comparada ao da fração nativa (AHS-0,75, Figura 46a) mostrou o

aumento do sinal em 101,9 ppm e em 97,9-98,0 ppm, que é correspondente à conversão das díades de G(6M)→L6S (103,0 e ~ 100,7 ppm no nativo) em G(6M)→LA. No espectro da fração AHS-0,75T, houve quase o desaparecimento do sinal em 103,0 ppm, o que confirma os dados obtidos pelo acompanhamento do tratamento alcalino desta fração por RMN de ^1H , no qual foi determinado que as unidades precursoras se encontravam ligadas a unidades de G(6M). Ainda se tratando da fração AHS-0,75T, o grupo de sinais centrado em 100,7 ppm, que se mostrou diminuído após o tratamento alcalino, é correspondente a unidades de α -L-galactose não ciclizáveis, xilose, bem como unidades de β -D-galactose 2-sulfato. Na região do anel, pode-se observar a grande diminuição do sinal em 67,1 ppm, indicando a remoção seletiva dos grupos sulfato em C-6 das unidades de α -L-galactose. Estes resultados estão de acordo com as análises de metilação do polissacarídeo (Tabela 23), bem como com as análises obtidas dos espectros de RMN de ^1H (Figura 44).

A análise de RMN de DEPT das frações AHS-0,75 (Figura 47a) (e AHS-0,75D (Figura 47b)) mostrou a inversão dos sinais em 71,2 (71,3); 69,0; e 61,2-61,0 (60,7-61,0), correspondentes aos C-6 de: 6-O-metil-galactose, 3,6-anidro- α -L-galactose e galactose não substituída em C-6. Na fração nativa (AHS-0,75), é observada a inversão de um grupo de sinais centrado em 67,2 ppm. Após dessulfatação, o sinal invertido de baixa intensidade em 66,6 ppm, correspondente a unidades de galactose que ainda apresentam sulfato em C-6, e em 67,3 ppm é observado um sinal não invertido, correspondente ao C-2 de unidades de α -L-galactose substituídas em C-3 (provavelmente por unidades de xilose). Este assinalamento está de acordo com Usov e Elashvili (1991), que descreveram estas unidades de α -L-galactose para a alga *L. nipponica*, bem como com os assinalamentos descritos neste trabalho para a alga *P. flagellifera*. Adicionalmente, o experimento de DEPT mostrou a inversão de sinais em 65,0-65,2 ppm, correspondentes aos C-5 de unidades de xilose.

A Figura 48 mostra a região anomérica dos espectros de RMN de HSQC das frações AHS-0,75 e AHS-0,75D. A tabela 27 apresenta as correlações observadas para ambos os espectros, bem como as unidades correspondentes a esses assinalamentos.

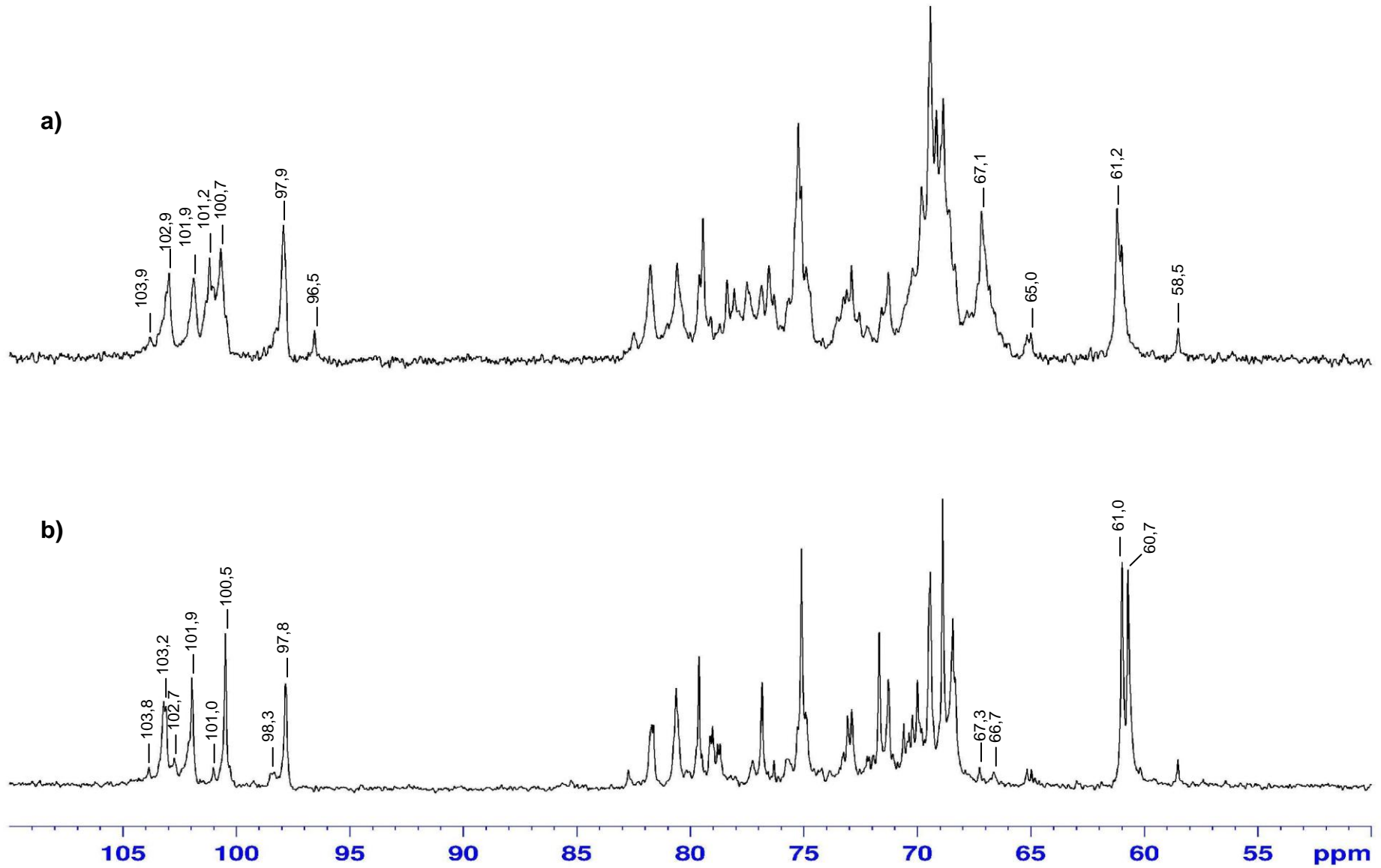
FIGURA 45 – ESPECTROS DE RMN DE ^{13}C DAS AGARANAS AHS-0,75 DE *L. aldingensis* (a) E AHS-0,75D DE *L. aldingensis* (b)

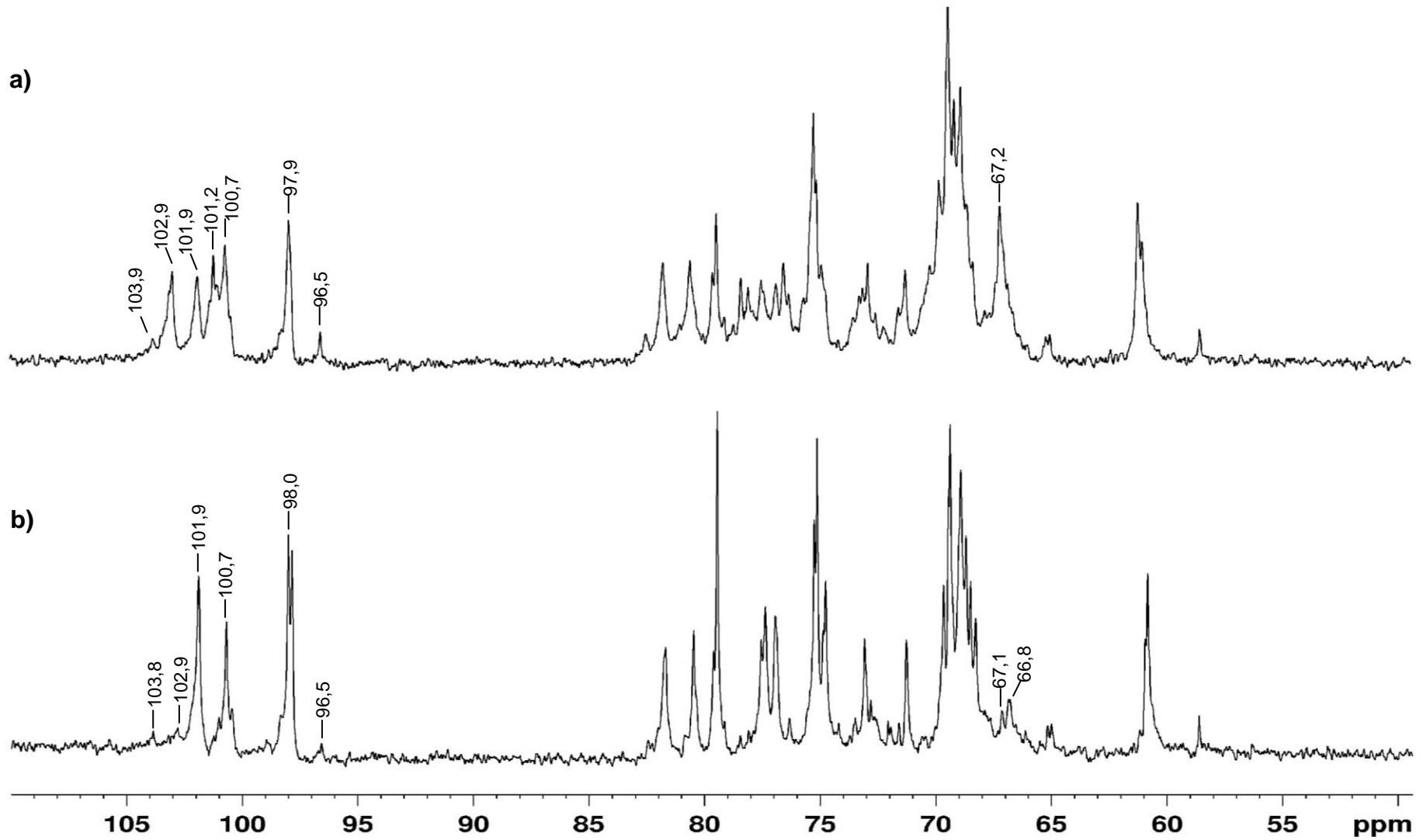
FIGURA 46 – ESPECTROS DE RMN DE ^{13}C DAS AGARANAS AHS-0,75 (a) E AHS-0,75T (b) DE *L. aldingensis*

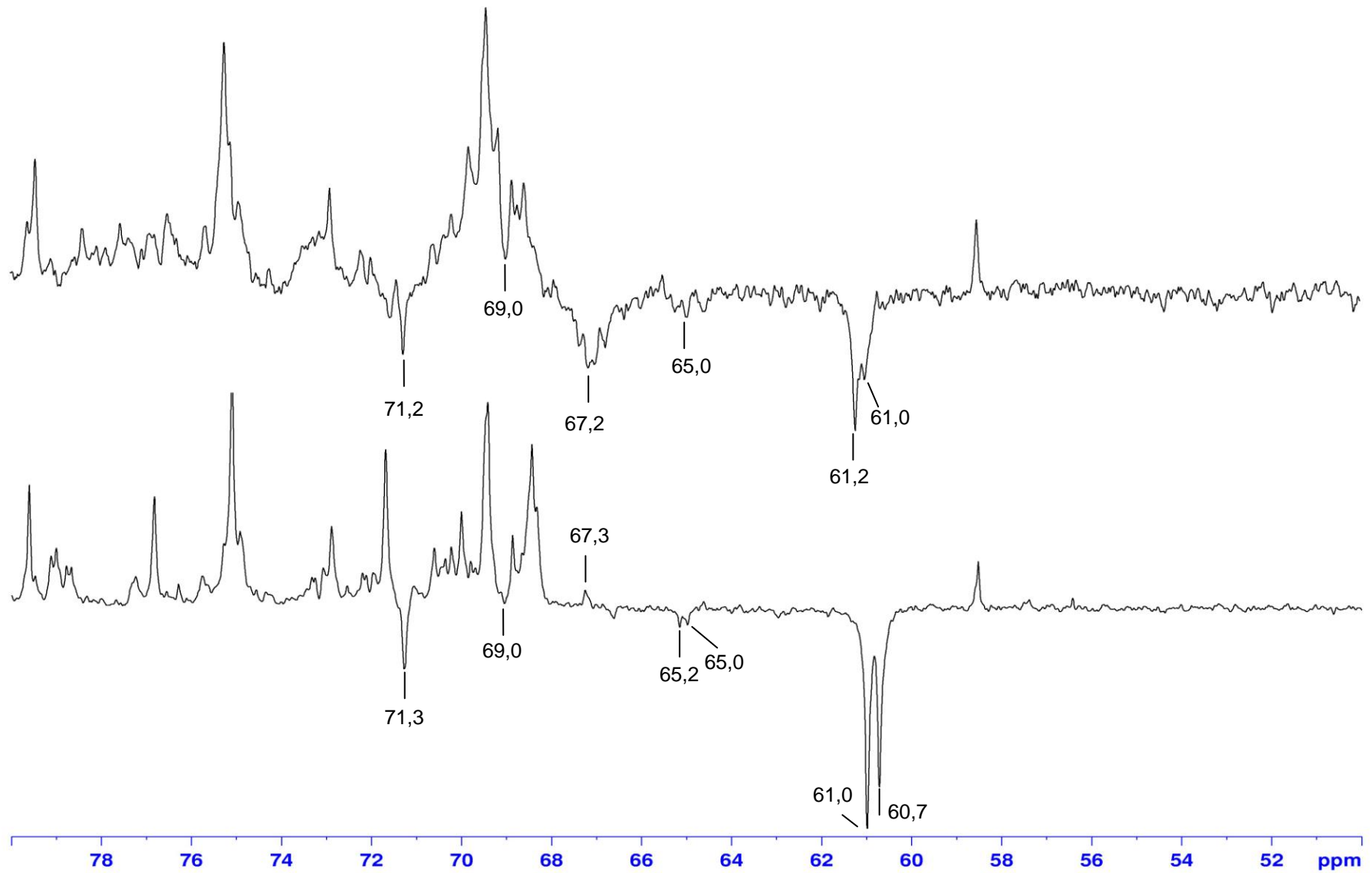
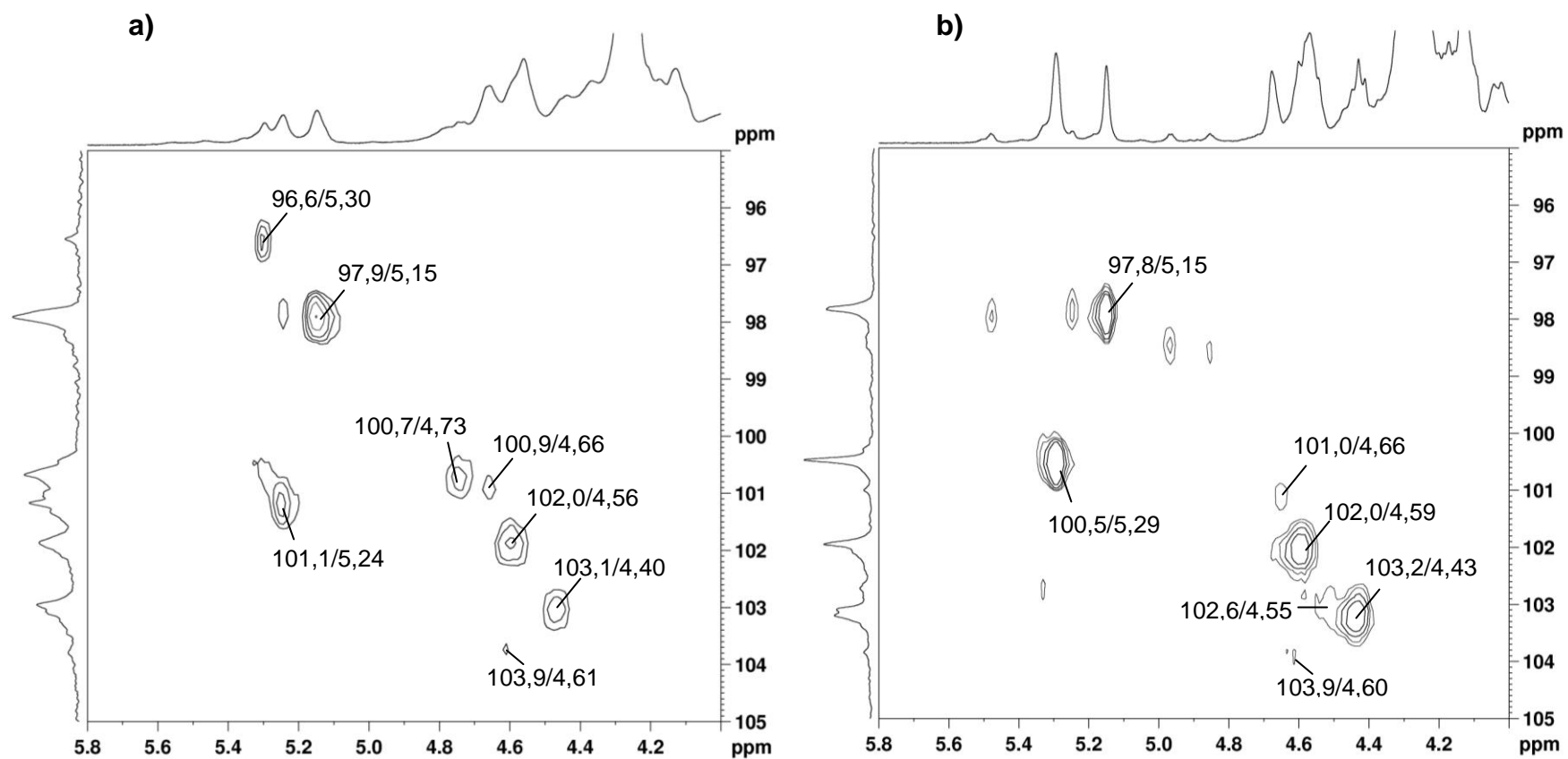
FIGURA 47 – REGIÃO DO ESPECTRO DE RMN DE DEPT DA AGARANA AHS-0,75 E AHS-0,75D DE *L. aldingensis*

TABELA 27 – DESLOCAMENTOS QUÍMICOS (ppm) DOS ESPECTROS DE RMN DA AGARANA PRESENTE NA FRAÇÃO AHS-0,75 E SUA DERIVADA DESSULFATADA AHS-0,75D

Díades e/ou unidades	Fração			
	AHS-0,75		AHS-0,75D	
	Unidade A C-1/H-1	Unidade B C-1/H-1	Unidade A C-1/H-1	Unidade B C-1/H-1
G(6M)(6S)→LA	102,0/4,56	97,9/5,15	102,3, 101,7/4,59	97,8/5,15
G2S(6S)(6M)→LA	100,7/4,73	97,9/5,15		
G(6M)(6S)→L(6S)	103,1/4,40	101,2/5,24		
L3R,6S		100,5/5,33		
G(6M)(6R)→L(3R)			102,6/4,55 103,2/4,43	100,5/5,29
LA2S		96,6/5,30		
TERMINAIS NÃO REDUTORES				
Xyl em C-3 de L	100,9/4,66		101,0/4,66	
Xyl ou Gal em C-6 de G	103,9/4,61		103,9/4,60	

FIGURA 48 – REGIÃO ANOMÉRICA DOS ESPECTROS DE HSQC DA AGARANA NATIVA AHS-0,75 (a) E DESSULFATADA AHS-0,7D (b) DE *L. aldingensis*



4.6.2 Análises de RMN da agarana LHS-0,7 de *L. filiformis*

A análise dos espectros de RMN de ^{13}C da fração LHS-0,7 (Figura 49a) mostrou na região anomérica os sinais em 103,0 e 100,7-101,2 ppm correspondentes às díades G(6M)→L(6S). Ressalta-se que o grupo de sinais em 100,7-101,2 ppm também é correspondente a unidades de β -D-galactose 2-sulfato e de xilose. Após dessulfatação (LHS-0,7D, Figura 49b) é observado o aparecimento do sinal em 102,0 ppm, correspondente a unidades de β -D-galactose ligadas a unidades de α -L-3,6-anidrogactose (97,9 ppm). Este resultado indica que as unidades anidrogactosídicas se encontram ligadas principalmente a unidades de β -D-galactose 2-sulfatadas, estando este resultado de acordo com os dados obtidos do estudo de ciclização por RMN de ^1H da fração LHS-0,7, que demonstrou que as unidades precursoras desta fração se encontram ligadas a unidades A não sulfatadas em C-2. No espectro de RMN da fração LHS-0,7D, pode-se observar ainda os sinais em 103,2 e 100,5 ppm, correspondentes à díade G(6M)→L, respectivamente. No espectro de HSQC (Figura 53), o sinal em 100,3 ppm se mostrou acoplado ao próton em 5,33 ppm, sendo este acoplamento assinalado como o C-1/H-1 das unidades de LG3X. No espectro de RMN de Cosy (Figura não mostrada), o próton em 5,33 ppm apresenta correlação com o próton em 4,04 ppm, sendo que este último se mostrou acoplado ao sinal em 67,2 ppm no espectro de HSQC (Figura 54). O sinal em 67,2 não apresentou inversão no experimento de DEPT (Figura 52b), sendo assinalado como o C-2 das unidades de LG3X. Esses assinalamentos estão de acordo com os obtidos por Usov e Elashvili (1991) para as unidades de LG6S3X presentes num pentassacarídeo isolado da alga *L. nipponica* por hidrólise redutiva parcial.

Na região do anel do espectro de RMN de ^{13}C da fração nativa (Figura 50a) pode-se observar o sinal em 78,0 ppm, correspondente ao C-2 de unidades de β -D-galactose sulfatadas neste carbono. Após dessulfatação (Figura 50b), o desaparecimento deste sinal é acompanhado do aumento do sinal em 70,0 ppm, correspondente ao C-2 destas unidades de β -D-galactose que foram dessulfatadas. Adicionalmente, o grupo de sinais em 66,8-67,3 ppm presente na fração nativa se mostrou ausente na fração dessulfatada, exceto pelo sinal em 67,2 ppm. Os sinais que desapareceram são correspondentes a unidades de galactose 6-sulfatadas. O sinal 67,2 ppm (DEPT não invertido) é correspondente ao C-2 de unidades de α -L-

galactose 3-xilosiladas. O sinal em 58,5 ppm é atribuído ao metil em C-6 das unidades de β -D-galactose.

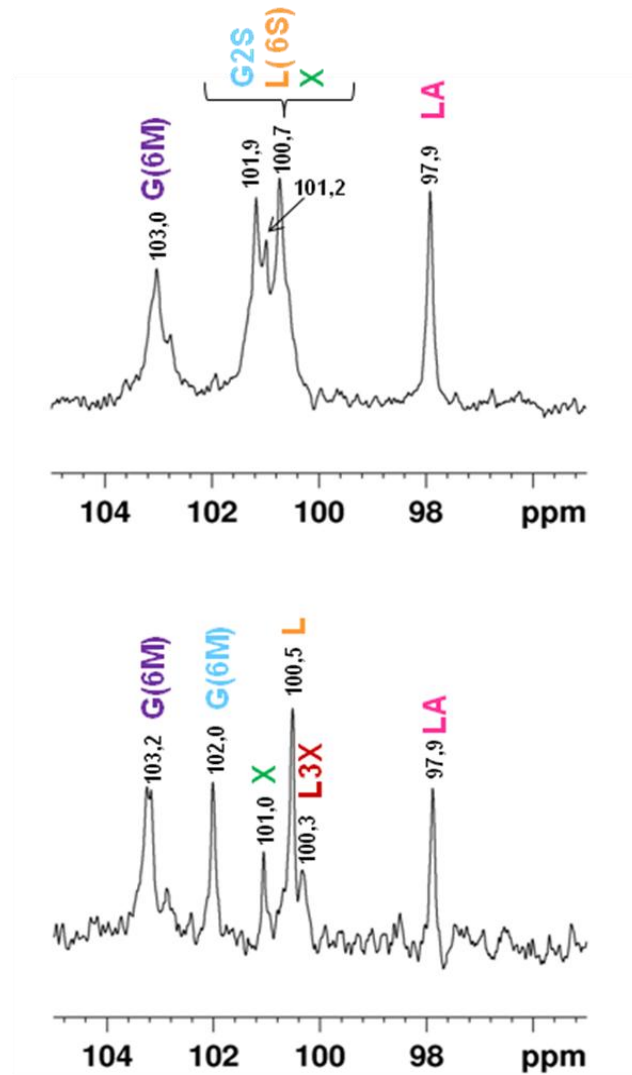
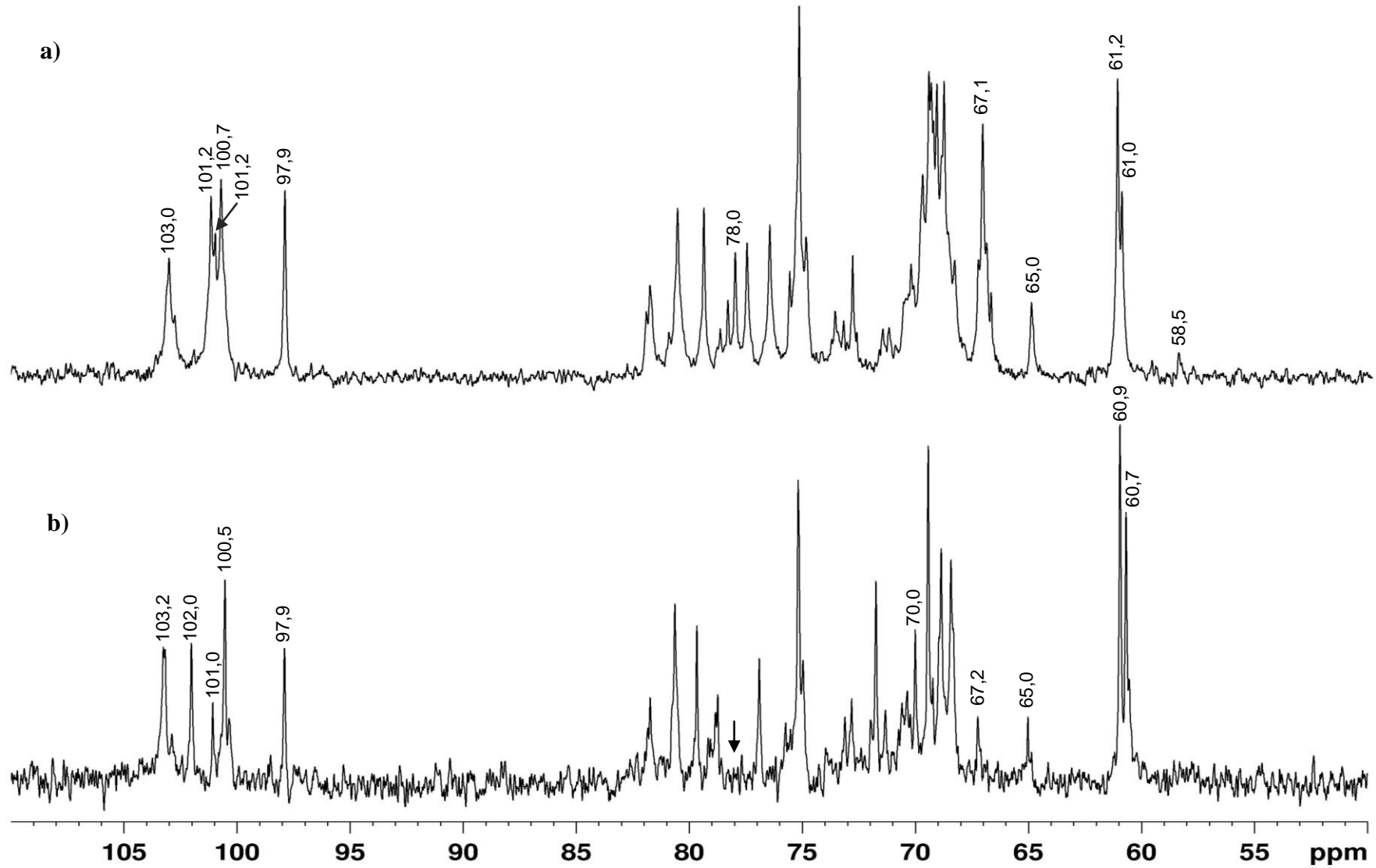
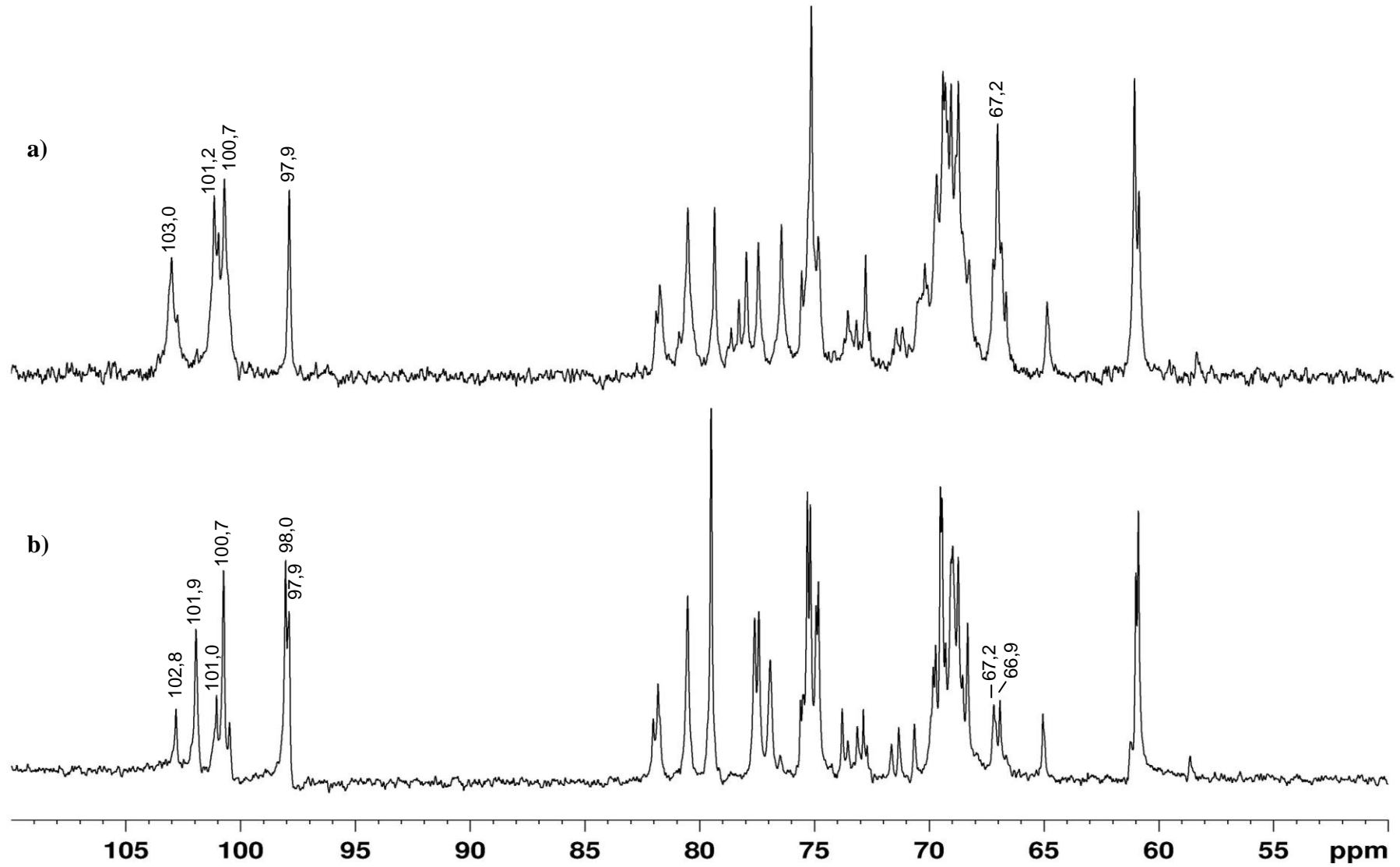


FIGURA 49 – ASSINALAMENTOS NA REGIÃO ANOMÉRICA NOS ESPECTROS DE RMN DA AGARANA NATIVA LHS-0,7 E DESSULFATADA LHS-0,7D

FIGURA 50 - ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DAS AGARANAS LHS2-0,7 (a) E LHS2-0,7D (b) DE *L. filiformis*

Analisando-se o espectro de RMN de ^{13}C da fração LHS-0,7T (Figura 51b), quando comparado ao da fração nativa (Figura 51a), pode-se observar que houve o desaparecimento do sinal em 103,0 ppm (G(6M) quando ligado a L(6S)), concomitante ao aparecimento do sinal em 101,9 ppm e ao aumento do sinal em 97,9-98,0 ppm, indicando a presença da díade de G(6M)→LA na fração álcali tratada. Esta díade não era observada na fração nativa, e deste modo, este resultado indica que as unidades precursoras se encontram ligadas a unidades de G(6M) na fração nativa. Estes dados estão de acordo com os resultados obtidos para o tratamento alcalino desta fração. Adicionalmente foi observada uma grande diminuição do grupo de sinais em 66,9-67,4 ppm na fração nativa. Dois destes sinais foram mantidos após o tratamento alcalino (LHS-0,7T), sendo estes em 66,9 e 67,2 ppm. O último já havia sido assinalado como o C-2 de unidades de L-galactose 3-xilose. Deste modo o sinal em 66,8 ppm pode ser atribuído ao C-6 de unidades de β -D-galactose.

No espectro de RMN de ^{13}C da fração LHS-0,7T, houve o desaparecimento do sinal em 103,0 e a manutenção do sinal em 102,8 ppm. Deste modo, este último sinal, que até então não havia sido assinalado pontualmente, pode corresponder a unidades de G(6M) quando estas estão ligadas às unidades de L3X(6S).

FIGURA 51 - ESPECTROS DE RMN DE ^{13}C DAS FRAÇÕES LHS-0,7 (a) E LHS-0,7T (b) DE *L. filiformis*

No espectro de RMN de DEPT de LHS-0,7 (LHS-0,7D) foi observada a inversão dos sinais em 61,0 e 61,2 (60,7 e 61,0) ppm, correspondentes ao C-6 não substituído de unidades de galactose, em 71,3 e 71,6 (71,3) ppm, correspondentes aos C-6 O-metilados das unidades de galactose e em 69,0 ppm, correspondentes ao C-6 das unidades de 3,6-anidro- α -L-galactose. Os sinais invertidos em 65,0 ppm foram atribuídos ao C-5 das unidades de xilose presentes como unidades simples ligadas às unidades de galactose da cadeia principal. No espectro da fração nativa (LHS-0,7), são observados os sinais em 66,8; 67,2 e 67,4 ppm, correspondentes ao C-6 sulfatado de unidades de galactose. Após dessulfatação, foi possível observar a presença do sinal não invertido em 67,2 ppm, correspondente ao C-2 de unidades de α -L-galactose xilosiladas no C-3 (L3X).

A Figura 53 mostra a região anomérica dos espectros de HSQC da fração LHS-0,7, bem como de sua correspondente fração dessulfatada (LHS-0,7D). Nesta figura está representado um mapa do assinalamento dos deslocamentos químicos observados para as frações LHS-0,7 e LHS-0,7D. Na figura 54 está representado o mapa de assinalamento da região do anel no espectro de HSQC da fração LHS-0,7D.

FIGURA 52 – ESPECTROS DE RMN DE DEPT DA AGARANA NATIVA LHS-0,7 (a) E DESSULFATADA LHS-0,7D (b) DE *L. filiformis*

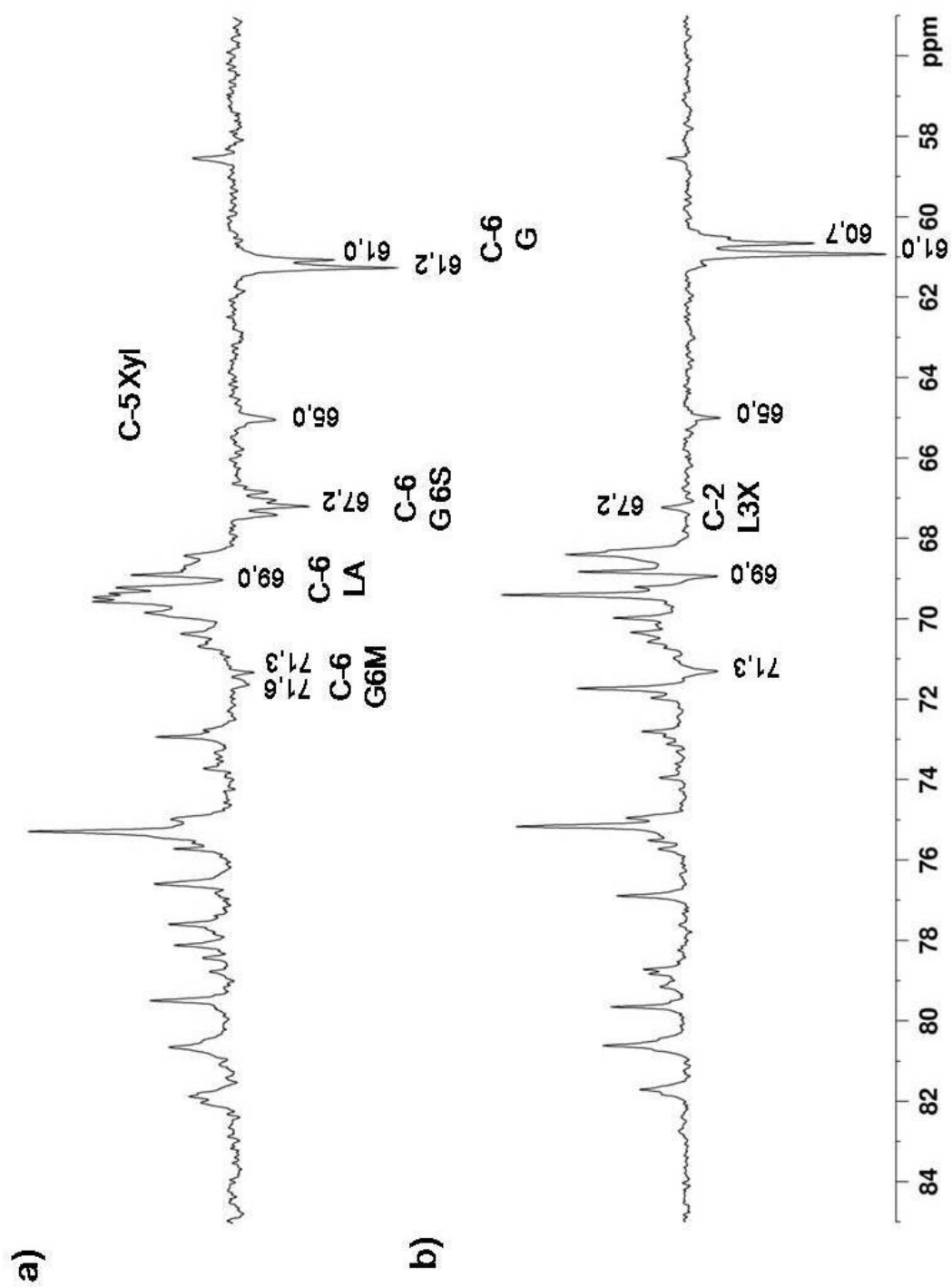


FIGURA 53 – MAPA DE ASSINALAMENTO DA REGIÃO ANOMÉRICA DO ESPECTRO DE HSQC DE LHS-0,7 E LHS-0,7D

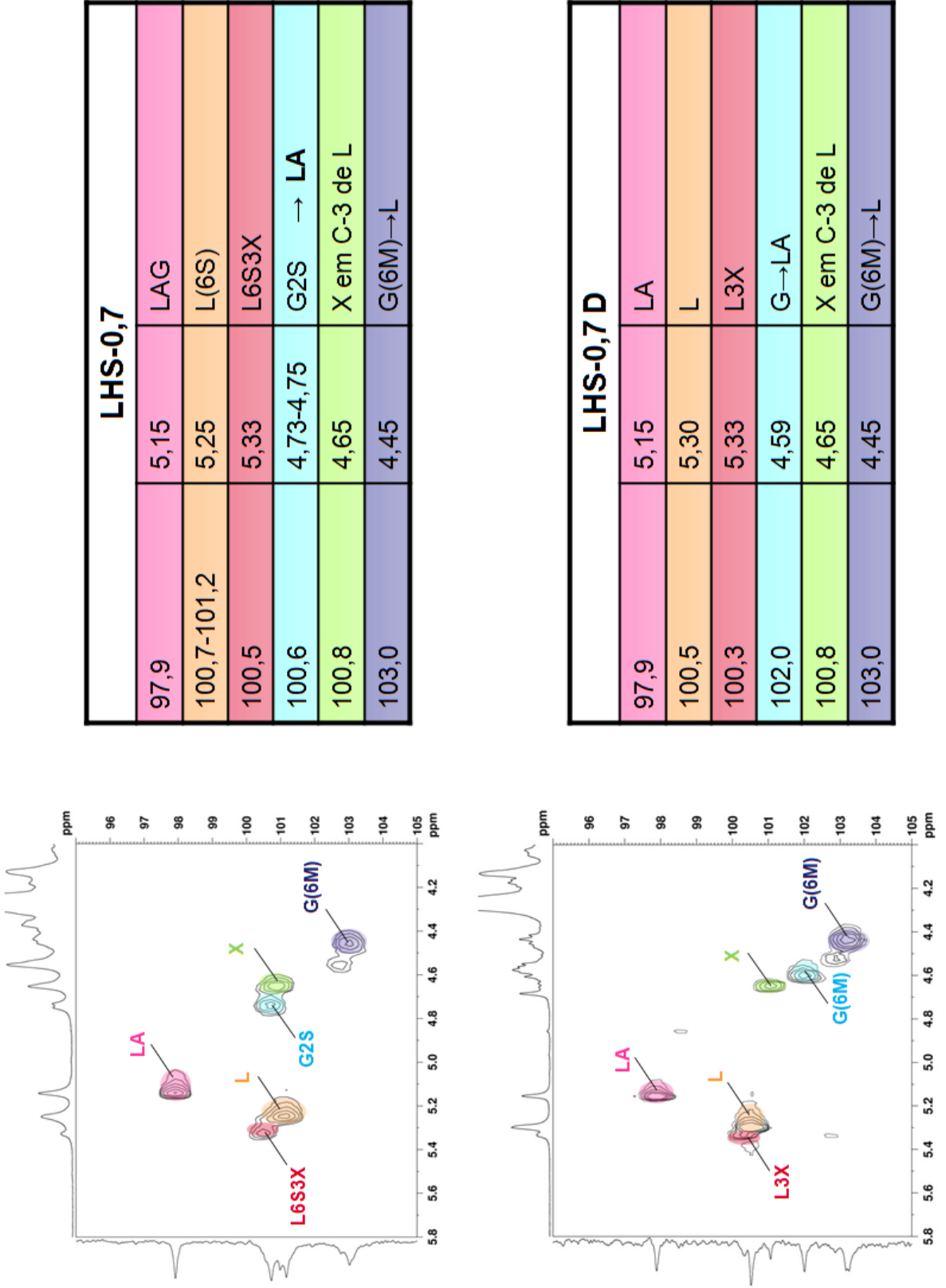
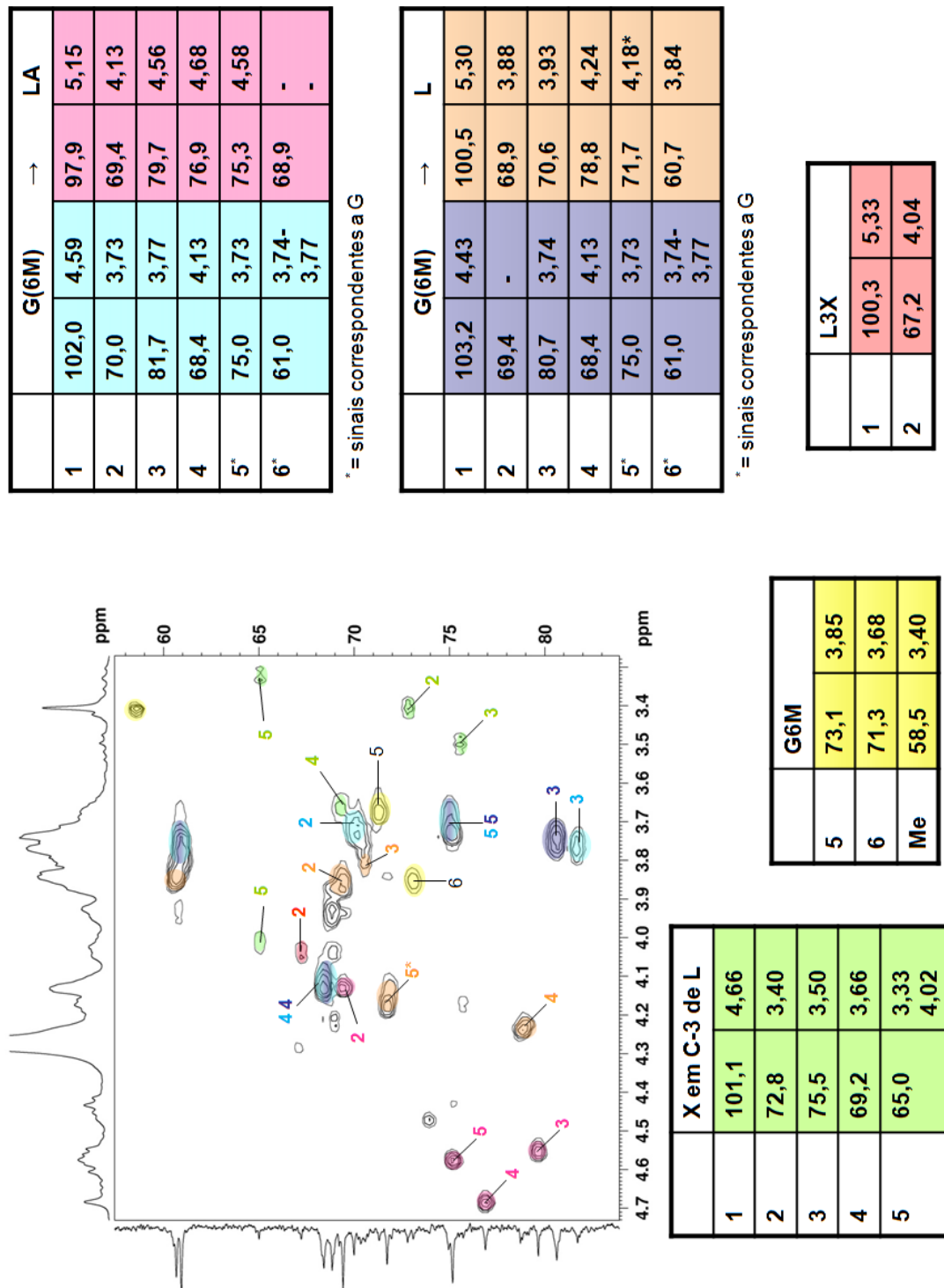


FIGURA 54 – MAPA DE ASSINALAMENTO DA REGIÃO DO ANEL DO ESPECTRO DE HSQC DE LHS-0,7D



4.7 ANÁLISE COMPARATIVA DAS AGARANAS PRODUZIDAS POR ALGAS DO COMPLEXO *Laurencia*

A tabela 28 apresenta os principais monossacarídeos que são constituintes das agaranas do Complexo *Laurencia* que já tiveram suas estruturas químicas investigadas.

A agarana de *Palisada flagellifera*, investigada neste trabalho, é a que apresenta o maior número de diferentes constituintes, sendo a estrutura mais complexa já descrita para o Complexo *Laurencia* (Figura 55).

Ao realizar-se uma análise comparativa das agaranas das duas espécies de *Laurencia* estudadas neste trabalho (*L. aldingensis* e *L. filiformis*) com as das outras espécies do Complexo, pode-se observar que *L. aldingensis* produz uma agarana com uma estrutura química de complexidade intermediária, enquanto que a produzida por *L. filiformis* apresenta uma estrutura relativamente simples.

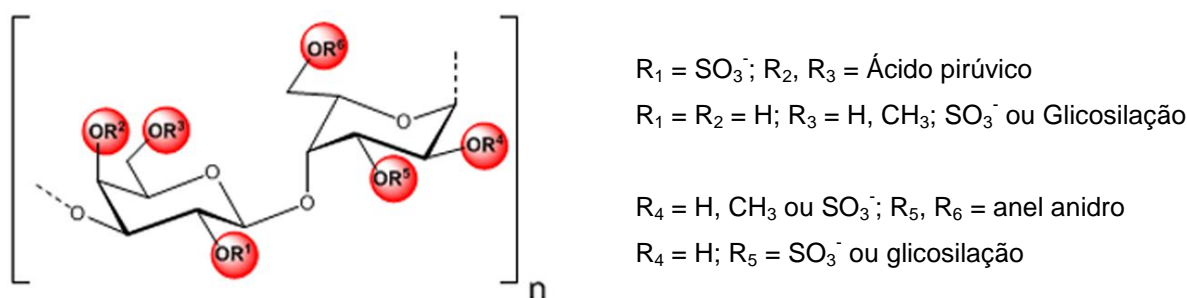


FIGURA 55 – PRINCIPAIS DÍADES PRESENTES NA AGARANA FCS-3

TABELA 28 - PRINCIPAIS MONOSSACARÍDEOS CONSTITUINTES DAS AGARANAS OBTIDAS DO COMPLEXO *Laurencia*.

Agaranas de	Unidades A ^a								Unidades B ^a					Glicosilação		
	G	G6M	GP	GP2S	G2S	G4S(6M)	G4X	G6S	LA	LA2M	L	L2M	L6S	Xyl ^b	Gal ^b	2,3-Gal ^b
<i>L. nipponica</i> ^c	+ ^d	+			+			+	+	+			+	+ ^e		
<i>L. undulata</i> ^f	+						+		+	+				+		
<i>L. thyrifera</i> ^g	+		+		+			+	+		+	+		+		
<i>L. coronopus</i> ^h	+	+						+	+				+	+		
<i>L. pinatifida</i> ⁱ	+	+			+				+	+		+	+	+		
<i>L. gemmifera</i> ^j	+	+	+						+	+				+		
<i>L. flexilis</i> ^{k,l}	+ ^k	+ ^{k,l}				+ ^l		+ ^k	+ ^{k,l}	+ ^k						
<i>P. flagellifera</i> ^m	+	+		+	+			+	+			+	+	+ ⁿ	+ ⁿ	+ ⁿ
<i>L. aldingensis</i> ^(o)	+	+			+			+	+		+	+	+	+ ⁿ	+ ⁿ	
<i>L. filiformis</i> ^(o)	+	+			+			+	+		+		+	+ ^e		

^a = Nomenclatura de Knutsen *et al.* (1994)

^b = Xyl, Gal e 2,3-Gal correspondem a xilose, galactose e 2,3-O-metilgalactose, respectivamente.

^c = De acordo com Usov e Elashvili (1991). Adicionalmente contem 3-O-metilgalactose.

^d = Presente nas respectivas agaranas.

^e = Glicosilação em C-3 de α -L-galactose 6-sulfato.

^f = De acordo com Hirase (1982).

^g = De acordo com Miller, Falshaw e Furneaux (1993b). Dados da agarana submetida a tratamento alcalino.

^h = De acordo com Usov e Elashvili (1997). Adicionalmente contem 3-O-metilgalactose.

ⁱ = De acordo com Bowker e Turvey (1968a, b). Adicionalmente contem 2-O-metilgalactose 6-sulfato.

^j = De acordo com Valiente *et al.* (1993). Dados da agarana dessulfatada.

^{k,l} = De acordo com Turvey (1964) e Villanueva *et al.* (2010), respectivamente.

^m = De acordo com o presente trabalho. Adicionalmente, contem outras unidades.

ⁿ = Glicosilação em C-3 de α -L-galactose 6-sulfato e/ou C-6 de β -D-galactose.

^o = De acordo com o presente trabalho. Adicionalmente, contem outras unidades.

4.8 ATIVIDADE ANTIVIRAL CONTRA O HSV-1 E O HSV-2

As lesões herpéticas produzidas pelo *Herpes simplex* vírus (HSV) são consideradas um problema de saúde mundial.

As infecções causadas pelos vírus *Herpes simplex* tipos 1 (HSV-1) e 2 (HSV-2) podem ser primárias e recidivantes. A maioria das infecções orais é causada por HSV-1 e as infecções genitais por HSV-2 (WIGG; MIRANDA, 2008).

Embora o uso de antivirais tanto a nível tópico como sistêmico já tenha sido amplamente discutido sobre sua eficácia, enfatizando a importância do uso do aciclovir e de seus efeitos reduzidos de toxicidade (De CLERCK, 2004), tem-se observado a emergência de estirpes resistentes a esse antiviral. Dessa forma, a busca por outras opções de tratamento deve ser considerada (FERREIRA; MARTINS; ROMANOS, 2009).

Neste contexto, destaca-se a potente atividade antiviral apresentada por muitos polissacarídeos sulfatados contra vírus envelopados, ex.: vírus da imunodeficiência humana (HIV), *Herpes simplex* vírus (HSV) e citomegalovírus humano (DAMONTE; MATULEWICZ; CEREZO, 2004).

Os vírus *Herpes simplex* infectam as células do hospedeiro mediante interação entre a glicoproteína C do envelope viral e o heparan sulfato presente na superfície das células. O complexo vírus-célula é formado através de interações entre grupos aniônicos (principalmente sulfato) no polissacarídeo e aminoácidos básicos da glicoproteína viral, e também por grupos não iônicos, dependendo da hidrofobicidade dos aminoácidos intercalados entre os grupos básicos da zona de ligação da glicoproteína (DAMONTE; MATULEWICZ; CEREZO, 2004).

O efeito inibitório dos polissacarídeos sulfatados tem sido descrito principalmente devido à sua habilidade em interferir na etapa inicial da interação do vírus com a célula hospedeira, e, conseqüentemente, ao bloqueio da entrada viral na célula. Isto ocorre devido à grande densidade de cargas negativas presentes nestes compostos polissulfatados, o que torna possível a interação com os domínios da glicoproteína viral carregados positivamente. Tem sido proposto também que além da proteção das cargas positivas da glicoproteína viral, os polissulfatos promovem um potencial negativo adicional, que interrompe o contato inicial vírus-célula (CALLAHAN *et al.*, 1991).

Tendo em vista a importância dos polissacarídeos sulfatados como potenciais agentes antivirais, frações polissacarídicas das algas vermelhas *Palisada flagellifera* (FCS-3), *Laurencia filiformis* (LHS) e *Laurencia aldingensis* (AHS), além de uma fração de fucanas sulfatadas da alga *Lobophora variegata* (Q2-0,6), foram submetidas a testes de atividade biológica contra o HSV-1 e o HSV-2.

Para a realização destes testes foi utilizada a cultura de células Vero (fibroblasto de rim de macaco *Cercopithecus aethiops*) e as amostras de vírus *Herpes simplex* tipos 1 e 2, resistentes ao aciclovir, isoladas a partir do fluido de vesículas características de herpes labial e de lesões da genitália, respectivamente, pertencem à coleção do LEDAC (Laboratório Experimental de Drogas Antivirais e Citotóxicas/IMPPG/UFRJ).

Os ensaios de atividade antiviral dos extratos foram avaliados mediante redução do título viral. Os títulos de vírus foram calculados utilizando o método de Reed e Muench (1938), método estatístico e expresso como dose infecciosa para 50% da cultura do tecido ($DICT_{50}$).mL⁻¹. Inicialmente, as monocamadas de células Vero foram tratadas com os polissacarídeos nas concentrações máximas não tóxicas (CMNTs) e uma suspensão viral (100 $DICT_{50}$.mL⁻¹) foi adicionada às culturas de células tratadas e não tratadas com os polissacarídeos. Os títulos de vírus foram determinados nos sobrenadantes coletados após 48h de incubação a 37 °C em atmosfera 5% de CO₂. As atividades antivirais foram expressas pela percentagem de inibição (PI) (NISHIMURA *et al.*, 1977) utilizando os valores antilogarítmicos de $TCID_{50}$ como segue: $PI = [1 - (\text{antilogarítmo do valor de teste} / \text{antilogarítmo do valor controle})]$.

Para a avaliação da atividade antiviral das galactanas sulfatadas produzidas pela alga *P. flagellifera*, inicialmente foi realizado o ensaio de citotoxicidade, que foi baseado na mudança de morfologia celular e na captação do corante vermelho neutro. Apesar de a galactana sulfatada ter promovido mudanças na morfologia celular a uma concentração de 50ug.mL⁻¹, o valor de CC_{50} (50% da concentração citotóxica) foi superior a 200ug.mL⁻¹ (Tabela 29).

TABELA 29 - CITOTOXICIDADE E ATIVIDADE ANTIVIRAL DA GALACTANA SULFATADA OBTIDA DA ALGA *Palisada flagellifera*

Polissacarídeos sulfatado	MNTC ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	CC ₅₀ ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	HSV-1 PI (%)	HSV-2 PI (%)
FCS-3	50	> 200	0	87,1

MNTC: concentração máxima não tóxica; CC₅₀: 50% da concentração citotóxica; HSV-1: *Herpes simplex* vírus tipo 1, HSV-2: *Herpes simplex* vírus tipo 2, PI: percentagem de inibição, FCS-3: Galactana sulfatada obtida da alga vermelha *P. flagellifera*.

A atividade antiviral, realizada pela determinação da redução do título viral, mostrou que a galactana FCS-3 foi capaz de inibir a propagação do HSV-2 com uma percentagem de inibição de 87,1%, enquanto nenhuma atividade foi observada para o vírus HSV-I (Tabela 29). O valor de CE₅₀ da galactana para HSV-2 foi de 1,14 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e o índice de seletividade foi superior a 175,4 (Tabela 30).

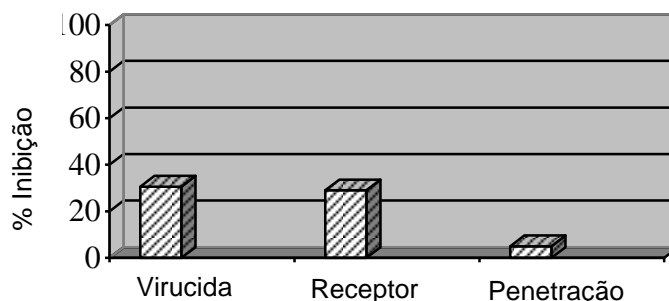
TABELA 30 – CONCENTRAÇÃO EFETIVA PARA REDUZIR O TÍTULO VIRAL EM 50% (CE₅₀) E ÍNDICE DE SELETIVIDADE (IS) DA GALACTANA SULFATADA OBTIDA DE *Palisada flagellifera*

CC ₅₀ ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	CE ₅₀ ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)		IS	
	HSV-1	HSV-2	HSV-1	HSV-2
> 200	0	1,14	0	>175,4

HSV-1: *Herpes simplex* vírus tipo 1, HSV-2: *Herpes simplex* vírus tipo 2, SI: índice de seletividade (CC₅₀/EC₅₀)

Com o objetivo de verificar qual o mecanismo de inibição do HSV-2 pelas galactanas sulfatadas de *P. flagellifera*, alguns experimentos foram realizados (Figura 56).

FIGURA 56 – MECANISMO DE AÇÃO ANTIVIRAL DA GALACTANA SULFATADA DE *P. flagellifera* MEDIANTE O HSV-2



Atividade Virucida – partículas de HSV-2 foram tratadas com a galactana sulfatada. A amostra foi incubada a 37°C por 2 h, diluída, e na sequência foi inoculada em monocanadas de células Vero.

Atividade sobre o Receptor – a galactana sulfatada foi adicionada às células Vero no período de 1h pré-infecção.

Atividade de Penetração – a galactana sulfatada foi adicionada às células Vero no período de 1h pós-infecção.

Na figura 56 pode ser verificado que a galactana sulfatada FCS-3 apresentou atividade virucida com uma percentagem de inibição de 30,6%. Além disso, o pré-tratamento das células com a galactana sulfatada mostrou uma percentagem de inibição de 29%. No ensaio de penetração, apenas 5% de inibição foi observado.

As galactanas sulfatadas das algas *L. aldingensis* (AHS) e *L. filiformis* (LHS), bem como a fração de fucanas sulfatadas Q2-0,6 (obtida da alga parda *Lobophora variegata*) também foram submetidas a testes de atividade antiviral contra o HSV-1 e o HSV-2. Todas estas frações apresentaram a $CC_{50} > 200 \mu\text{g.L}^{-1}$. As concentrações empregadas para estas análises prévias foram de $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para a fração AHS (*L. aldingensis*) e de $200 \mu\text{g.L}^{-1}$ para as frações LHS (*L. filiformis*) e Q2-0,6 (*L. variegata*). A atividade antiviral, realizada pela determinação da redução do título viral, mostrou que estas frações foram capazes de inibir a propagação do HSV-1 com uma percentagem de inibição de 82,2, 99,0 e 98,2% respectivamente. Contra o HSV-2, as percentagens de inibição foram de 77,6, 99,0 e 99,9%, respectivamente (Tabela 31).

TABELA 31 - CITOTOXICIDADE E ATIVIDADE ANTIVIRAL DAS GALACTANAS SULFATADAS OBTIDAS DAS ALGAS VERMELHAS *L. aldingensis* (AHS) e *L. filiformis* (LHS) E DA ALGA PARDA *L. variegata* (Q2-0,6)

Polissacarídeos sulfatados	CC ₅₀ ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Concentração empregada ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	HSV-1 PI	HSV-2 PI
AHS	> 200	100	82,2	77,6
LHS	> 200	200	99,0	99,0
Q2-0,6	> 200	200	98,2	99,9

CC₅₀: 50% da concentração citotóxica; HSV-1: herpes simplex vírus tipo 1, HSV-2: herpes simplex vírus tipo 2, PI: percentage de inibição

Os valores de CE₅₀ das galactanas sulfatadas AHS e LHS para HSV-1 foram de 68,6 e 8,6 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente, com índices de seletividade (IS) superiores a 2,9 e 23,2, respectivamente (tabela 32). Para HSV-2, estas galactanas apresentaram valores de EC₅₀ de 14,8 e 2,6 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente, sendo os índices de seletividade superiores a 13,5 e 76,9, respectivamente (Tabela 32).

TABELA 32 – CONCENTRAÇÃO EFETIVA PARA REDUZIR O TÍTULO VIRAL EM 50% (CE₅₀) E ÍNDICE DE SELETIVIDADE (IS) DAS GALACTANAS SULFATADAS OBTIDAS DAS ALGAS VERMELHAS *L. aldingensis* (AHS) e *L. filiformis* (LHS) E DA ALGA PARDA *L. variegata* (Q2-0,6)

Polissacarídeos sulfatados	CC ₅₀ ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	HSV-1	HSV-2	IS	
		CE ₅₀ ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	CE ₅₀ ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	HSV-1	HSV-2
AHS	> 200	68,6	14,8	> 2,9	>13,5
LHS	> 200	8,6	2,6	>23,2	>76,9
Q2-0,6	> 200	0,045	0,06	>4.444,4	>3333,3

CC₅₀ = concentração citotóxica para 50% das células em cultura; HSV-1 = vírus *Herpes simplex* tipo 1; HSV-2 = vírus *Herpes simplex* tipo 2; CE₅₀ = concentração efetiva capaz de inibir 50% da propagação viral; IS = Índice de seletividade (CC₅₀/EC₅₀)

A fração de fucanas sulfatadas foi a que apresentou os melhores resultados de atividade antiviral tanto para o HSV-1 quanto para o HSV-2. Essa fração apresentou os valores de CE_{50} para HSV-1 e HSV-2 de 0,045 e 0,06 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectivamente, com índices de seletividade superiores a 4.444,4 e 3.333,3, respectivamente.

As fucanas presentes na fração Q2-0,6 de *Lobophora variegata* ($M_w = 106$ kDa) apresentam como monossacarídeos neutros fucose (37,1%), xilose (31,2%), manose (9,7%), galactose (14,7%) e glucose (7,3%). Como grupos ácidos, esta fração apresenta 11,0% de ácidos urônicos e elevado grau de sulfatação (23,0%). As unidades de fucose se apresentam na forma 2-, 2,3- e 4-ligadas (~ 27,0% no total). Grupos sulfato esterificam parcialmente o C-3 das unidades 4-ligadas e C-4 das unidades 2,3-ligadas. Unidades terminais não redutoras não substituídas e trissulfatadas de fucose estão presentes em percentagens similares (somando ~ 8,0%). Cerca de 45,0 e 25,0% das unidades de xilose estão presentes como terminais não redutores não substituídos e como unidades 2-ligadas, respectivamente. Uma característica peculiar desta fucana é a presença de xilose sulfatada (terminais não redutores 4-sulfato), as quais perfazem 30,0% do total destas unidades. Para as unidades de manose observa-se uma variedade de derivados di- e tri-substituídos, indicativos de que estas unidades representam pontos de ramificação do polímero. As unidades de galactose se apresentam como 6-ligadas, 6-ligadas 2,3-di-sulfatadas e 3-ligadas 2-sulfatadas, enquanto glucose, bem como ácido glucurônico se apresentam na forma 4-ligada e como terminais não redutores (FERREIRA, 2007).

O alto de grau de complexidade destas fucanas reside na presença de diferentes monossacarídeos, heterogeneidade no padrão das ligações glicosídicas e no padrão de sulfatação, além da presença de ácidos urônicos (FERREIRA, 2007).

Muitos estudos envolvendo as fucanas de algas pardas têm sido desenvolvidos devido às diversas atividades biológicas apresentadas por estes polissacarídeos, tais como, atividade anticoagulante (NAGUMO; NISCHINO, 1996; CHAUBET *et al.*, 2000), antitumoral (ITOH *et al.*, 1993) e antiviral (BABA *et al.*, 1988; McCLURE *et al.*, 1992). Dentre outras atividades, estes polissacarídeos podem agir ainda como ligantes para selectinas (PREOBRAZHENSAYA *et al.*, 1997).

As atividades biológicas das fucanas têm sido relacionadas ao elevado grau de sulfatação desses polímeros, bem como à hidrofobicidade conferida pelo C-6 metílico

destas unidades, embora estas atividades dependam da estrutura química fina e do peso molecular (USOV *et. al.*, 1998).

Como regra geral, é suposto que a atividade antiviral dos polissacarídeos sulfatados é maior quando se aumenta o peso molecular e o grau de sulfatação destes polímeros (WITVROW; De CLERCQ, 1997). Mas isto é verdade dentro de certos limites, visto que outros fatores, por exemplo: forma da cadeia polissacarídica, influência de sítios hidrofóbicos e posicionamento dos grupos sulfato também podem interferir na atividade biológica produzida por estes polissacarídeos (DAMONTE; MATULEWICZ; CERREZO, 2004).

Neste trabalho, as três frações de polissacarídeos obtidos de algas vermelhas, LHS, AHS e FCS-3 apresentaram quantidades semelhantes de grupos sulfato (20,5, 21,1 e 21,2%, respectivamente), mas apresentaram diferenças de inibição contra os HSV, o que reforça o fato de que o teor de grupos sulfato é apenas um dos fatores determinantes dessa atividade.

Um exemplo de agaranas estudadas que apresentaram atividade contra os HSV (1 e 2) são as de *Bostrychia montagnei*. As frações B₄-B₆ obtidas desta alga apresentaram o teor de grupos sulfato entre 22,0 a 24,0% e massa molecular média entre 34,0 a 43,7 kDa. As galactanas destas frações são constituídas de unidades de β-D-galactose 3-ligadas com monossulfatação em C-2 (2,1-7,2%), C-4 (11,6-18,4%) e C-6 (12,4-20,0%) ou não sulfatação (12,5-19,5%). Cerca de 40-60% das unidades 4-ligadas são sulfatadas em C-3, com menores quantidades de unidades di-sulfatadas em C-2 e C-3 (13,0-16,8%) e em C-3 e C-6 (8,4-14,0%). Todas as frações apresentaram 15,2-20,8% de unidades de 3,6-anidrogactose e seu derivado 2-O-metilado. As frações B₁-B₃ desta mesma alga se mostraram inativas contra o HSV-1 e o HSV-2. Estes polissacarídeos inativos apresentaram baixos teores de sulfato (11,2-16,2%) e massas moleculares média de 5,6-31,3 kDa. Deste modo os autores correlacionaram a efetividade da atividade antiviral com o maior grau de sulfatação e a maior massa molecular das frações das galactanas testadas (DUARTE *et al.*, 2001).

A alta atividade anti-HSV-1 e anti-HSV-2 descrita para as agaranas da alga vermelha *Acanthophora spicifera* foi correlacionada com a presença da díade G2S→L6S, que assume uma conformação estruturalmente análoga à seqüência mínima do heparan sulfato, podendo ser este o fator responsável pela formação do complexo do polissacarídeo com a glicoproteína C viral. A fração H (primeira extração

com água a 70 °C) foi a mais ativa, apresentando valores de IC_{50} de 0,8 e 0,9 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para o HSV-1 e o HSV-2, respectivamente. Os autores relataram que o tratamento alcalino em uma das frações de *A. spicifera* levou a uma redução da atividade antiviral desta (DUARTE *et al.*, 2004).

Os estudos de ciclização realizados nas agaranas estudadas no presente trabalho mostraram a ausência das díades G2S→L6S, visto que as unidades precursoras destas galactanas se encontram ligadas a unidades de G(6M)(6S)(6R). Destaca-se que as atividades antivirais desempenhadas pelas frações FCS-3, AHS e LHS se mostraram inferiores às apresentadas pelas agaranas de *Acanthophora spicifera*. Deste modo, um dos fatores responsáveis pela diminuição das atividades das agaranas investigadas neste trabalho pode ser a ausência das díades G2S→L6S.

5. CONCLUSÕES

Como conclusões, a alga *P. flagellifera* sintetiza uma família de agaranas sulfatadas, metiladas e piruvatadas como polissacarídeos majoritários solúveis em água.

A fração FCS-3 mostrou uma estrutura química complexa, com pelo menos 18 tipos de derivativos. As unidades A são principalmente piruvatadas e 2-sulfatadas (~34%) e metiladas em C-6 (~34%). Sendo estas últimas parcialmente 2- e 2,4-sulfatadas. Menores quantidades de β -D-galactose 2-, 6- e 2,6-sulfatadas, 6-glicosiladas e não substituídas estão também presentes. As unidades B são compostas predominantemente pelas unidades ciclizadas 3,6-anidrogalactose e 3,6-anidrogalactose 2-metil (~56%).

As unidades de β -D-galactose (6-metil) estão ligadas a unidades de 3,6-anidrogalactose, enquanto as unidades de 4,6-O-(1'-carboxietilideno)- β -D-galactose (forma R) 2-sulfatadas podem estar ligadas e/ou adjacentes às unidades de 3,6-anidro- α -L-galactopiranosose e/ou a unidades de α -L-galactose.

Uma proporção significativa de unidades B (~20%) são representadas por unidades de α -L-galactose 6-sulfato substituídas em C-3 por unidades glicosídicas ou grupos sulfato, o que faz com que estas não sejam ciclizáveis a 3,6-anidrogalactose. Adicionalmente, baixas percentagens de sulfato e metoxil no C-2 das unidades de α -L-galactose e α -L-galactose também estão presentes.

A complexidade da agarana FCS-3 é ainda aumentada pela presença de unidades simples de 2,3-di-O-metil-galactose e galactose no C-6 e/ou C-3 das unidades de β -D-galactose e α -L-galactose, respectivamente.

As unidades precursoras, L6S e L2M,6S estão presentes em percentagens relativamente baixas. O estudo da cinética de ciclização de FCS-3 mostrou resultados similares àqueles obtidos para a díade G(6M)→L6S, sugerindo que em *P. flagellifera*, as unidades ciclizáveis estão ligadas a unidades de G6M, G, G6S ou G6R.

O estudo da estrutura química das frações de galactanas homogêneas obtidas das algas *L. aldingensis* (AHS-0,75) e *L. filiformis* mostrou que estas são do tipo agaranas naturalmente 6-O-metiladas e, diferentemente de *P. flagellifera*, não apresentam acetal de ácido pirúvico. Estudos de ciclização mostraram que em ambas

as galactanas, as unidades precursoras se encontram ligadas a unidades de G(6M)(6S)(6R).

As agaranas obtidas de *L. aldingensis* são compostas principalmente pelas díades G(6M)→LA, G2S→LA G(6M)→L(6S). A presença de LA2S também foi observada para esta agarana, bem como uma pequena quantidade de LA2M. Unidades terminais de xilose e galactose glicosilando os C-3 e C-6 das unidades de α-L-galactose e β-D-galactose também foram observadas para estas galactanas.

As agaranas presentes na fração LHS-0,7 (*L. filiformis*) apresentaram uma estrutura mais simples, sendo constituídas principalmente pelas díades de G(6M)→L(6S) e G2S→LA. Menores quantidades da díade G(6M)→L6S3X também foram observadas para esta galactana.

A fração FCS-3 (Palisada flagelífera) apresentou atividade nula contra o vírus HSV-1, mas se mostrou eficaz contra o HSV-2.

As frações LHS e AHS, apresentaram atividade contra HSV-1 e HSV-2, mas as respostas foram diferentes para cada uma destas frações, sendo LHS a mais efetiva contra ambos os tipos de HSV.

6. REFERÊNCIAS

- ANDERSON, N.S.; REES, D.A. Porphyran: a polysaccharide with a masked repeating structure. **J. Chem. Soc.**, p. 5880-5887, 1965.
- ARMISEN, R.; GALATAS, F. Agar. In: PHILLIPS, G. O.; WILLIAMS, P. A. **Handbook of hydrocolloids**. p. 21-40, Cambridge, England: CRC Press, 2000.
- ASPINALL, G.O. **Polysaccharides**. First edition. Pergamon Press, New York, p. 228, 1970.
- BABA, M.; SNOECK, R.; PAULWELS.; De CLERCQ, E. Sulfated polysaccharides are potent and selective inhibitors of various enveloped viruses, including herpes simplex virus, cytomegalovirus, vesicular stomatitis virus and human immunodeficiency virus. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 32, p. 1742-1745, 1988.
- BATEY, J.F.; TURVEY, J.R. The galactan sulphate of the red alga *Polysiphonia lanosa*. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 43, p. 133-143, 1975.
- BLOUIN, N. A.; BRODIE, J. A.; GROSSMAN, A. C.; XU, P.; BRAWLEY, S. H. *Porphyra*: a marine crop shaped by stress. **Trends in plant science.**, Review, v. 16, p. 29-37, 2011.
- BOCK, K.; PEDERSEN, C.; PEDERSEN, H. Carbon-13 nuclear magnetic resonance data for oligosaccharides. **Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.**, v. 42, p. 193-225, 1984.
- BOREFREUND, E.; PUERNER, J. Toxicity determined by morphological alterations and neutral red absorption. **Toxicol. Lett.**, v. 24, pp. 119-124, 1985.
- BOUZON, Z. L.; OURIQUES, L. C. Characterization of *Laurencia arbuscula* spore mucilage and cell walls with stains and FITC-labelled lectins. **Aquat. Bot.**, v. 86, p. 301-308, 2007.
- BOWKER, D.M.; TURVEY, J.R. Water-soluble polysaccharides of the red alga *Laurencia pinnatifida*. Part I. Constituent units. **J. Chem. Soc.**, p. 983-988, 1968a.
- BOWKER, D.M.; TURVEY, J.R. Water-soluble polysaccharides of the red alga *Laurencia pinnatifida*. Part II. Methylation analysis of the galactan sulphate. **J. Chem. Soc.**, p. 989-992, 1968b.
- CÁCERES, P. J.; CARLUCCI, M. J.; DAMONTE, E. B.; MATSUHIRO, B.; ZUÑIGA, E. A. Carrageenans from Chilean samples of *Stenogramme interrupta* (Phylloporaceae): structural analysis and biological activity. **Phytochem.**, Oxford, v. 53, p. 81-86, 2000.
- CALLAHAN, L.; PHELAN, M.; MALLISON, M., NORCROSS, M. Dextran sulfate blocks antibody binding to the principal neutralizing domain of human immunodeficiency virus type 1 without interfering with gp120-CD4 interactions. **J. Virol.**, v. 65, p. 1543-1550, 1991.

CAMPO, V. L.; KAWANO, D. F.; DA SILVA JR.; D. B.; CARVALHO, I. Carrageenans: Biological properties, chemical modifications and structural analysis – A review. **Carbohydr. Polym.**, v. 77, p. 167-180, 2009.

CARDOSO, M.A.; NOSEDA, M.D.; FUJII, M.T.; ZIBETTI, R.G.M; DUARTE, M.E.R. Sulfated xylomannans from red seaweeds *Chondrophyucus papillosus* and *P. flagellifera* (Ceramiales) from Brazil. **Carbohydr. Res.**, v. 342, p. 2766-2775, 2007.

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

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

CASES, M.R.; STORTZ, C.A.; CEREZO, A.S. Methylated, sulphated xylogalactans from the red seaweed *Corallina officinalis*. **Phytochemistry**, v. 31(11), p. 3897-3900, 1992.

CASES, M.R.; STORTZ, C.A.; CEREZO, A.S. Structure of the 'corallinans'-sulfated xylogalactans from *Corallina officinalis*. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 16(2), p. 93-97, 1994.

CASES, M. R.; CEREZO, A. S.; STORTZ, C. A. Separation and quantification of enantiomeric galactoses and their mono-O-methylethers as their diastereomeric acetylated 1-deoxy-1-(2-hydroxypropylamino) alditols. **Carbohydr. Res.**, v. 269, p. 333-341, 1995.

CASSANO, V.; DÍAZ-LARREA, J.; SENTÍES, A.; OLIVEIRA, M. C.; GIL-RODRÍGUEZ, M. C.; FUJII, M. T. Evidence for the conspecificity of *Palisada papillosa* with *P. perforata* (Ceramiales, Rhodophyta) from the western and eastern Atlantic Ocean on the basis of morphological and molecular analyses. **Phycologia**, v. 48, p. 86-100, 2009.

CASSOLATO, J. E. F.; NOSEDA, M. D.; PUJOL, C. A.; PELLIZARI, F. M.; DAMONTE, E. B.; DUARTE, M. E. R. **Carbohydr. Res.**, v. 343, p. 3085-3095, 2008.

CAUDURO J.P. Estudo estrutural de galactanas sulfatadas e piruvatadas isoladas de *Acanthophora spicifera* (Rhodophyta, Ceramiales). **Dissertação de Mestrado**. Departamento de Bioquímica da UFPR, p. 91, 2000.

CHATTOPADHYAY, K.; GHOSH, T.; PUJOL, C. A.; CARLUCCI, M. J.; DAMONTE, E. B.; RAY, B. Polysaccharides from *Gracilaria corticata*: Sulfation, chemical characterization and anti-HSV activities. **Int J Biol Macromol.**, v. 43, p. 346-51, 2008.

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

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.**, v. 299, p. 229-243, 1997.

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

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.**, v. 20, p. 95-98, 1993.

CIANCIA, M.; MATULEWICZ, M. C.; CEREZO, A. S. Alkali modification of carrageenans. Part III. Use of mild alkaline media and high ionic strengths. **Carbohydr. Polym.**, v. 32, p. 293-295, 1997.

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

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

COSTA, L. S.; FIDELIS, G. P.; CORDEIRO, S. L.; OLIVEIRA, R. M.; SABRY, D. A.; CAMARA, R. B. G. Biological activities of sulfated polysaccharides from tropical seaweeds. **Biomedic. Pharmacother.**, v. 64, p. 21-28, 2010.

DAMONTE, E. B.; MATULEWICZ, M. C.; CEREZO, A. S.; COTO, C. E. Herpes simplex virus-inhibitory sulfated xylogalactans from the red seaweed *Nothogenia fastigiata*. **Chemotherapy**, v. 42, p. 57-64, 1996.

DAMONTE, E. B.; MATULEWICZ, M. C.; CEREZO, A. S. Sulfated seaweed polysaccharides as antiviral agents. **Curr. Medic. Chem.**, v. 11, p. 2399-2419, 2004.

DE CLERCQ, E. Strategies in the design of antiviral drugs. **Nature Review Drug Discovery** 1, p. 13-25, 2002.

DE CLERCK, E. Antiviral drugs in current clinical use. **J. Clin. Virol.**, v. 30, p. 115-133, 2004.

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

DUARTE, M.E.R.; NOSEDA, D.G.; NOSEDA, M.D.; TULIO, S.; PUJOL, C.A.; DAMONTE, E.B. Inhibitory effect of sulfated galactans from the marine alga *Bostrychia montagnei* on herpes simplex virus replication *in vitro*. **Phytomedicine**, v. 8(1), p. 53-58, 2001.

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

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

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

ERREA, M. I.; KOLENDER, A. A.; MATULEWICZ, M. C. Absolute configuration of 2,6-di-O-alkylgalactose obtained from peralkylated red algal polysaccharides. **Bot. Mar.**, v. 44, p. 133-138, 2001.

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

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

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

FERREIRA, D. de C.; MARTINS, F. O.; ROMANOS, M. T. V. Impacto do laser de baixa intensidade na supressão de infecções pelos vírus *Herpes simplex 1* e *2*: estudo *in vitro*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, p. 82-85, 2009.

FERREIRA, L. G. Análise estrutural de polissacarídeos potencialmente bioativos: fucanas sulfatadas de algas pardas (Phaeophyta). **Dissertação (Mestrado em Ciências, Bioquímica)** – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, 82 p., 2007.

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

FREILE-PELEGRIN, Y.; MURANO, E. Agars from three species of *Gracilaria* (Rhodophyta) from Yucatán Peninsula. **Biores. Technol.**, v. 96, p. 295-302, 2005.

FUKUDA, S.; SAITO, H.; NAKAJI, S.; YAMADA, M.; EBINE, N. TSUSHIMA, E. Pattern of dietary fiber intake among the Japanese general population. **Eur. J. Clin. Nutr.**, v. 61, p. 99-103, 2007.

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

GANESAN, M.; THIRUPPATHI, S.; ESWARAN, K.; REDDY, C. R. K.; JHA, B. Development of an improved method of cultivation to obtain high biomass of the red alga *Gelidiella acerosa* (Gelidiales, Rhodophyta) in the open sea. **Biomass and Bioenergy**, XXX, p. 1-8, 2011.

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

Ghosh, T.; Chattopadhyay, K.; Marschall, M.; Karmakar, P.; Mandal, P.; Ray, B. Focus on antivirally active sulfated polysaccharides: From structure-activity analysis to clinical evaluation. *Glycobiology*, 19, 2-15, 2009.

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

GONÇALVES, A. G. Modificações químicas em oligossacarídeos derivados de polissacarídeos de algas marinhas. **Tese (Doutorado em Ciências, Bioquímica)** – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, 162 p., 2005.

GONÇALVES, A. G.; DUCATTI, D.R.B.; DUARTE, M.E.R.; NOSEDA, M.D., Sulfated and pyruvylated disaccharide alditols obtained from a red seaweed galactan: ESIMS and NMR approaches. **Carbohydr. Res.**, v. 337, p. 2443-2453, 2002.

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

HARDEN, E. A.; FALSHAW, R.; CARNACHAN, S. M.; KERN, E. R.; PRICHARD, M. N. Virucidal activity of polysaccharide extracts from four algal species against herpes simplex virus. **Antiviral Res.**, v. 83, p. 282-289, 2009.

HAWORTH, W. N.; JACKSON, J.; SMITH, F. The properties of 3:6-anhydrogalactose. **J. Chem. Soc.**, p. 620-632, 1940.

HIRASE, S.; WATANABE, K.; TAKANO, R.; TAMURA, J. *Xlth Int. Carbohydr. Symp.*, Abstracts. Vancouver, Canada, p. III-12, **1982**.

HOEK, C. van den; MANN, D. G.; JAHNS, H. M. In: **Algae: An introduction to phycology**. Cambridge: Cambridge University Press, 1995. p.48-95.

http://www.chimie-analytique.wikibis.com/reaction_de_seliwanoff.php. Acesso em: 25/06/2011.

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

IZUMI, K. Structural analysis of agar-type polysaccharides by NMR spectroscopy. **Biochim. Biophys. Acta, Gen. Subj.** Amsterdam, v. 320, p. 311-317, 1973.

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

JOL, C. N.; NEISS, T. G.; PENNINKHOF, B. RUDOLPH, B.; De Ruiter, G. A. Novel high-performance anion exchange chromatograph method for the analysis of carrageenan and agars containing 3,6-anhydrogalactose. **Anal. Biochem.**, v. 268, p. 213-222, 1999.

KARSTEN, U.; KIRST, G. Incomplete turgor pressure regulation in the "terrestrial" red alga, *Bostrychia scorpioides* (Huds.) Mont. **Plant Science**, v. 61, p. 29-36, 1989.

KARSTEN, U.; WEST, J. A.; ZUCCARELLO, G. Polyol content of *Bostrychia* and *Strictosiphonia* (Rhodomelaceae, Rhodophyta) from field of culture. **Bot. Mar.**, v. 35, p. 11-19, 1992.

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

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

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

KUMAR, V.; FOTEDAR, R. Agar extraction process for *Gracilaria cliftonii* (Withell, Millar, Kraft, 1994). **Carbohydr. Polym.**, v. 78, p. 813-819, 2009.

LAHAYE, M.; YAPHE, W. The chemical structure of agar from *Gracilaria compressa* (C. Agardh) Greville, *G. cervicornis* (Turner) J. Agardh, *G. damaecornis* J. Agardh and *G.*

domingensis Sonder ex Kützing (Gigartinales, Rhodophyta). **Bot. Mar.**, Berlin, v. 32, p. 369-377, 1989.

LAHAYE, M.; YAPHE, W.; ROCHAS, C. ^{13}C -N.m.r.-spectral analysis of sulfated and desulfated polysaccharides of the agar type. **Carbohydr. Res.**, v. 143, p. 240-245, 1985.

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

LAHAYE, M. Developments on gelling algal galactans, their structure and physicochemistry. **J. Appl. Phycol.**, v. 13, p. 173-184, 2001.

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

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

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

MARKOULATOS, P., GEORGOPOULOU, A., SIAFAKAS, N., PLAKOKEFALOS, E., TZANAKAKI, G., KOUREA-KREMASTINO, J. Laboratory diagnosis of common herpes virus infections of the central nervous system by a multiplex PCR assay. **J. Clin. Microbiol.**, v.39, p. 4426–4432, 2001.

McCANDLESS, E. L. Polysaccharides of seaweeds. In: **The biology of seaweeds**. Lobban, C. S. Wynne, M. J., Eds; Blackwell: Oxford, 1981; pp. 559-588.

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

McHUGH, D. J. A guide to seaweed industry. In: FAO (Eds.), **FAO fisheries technical paper**, p. 1-118, 2003.

MILLER, I. J. The structure of a pyruvylated carrageenan extracted from *Stenogramme interrupta* as determined by ^{13}C NMR Spectroscopy. **Bot. Mar.**, v. 41, p. 305-316, 1998.

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

MILLER, I. J.; FALSHAW, R.; FURNEAUX, R. H. The chemical structure of the polysaccharide from *Dasyclonium incisum*. **Hydrobiologia**, v. 260/261, p. 647-651, 1993a.

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

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

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

MURANO, E. Chemical structure and quality of agars from *Gracilaria*. **J. Appl. Phycol.**, v. 7, p. 245-254, 1995.

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

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

NAM, K. W.; CHOI, H. G. Morphology of *Laurencia clavata* and *L. elata* (Ceramiales, Rhodophyta) in relation to generic circumscription in the *Laurencia* complex. **Eur. J. Phycol.**, v. 36, p. 285-294, 2001.

NAM, K. W. Phylogenetic re-evaluation of the *Laurencia* complex (Rhodophyta) with a description of *L. Succulenta* sp. nov from Korea. **J. Appl. Phycol.**, v. 18, p. 679-697, 2006.

NAM, K. W. Validation of the generic name *Palisada* (Rhodomelaceae, Rhodophyta). **Algae**, v. 22, p. 53-55, 2007.

NAVARRO, D. A.; RICCI, A. M.; RODRÍGUEZ, M. C.; STORTZ, C. A. Xylogalactans from *Lithothamnion heterocladum*, a crustose member of the Corallinales (Rhodophyta). **Carbohydr. Polym.**, v. 84, p. 944-951, 2011.

NAVARRO, D. A.; STORTZ, C. A. Isolation of xylogalactans from the Corallinales: influence of the extraction method on yields and compositions. **Carbohydr. Polym.**, v. 49, p. 57-62, 2002.

NAVARRO, D. A.; STORTZ, C. A. Determination of the configuration of 3,6-anhydrogalactose and cyclizable α -galactose 6-sulfate units em red seaweed galactans. **Carbohydr. Res.**, v. 338, p. 2111-2118, 2003.

NAVARRO, D. A.; STORTZ, C. A. The system of xylogalactans from the red seaweed *Jania rubens* (Corallinales, Rhodophyta). **Carbohydr. Res.**, v. 343, p. 2613-2622, 2008.

NEEDS, P. W.; SELVENDRAN, R. R.; A critical assessment of a one-tube procedure for the linkage analysis of polysaccharides as partially methylated alditol acetates. **Carbohydr. Res.**, v. 254, p. 229-244, 1994.

NISHIMURA, T.; TOKU, K.; FUKUYASU, H. Antiviral compounds. XII. Antiviral activity of aminohydrazones of alkoxyphenil substituted carbonyl compounds against influenza virus in eggs and mice, **Kitasato Arch. Exp. Med.**, v. 50, p. 39-46, 1977.

NISIZAWA, K.; NODA, H.; KIKUCHI, R., WATANABE, T. The main seaweed foods in Japan. **Hydrobiologia**, v. 151, p. 5-29, 1987.

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.**, v. 26, p. 1-3, 1995.

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

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

O'NEIL, A. N. 3,6-Anhydro-D-galactose as a constituent of κ -carrageenin. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 77, p. 2837-2839, 1955.

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

PEREIRA-PACHECO, F.; ROBLEDO, D.; RODRÍGUEZ-CARJAVAL, L.; FREILE-PELEGRÍN, Y. *Optimization of native agar extraction from *Hydropuntia cornea* from Yucatán, México.* **Biores. Technol.**, v. 98, p. 1278-1284, 2007.

PERCIVAL, E. The polysaccharides of green, red and brown seaweeds: Their basic structure, biosynthesis and function. **Br. Phycol. J.**, v. 14, p. 103-117, 1979.

PRADO, H.J.; CIANCIA, M.; MATULEWICZ, M.C. Agarans from the red seaweed *Polysiphonia nigrescens* (Rhodomelaceae, Ceramiales). **Carbohydr. Res.**, v. 343, p. 711-718, 2008.

PREOBRAZHENSKAYA M. E.; BERMAN A. E.; MIKHAILOV V. I.; USHAKOVA N. A.; MAZUROV A. V.; SEMENOV A. V.; USOV A. I.; NIFANT'EV N. E.; BOVIN N. V. Fucoidan inhibits leukocyte recruitment in a model peritoneal inflammation in rat and blocks interaction of P-selectin with its carbohydrate ligand. **Biochem. Mol. Biol. Int.**, v. 43, n. 2, p. 443-451, 1997.

- RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHORN, S.E. In: **Biologia vegetal**, 5^a edição. Rio de Janeiro: Guanabara/Koogan, 2007. p. 313-344.
- REED, L. J.; MUENCH, H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. **Am. J. Hyg.**, v. 27, p. 493-497, 1938.
- REES, D. A. Enzymic desulfation of porphyran. **Biochem. J.**, v. 80, p. 449-453, 1961a.
- REES, D. A. Enzymic synthesis of 3:6-anhydro-L-galactose within porphyran from L-galactose 6-sulfate units. **Biochem. J.**, v. 81, p. 347-352, 1961b.
- ROCHA, H.A.D.; BEZERRA, L. C. M.; ALBUQUERQUE, I. R.; COSTA, L. S.; GUERRA, C. M.; ABREU, L. D.; NADER, H. B.; LEITE, E. A. Xylogalactofucan from the Brown seaweed *Spatoglossum schroederi* stimulates the synthesis of an antitrombotic heparan sulfate from endothelial cells. **Planta Med.**, v. 71, p. 379-381, 2005.
- RODRÍGUEZ, M. C.; MATULEWICZ, M. C.; NOSEDA, M. D.; DUCATTI, D. R. B.; LEONARDI, P. I. Agar from *Gracilaria gracilis* (Gracilariales, Rhodophyta) of the Patagonic coast of Argentina – Content, structure and physical properties. **Biores. Technol.**, v. 100, p. 1435-1441, 2009.
- SATORU, K.; TANIGAWA, N.; NAKAGAWA, H.; SOEDA, S.; SHIMENO, H. Oversulfation of fucoidan enhances its anti-angiogenic and antitumor activities. **Biochem. Pharm.**, v. 65, p. 173-179, 2003.
- SEN, S. A. K.; DAS, A. K.; SARKAR, K. K.; SIDDHANTA A. K.; TAKANO, R.; KAMA, K.; HANA, R. An agaroid-carrageenan hybrid type backbone structure for the antithrombotic sulfated polysaccharide from *Grateloupia indica* Boergensen (Halymeniales, Rhodophyta). **Bot. Mar.**, v. 45, p. 331-338, 2002.
- SHAEFFER, D. J.; KRYLOV, V. S. Anti-HIV activity of extracts and cyanobacteria. **Exotoxicol. Environ. Safety**, v. 45, n. 2, p. 208-227, 2000. Review.
- SHASHKOV, A. S.; LIPKIND, G. M.; KNIREL, Y. A.; KOCHETKOV, N. K. Stereochemical factors determining the effects of glycosylation on the ¹³C chemical shifts in carbohydrates. **Magn. Reson. Chem.**, v. 26, p. 735-747, 1988.
- SHIEH, M. T.; WUDUNN, D.; MONTGOMERY, R. I.; ESKO, J. D.; SPEAR, P. G. Cell surface receptors for *Herpes simplex* virus are heparan sulfate proteoglycans. **J. Cell Biol.**, v. 116, p. 1273-1281, 1992.
- SLONEKER, J.H. Gas-liquid chromatography of alditol acetates. **Methods Carbohydr. Chem.**, San Diego, v. 6, p. 20-24, 1972.
- SOLOMONS, G.; FRHYLE, C. **Química Orgânica**. 7ed., v. 1 e 2. LTC Ed. S.A., Rio de Janeiro, 2002.

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

STORTZ, C.A.; CEREZO, A.S. Novel findings in carrageenans, agaroids and "hybrid" red seaweed galactans. **Current Topics in Phytochemistry**, v. 4, p. 121-134, 2000.

TAKANO, R.; HAYASHI, J; HAYASHI, K.; HARA, S.; HIRASE, S. Structure of a water-soluble polysaccharide sulfate from the red seaweed *Joculator maximus* Manza. **Bot. Mar.**, v. 39, p. 96-102, 1996.

TAKANO, R.; SHIOMOTO, K.; KAMEI, K.; HARA, S.; HIRASE, S. 2003. 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.**, v. 46, p. 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 larix* (Turner) C. Ag. **Bot. Mar.**, Berlin, v. 42, p. 183-188, 1999.

TALARICO, L. B.; DAMONTE, E. B. Interference in dengue adsorption and uncoating by carrageenans. **Virology**, v. 363, p. 473-485, 2007.

TALARICO, L. B.; NOSEDA, M. D.; DUCATTI, D. R. B.; DUARTE, M. E. R.; DAMONTE, E. B. Differential inhibition of dengue virus infection in mammalian and mosquito cells by iota-carrageenan. **J. Gen. Virol.**, v. 92, p. 1332-1342, 2011.

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

TALARICO, L. B.; ZIBETTI, R. G. M.; FARIA, P. C. S.; SCOLARO, L. A.; DUARTE, M. E. R.; NOSEDA, M. D.; PUJOL, C. A.; DAMONTE, E. B. Anti-herpes simplex virus activity of sulfated galactanas from the red seaweeds *Gymnogongrus griffithsiae* and *Cryptonemia crenulata*. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 34, p.2 63-71, 2004.

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

URBINATI, C.; CHIODELLI, P.; RUSNATI, M. Polyanionic drugs and viral oncogenesis: a novel approach to control infection, tumor-associated inflammation and angiogenesis. **Molecules**, v. 13, p. 2758-2785, 2008.

USOV, A. I. Structural analysis of red seaweed galactans of agar and carrageenan groups. **Food Hydrocol.**, v. 12, p. 301-308, 1998.

USOV, A. I.; YAROTSKY, S. V.; SHASHKOV, A. S. ¹³C-nmr spectroscopy of red algal galactans. **Biopolym.**, v. 19, p. 977-990, 1980.

USOV, A. I.; BILAN, M. I. Polysaccharides from algae 52. The structure of of sulfated xylogalactan from the calcareous red alga *Bossiella cretacea* (P. et R.) Johansen (Rhodophyta, Corallinaceae). **Bioorg. Khim.**, v. 24, p. 139-146, 1998.

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

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.**, Berlin, v. 30, p. 365-370, 1987.

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

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

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

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

USOV, A. I. NMR Spectroscopy of red seaweed polysaccharides: agars, carrageenans and xylans. **Bot. Mar.**, v. 27, p. 189-202, 1984.

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

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

VILLANUEVA, R.; MONTAÑO, N. Highly methylated agar from *Gracilaria edulis* (Gracilariasles, Rhodophyta). **J. Appl. Phycol.**, v. 11, p. 225-227, 1999.

VILLANUEVA, R. D.; ROMERO, J. B.; RAGASA, A. L. R.; MONTAÑO, M. N. E. Agar from the red seaweed, *Laurencia flexilis* (Ceramilales, Rhodophyta) from northern Philippines. **Phycol. Res.**, v. 58, p. 151-156, 2010.

VINOGRADOV, E.; KUBLER-KIELB, J.; KORENEVSKY, A. The structure of the carbohydrate backbone of the LPS from *Shewanella* spp. MR-4. **Carbohydr. Res.**, v. 343, p. 2701-2705, 2008.

WALKER, W. E., WAISBREN, B. A., MARTINS, R. R., BATAYIAS, G. E. A method for determining sensitivities of antiviral drugs in vitro for possible use as clinical consultation. **Am. J. Clin. Pathol.**, v. 56, p. 687-692, 1971.

WIGG, M. D.; MIRANDA, M. M. F. S. Víroses Dermotrópicas. In: SANTOS, N. S. O.; ROMANOS, M. T. V.; WIGG, M. D. **Introdução à Virologia Humana**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 177-211, 2008.

WIJESSEKARA, I.; PANGESTUTI, R.; KIM, S.-K. Biological activities and potential health benefits of sulfated polysaccharides derived from marine algae. **Carbohydr. Polym.**, v. 84, p. 14-21, 2011.

WITVROUW, M.; DE CLERQ, E. Sulfated polysaccharides extracted from sea algae as potential antiviral drugs. **Gen. Pharmacol.**, v. 29, p. 497-511, 1997.

WONG, K. F.; CRAIGIE, J. S. Sulfohydrolase activity and carrageenan biosynthesis in *Chondrus crispus* (Rhodophyceae). **Plant Physiol.**, v. 61, p. 663-666, 1978.

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

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

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

YORK, W. S.; VAN HALBEEK, H.; DARVILL, A. G.; ALBERSHEIM, P. Structural analysis of xyloglucan oligosaccharides by ¹H-n.m.r spectroscopy and fast-atom-bombardment mass spectrometry. **Carbohydr. Res.**, v. 200, p. 9-31, 1990.

YOUNGS, H.L.; GRETZ, M.R.; WEST, J.A.; SOMMERFELD, M.R. The cell wall chemistry of *Bangia atropurpurea* (Bangiales, Rhodophyta) and *Bostrychia moritziana* (Ceramiales, Rhodophyta) from marine and freshwater environments. **Phycol. Res.**, v. 46, p. 63-73, 1998.

ZHANG, Q.; YU, P.; LI, Z.; ZHANG, H.; XU, Z.; LI, P. Antioxidant activities of sulfated polysaccharide fractions from *Porphyra haitanensis*. **J. Appl. Phycol.**, v. 15, p. 305-310, 2003.

ZIBETTI, R. G. M.; DUARTE, M. E. R.; COLODI, F. G.; DUCATI, R. B. D., FERREIRA, L. G.; CARDOSO, M. A.; CEREZO, A. S. Galactans from *Cryptonemia* species. Part II:

Studies on the system of galactans of *Cryptonemia seminervis* (Halymeniales) and on the structure of major fractions. **Carbohydr. Res.**, v. 344, p. 2364-2374, 2009.

ZIBETTI, R.G.M., NOSEDA, M.D.; CEREZO, A.S.; DUARTE, M.E.R. The system of galactans from *Cryptonemia crenulata* (Halymeniaceae, Halymeniales) and the structure of two major fractions. Kinetic studies on the alkaline cyclization of the unusual diad G2S→D(L)6S. **Carbohydr. Res.**, v. 340, p. 711-722, 2005.

ZHOU, G.; SUN, Y.; XIN, H.; ZHANG, Y.; XU, Z. *In vivo* antitumoral and immunomodulation activities of different molecular weight lambda-carrageenans from *Chondrus ocellatus*. **Pharmacological Res.**, v. 50, p. 47-53, 2005.

ANEXO

ANEXO 1 - PERCENTAGEM DE ÁCIDO PIRÚVICO NA AGARANA FCS-3

1) COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA AGARANA FCS-3 (TABELA - 7)

Carboidratos: 55,3%

Ácido pirúvico: 5,2%

Sulfato: 22,7%

2) MASSAS MOLECULARES:

Massa molar do ácido pirúvico: 88,06g

Massa molar da galactose: ~180,0g

Massa molar da galactose no polissacarídeo: ~162,0g

CÁLCULO DA PERCENTAGEM DE ÁCIDO PIRÚVICO NA AGARANA FCS-3:

88,06g ----- 5,2%

x ----- 55,3%

x = 936,5g de polissacarídeo.

162g ----- 1 unidade de galactose no polissacarídeo

936,5g ----- y

y = 5,8, ou seja ~ 6 unidades de galactose.

Conclusão: A agarana FCS-3 apresenta 1 acetal de ácido pirúvico para cada 6 unidades de galactose.