

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

DIEGO BRITO FIGUEIREDO

DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO POR ELETROFORESE CAPILAR PARA
QUANTIFICAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE OLIGOSSACARÍDEOS SULFATADOS

CURITIBA
2013

DIEGO BRITO FIGUEIREDO

DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO POR ELETROFORESE CAPILAR PARA QUANTIFICAÇÃO
E IDENTIFICAÇÃO DE OLIGOSSACARÍDEOS SULFATADOS

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre, ao programa de Pós-Graduação em Ciências-Bioquímica, do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná

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

Coorientadores: Prof. Dr. Alan Guilherme Gonçalves e Prof. Dr. Miguel Daniel Nosedá

CURITIBA
2013

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas

Figueiredo, Diego Brito

Desenvolvimento de um método por eletroforese capilar para
quantificação e identificação de oligossacarídeos sulfatados. / Diego Brito
de Figueiredo. – Curitiba, 2013.

79 f.: il. ; 30cm.

Orientadora: Maria Eugênia Duarte Nosedá

Co-orientador: Alan Guilherme Gonçalves

Co-orientador: Miguel Daniel Nosedá

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de
Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica.

1. Eletroforese 2. Oligossacarídeos I. Título II. Nosedá, Maria
Eugênia Duarte III. Gonçalves, Alan Guilherme IV. Nosedá, Miguel Daniel
V. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas.
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica.

CDD (20. ed.) 574.1924815

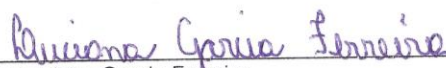
TERMO DE APROVAÇÃO
DIEGO BRITO FIGUEIREDO

**DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO POR ELETROFORESE CAPILAR
PARA QUANTIFICAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE OLIGOSSACARÍDEOS
SULFATADOS**

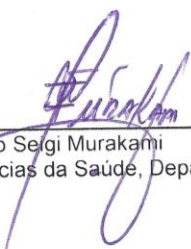
Dissertação aprovada como requisito final para a obtenção do grau de Mestre, no Curso de Pós-Graduação em Ciências-Bioquímica, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:



Prof.ª Dr.ª Maria Eugênia Duarte Nosedá (Orientadora)
Setor de Ciências Biológicas, Departamento de Bioquímica, UFPR



Dr.ª Luciana Garcia Ferreira
Setor de Ciências Biológicas, Departamento de Bioquímica, UFPR



Prof. Dr. Fábio Sergi Murakami
Setor de Ciências da Saúde, Departamento de Farmácia, UFPR

Curitiba, 22 de fevereiro de 2013.

Para Natália Coli de Brito

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar minha gratidão às pessoas que contribuíram para esta empreitada:

À minha orientadora, prof^a. Maria Eugênia, que desempenhou com extrema sabedoria e competência a arte de orientar.

Aos meus coorientadores, prof. Miguel e prof. Alan, pela amizade, pela confiança e pelas relevantes considerações ao longo de toda minha jornada na bioquímica.

Ao professor e amigo Diogo Ducatti, sempre presente, que desde meu início na bioquímica me surpreende com sua paciência, disponibilidade e contribuições valiosas.

À minha família, especialmente a meu pai, minha mãe, meu irmão, minha irmã e minha sobrinha.

À minha namorada, Bruna, pelo apoio, compreensão e por estar sempre ao meu lado.

Ao meu amigo Cauê Dias.

A todos os amigos da turma de mestrado 2011 – 2013.

A todos dos laboratórios de química dos carboidratos, em especial aos amigos do laboratório E3 - Sili, Cassiano, Mari, Pauline e Lu - pela convivência saudável e harmoniosa. Muito obrigado!

Ao meu amigo Robson, pelas conversas sempre descontraídas.

À minha amiga Monique, pela companhia e presença sempre agradável.

Aos amigos Marcelo K e Thiago M, por compartilharem comigo uma árdua tarefa diária.

À minha amiga Fernanda.

Aos amigos Vitinho, Dani (Ringo) e Minas.

À banca examinadora, Fábio e Luciana, pelas contribuições.

Ao prof. Lauro, pelas análises de *electrospray*.

Frank Zappa, Dave Matthews e Milton Nascimento.

Ao auxílio financeiro CAPES.

Ao programa de pós-graduação em Bioquímica da UFPR.

Muito obrigado!

RESUMO

Macroalgas vermelhas são fontes de polissacarídeos sulfatados que, devido às suas propriedades, despertam grande interesse na indústria alimentícia e farmacêutica. A partir destes polissacarídeos é possível, via processos de hidrólise, a obtenção de estruturas de menor massa molecular – os oligossacarídeos. Neste trabalho, foi utilizada a hidrólise ácida parcial para obter oligossacarídeos a partir da galactana sulfatada *kappa*-carragenana, extraída da alga vermelha *Kappaphycus alvarezii*. Os oligossacarídeos formados apresentam sua unidade terminal 3,6-anidrogactose na forma de aldeído hidratado. Para converter os oligossacarídeos para sua forma alditol, estes foram submetidos à redução do grupamento aldeído utilizando NaBH₄. Os oligossacarídeos alditóis foram submetidos à cromatografia de troca iônica utilizando DEAE – Sephacel. A eluição foi realizada com água destilada e em diferentes concentrações molares de carbonato de amônio – 0,05M; 0,075M; 0,100M; 0,125M. Em sequência, os oligossacarídeos isolados foram caracterizados por métodos espectroscópicos (RMN de ¹³C, ¹H, COSY, HSQC) e eletroforéticos (Eletroforese Capilar, detecção indireta). Os seguintes di, tetra e hexassacarídeos foram obtidos: carrabitol 4²-sulfato; carratetraitol 4², 4⁴-dissulfato; e carrahexaitol 4², 4⁴, 4⁶-trissulfato, respectivamente. Estes oligossacarídeos foram utilizados como padrões para desenvolvimento e validação de um método eletroforético (eletroforese capilar) para quantificar e avaliar a produção e o tipo de oligossacarídeo em função do tempo de hidrólise por duas metodologias: HRP (hidrólise redutiva parcial) e HAP (hidrólise ácida parcial). As condições eletroforéticas usadas foram: 20kV a 30°C em tampão constituído de borato a 10mM, pH 9, em capilar de sílica fundido de 50 cm de comprimento e 50 µm de diâmetro interno. A detecção foi realizada pelo método de detecção indireta usando ácido *p*-toluenosulfônico 10 mM como co-íon detectável a 214nm, em equipamento P/ACE Beckman 5010. O método de quantificação envolveu padronização externa e interna utilizando o poliol eritritol como padrão interno. Assim, a concentração oligossacarídica foi relacionada com as áreas dos picos presentes nos eletroferogramas, a fim de se determinar condições ideais para obtenção de oligossacarídeos com diferentes graus de polimerização. A obtenção de moléculas com estruturas químicas inéditas a partir de polissacarídeos sulfatados é interessante para estudos de bioatividade, sejam estes na forma nativa ou modificados quimicamente.

ABSTRACT

Red macroalgae are sources of sulfated polysaccharides that, due to its properties, arouse great interest in the food and pharmaceutical industries. From these polysaccharide chains, is possible, by hydrolysis processes, obtaining structures of lower molecular weight - the oligosaccharides. In this work, were used the partial acid hydrolysis to obtain oligosaccharides from sulfated galactan *kappa*-carrageenan extracted from red seaweed *Kappaphycus alvarezii*. The formed oligosaccharides have the 3,6-anhydrogalactose terminal unit as aldehyde hydrate. To convert the oligosaccharides to alditol form, they were submitted to reduction of aldehyde group using NaBH₄. The alditols oligosaccharides were submitted to ion exchange chromatography using DEAE - Sephacel. Elution was performed with distilled water and at different molar concentrations of ammonium carbonate - 0.05 M, 0.075 M, 0.100 M, 0.125 M. In sequence, the oligosaccharides were characterized by spectroscopic (NMR 13C, 1H, COSY, HSQC) and electrophoretic (Capillary Electrophoresis, indirect detection) methods. The following di, tetra and hexassacarídeos were obtained: carrabitol 4²-sulfate; carratetraitol 4², 4⁴-disulfate, and carrahexaitol 4², 4⁴, 4⁶-trissulfato, respectively. These oligosaccharides were used as standards for the development and validation of a electrophoresis method (capillary electrophoresis) to quantify and assess the production and the type of oligosaccharide as a function of hydrolysis time by two methodologies: HRP (partial reductive hydrolysis) and HAP (partial acid hydrolysis). The electrophoretic conditions used were: 20kV at 30 ° C in buffer consisting of 10mM borate, pH 9, fused silica capillary of 50 cm length and 50 mm in inner diameter. Detection was performed by indirect detection method, using p-toluenesulfonic acid 10 mM as detectable co-ion at 214 nm ion detectable in equipment P / ACE 5010 Beckman. The quantification method involves internal and external standardization using polyol erythritol as internal standard. Thus, the oligosaccharide concentration was correlated with the areas of the peaks present in the electropherograms in order to determine optimal conditions for obtaining oligosaccharides with different polymerization degrees. Obtaining molecules with novel chemical structures from sulfated polysaccharides is interesting for bioactivity studies, whether in native or chemically modified form.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	PRODUÇÃO DE OLIGOSSACARÍDEOS VIA HIDRÓLISE ÁCIDA PARCIAL DA KAPPA-CARRAGENANA.	34
FIGURA 2 -	A - ESPECTRO DE RMN - ¹ H DOS PRODUTOS DE HIDRÓLISE ÁCIDA PARCIAL (FRAÇÃO F-k), OBTIDOS A PARTIR DA KAPPA-CARRAGENANA DE <i>Kappaphycus alvarezii</i> . B – ESPECTRO DE RMN - ¹ H DA KAPPA-CARRAGENANA DE <i>Kappaphycus alvarezii</i>	36
FIGURA 3 -	A – ESPECTRO DE RMN - ¹ H DOS PRODUTOS DE HIDRÓLISE ÁCIDA PARCIAL DA FRAÇÃO F-k. B - ESPECTRO DE RMN - ¹ H DA FRAÇÃO F-Kr.	37
FIGURA 4 -	PERFIL DE ELUIÇÃO OBTIDO POR CROMATOGRAFIA DE TROCA ANIÔNICA (DEAE–SEPHACEL) DA FRAÇÃO F-Kr.	38
FIGURA 5 -	A – CCD DAS FRAÇÕES PRESENTES NOS TUBOS 20, 32 E 38 (ELUATO 0,05M); B – CCD DAS FRAÇÕES PRESENTES NOS TUBOS 60, 66 E 82 (ELUATO 0,075M) E 130 E 140 (ELUATO 0,125M).	39
FIGURA 6 -	ESPECTRO DE ¹ H-RMN DA FRAÇÃO F-k2 (CARRABIITOL 4 ² – SULFATO).....	42
FIGURA 7 -	ESPECTRO DE ¹ H-RMN DA FRAÇÃO F-k4 (CARRATETRAITOL 4 ² , 4 ⁴ – DISSULFATO)	43
FIGURA 8 -	ESPECTRO DE ¹ H-RMN DA FRAÇÃO F-k6 (CARRAHEXAITOL 4 ² , 4 ⁴ , 4 ⁶ – TRISSULFATO)	44
FIGURA 9 -	ESPECTROS DE RMN- ¹ H (REGIÃO DE 4,7 A 5,3 PPM) DAS FRAÇÕES F-k2, F-k4, F-k6	46
FIGURA 10 -	NOMENCLATURA DAS UNIDADES MONOSSACARÍDICAS DO OLIGOSSACARÍDEO HEXASSACARÍDEO CARRAHEXAITOL 4 ² , 4 ⁴ , 4 ⁶ - TRISSULFATO PRESENTE NA FRAÇÃO F-K6.....	41
FIGURA 11 -	A – ESPECTRO DE RMN DE ¹³ C DA FRAÇÃO F-k2. B - ESPECTRO DE RMN DE ¹³ C DA FRAÇÃO F-k4. C - ESPECTRO DE RMN DE ¹³ C DA FRAÇÃO F-k6.....	47
FIGURA 12 -	ESPECTROS DE RMN BIDIMENSIONAIS HSQC (A1) E COSY (A2) DA FRAÇÃO Fk-2.. ..	48
FIGURA 13 -	ESPECTROS DE RMN BIDIMENSIONAIS HSQC (B1) E COSY (B2) DA FRAÇÃO Fk-4.	49
FIGURA 14 -	ESPECTROS DE RMN BIDIMENSIONAIS HSQC (C1) E COSY (C2) DA FRAÇÃO Fk-6.	50
FIGURA 15 -	PERFIL DE ELUIÇÃO (SOBREPOSTOS) DAS FRAÇÕES F-k2, F-k4 E F-k6 EM FILTRAÇÃO EM GEL – BIOGEL P-2.	51
FIGURA 16 -	PERFIL DE ELUIÇÃO (SOBREPOSTO) EM BIOGEL-P2 DE SOLUÇÃO DE NaCl E BLUE DEXTRAN	52

FIGURA 17 - ANÁLISE DE ESIMS (MODO POSITIVO) DAS FRAÇÕES F-k2dNa (1), F-k4dNa (2) E F-k6dNa (3).....	53
FIGURA 18 - ANÁLISE DE ESIMS (MODO NEGATIVO) DAS FRAÇÕES FK2dNa (1), F-K4dNa (2) E F-K6dNa (3).	54
FIGURA 19 - ELETROFEROGRAMA CONTENDO KAPPA-OLIGOSSACARÍDEOS OBTIDOS VIA HAP DE KAPPA-CARRAGENANA (65°C POR 30 MINUTOS)..	57
FIGURA 20 - ELETROFEROGRAMA CONTENDO KAPPA-OLIGOSSACARÍDEOS OBTIDOS VIA HRP DE KAPPA-CARRAGENANA (65°C POR 15 MINUTOS)..	57
FIGURA 21 - ELETROFEROGRAMAS SOBREPOSTOS DE AMOSTRAS DE OLIGOSSACARÍDEOS DISSOLVIDOS EM ÁGUA (A) E EM MEIO DE HIDRÓLISE (HRP) (B).....	58
FIGURA 22 - LINEARIDADE DO MÉTODO	59
FIGURA 23 - ESQUEMA DE PREPARO DAS CURVAS DE HIDRÓLISE	68
FIGURA 24 - A - PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS DA CURVA DE HIDRÓLISE OBTIDA POR HAP E HRP E ANÁLISE EM EC. B - eletroferogramas sobrepostos da curva obtida por HAP.	69
FIGURA 25 - CURVA DE OLIGOSSACARÍDEOS PRODUZIDOS POR HRP	71
FIGURA 26 - CURVA DE OLIGOSSACARÍDEOS PRODUZIDOS POR HAP	72

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	CLASSIFICAÇÃO DAS CARRAGENANAS DE ACORDO COM PADRÃO DE SULFATAÇÃO DA UNIDADE A, ONDE UNIDADES A E B SÃO CONSIDERADAS ESTRUTURAS IDEIAS.....	17
TABELA 2 -	DILUIÇÕES UTILIZADAS NA CURVA-PADRÃO	27
TABELA 3 -	DILUIÇÕES UTILIZADAS NO ENSAIO DE RECUPERAÇÃO	30
TABELA 4 -	DESLOCAMENTOS QUÍMICOS (PPM) DE PRÓTON (¹ H) DETERMINADOS A 30°C DA KAPPA-CARRAGENANA DE <i>Kappaphycus alvarezii</i>	34
TABELA 5 -	ASSINALAMENTOS DE RMN DE ¹ H DOS OLIGOSSACARÍDEOS OBTIDOS A PARTIR DA KAPPA-CARRAGENANA DE <i>Kappaphycus alvarezii</i> POR HIDRÓLISE ÁCIDA PARCIAL	45
TABELA 6 -	DILUIÇÕES UTILIZADAS NA CURVA-PADRÃO	55
TABELA 7 -	ENSAIO DE REPETIBILIDADE.....	60
TABELA 8 -	ENSAIO DE PRECISÃO INTERMEDIÁRIA	61
TABELA 9 -	ENSAIO DE RECUPERAÇÃO – CÁLCULO DAS CONCENTRAÇÕES EXPERIMENTAIS.....	62
TABELA 10 -	ENSAIO DE RECUPERAÇÃO – CÁLCULO DAS RECUPERAÇÕES MÉDIAS	63
TABELA 11 -	RECUPERAÇÃO DO ANALITO EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO	64
TABELA 12 -	ENSAIO DE ROBUSTEZ ONDE A CONCENTRAÇÃO DO TAMPÃO FOI VARIADA EM ± 10%	65
TABELA 13 -	ENSAIO DE ROBUSTEZ ONDE A TEMPERATURA FOI VARIADA EM ± 10%.....	66
TABELA 14 -	PRODUÇÃO DE OLIGOSSACARÍDEOS POR HRP E HAP	70

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

4-MMB - 4-metilmorfolina borano

COSY - *correlation spectroscopy*

D₂O - óxido de deutério (água deuterada)

DEAE - Sephacel – *Diethylaminoethyl SephacelTM* (gel utilizado em cromatografia de troca iônica)

DEPT - *distortionless enhancement by polarization transfer*

EC - eletroforese capilar

ESIMS - *electrospray mass spectrometry*

FEO: fluxo eletroendosmótico

F-k - produto de hidrólise ácida parcial da *kappa*-carragenana

F-k2 – fração obtida na cromatografia aniônica, eluída com 0,05M de carbonato de amônio

F-k2d – fração obtida a partir de F-k2 por cromatografia de exclusão

F-k2dNa - fração obtida a partir de F-k2d por cromatografia de troca iônica

F-k4 - fração obtida na cromatografia aniônica, eluída com 0,075M de carbonato de amônio

F-k4d - fração obtida a partir de F-k4 por cromatografia de exclusão

F-k4dNa - fração obtida a partir de F-k4d por cromatografia de troca iônica

F-k6 - fração obtida na cromatografia aniônica, eluída com 0,125M de carbonato de amônio

F-k6d - fração obtida a partir de F-k6 por cromatografia de exclusão

F-k6dNa - fração obtida a partir de F-k6d por cromatografia de troca iônica

F-kr – fração obtida através da redução (com NaBH₄) da fração F-k.

HAP – hidrólise ácida parcial

HMBC - *heteronuclear multiple bond correlation spectroscopy*

HRP – hidrólise redutiva parcial

HSQC - *heteronuclear single quantum correlation spectroscopy*

MHz - mega-hertz

NaBH₄ - boroidreto de sódio

PI – padrão interno

RE899 - Resolução 899, de 29 de maio de 2003

Rf – *Ratio of front*, ou índice de retenção (distância percorrida pelo soluto/distância percorrida pelo solvente)

RMN - ressonância magnética nuclear

RMN ¹³C - ressonância magnética nuclear de carbono-13

RMN ¹H - ressonância magnética nuclear de hidrogênio

RSD – desvio padrão relativo (DRP)

Stddev – desvio padrão

T test – teste t de *student*

TFA – ácido trifluoroacético

TSA – ácido *p*-toluenosulfônico

TLC – *Thin layer chromatography*, ou cromatografia em camada delgada (CCD)

UV – ultravioleta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1 GALACTANAS DE ALGAS MARINHAS	16
2.2 OBTENÇÃO DE OLIGOSSACARÍDEOS VIA PROCESSOS DE HIDRÓLISE ...	17
2.3 ELETROFORESE CAPILAR E SEPARAÇÃO DE OLIGOSSACARÍDEOS	19
2.4 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO	22
2.4.1 Critérios de validação	22
3 OBJETIVO GERAL	23
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
4 MATERIAL E MÉTODOS	24
4.1 ORIGEM E EXTRAÇÃO DAS GALACTANAS DE <i>kappaphycus alvarezii</i>	24
4.2 PRODUÇÃO DE OLIGOSSACARÍDEOS PADRÕES	24
4.2.1 Hidrólise ácida parcial e redução dos oligossacarídeos	24
4.2.2 Métodos cromatográficos aplicados para isolamento e identificação dos oligossacarídeos	25
4.2.2.1 Cromatografia em coluna aniônica	25
4.2.2.2 Cromatografia em camada delgada (TLC)	25
4.2.2.3 Cromatografia de exclusão	25
4.2.3 Conversão do contra íon amônio para sódio	26
4.2.4 Análise por espectrometria de massas do tipo electrospray	26
4.2.5 Ressonância magnética nuclear	26
4.2.6 Curva padrão de oligossacarídeos	27
4.3 ELETROFORESE CAPILAR	28
4.4 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO	28
4.4.1 Especificidade	28
4.4.2 Linearidade	29
4.4.3 Precisão	29
4.4.3.1 Repetibilidade	29
4.4.3.2 Precisão intermediária	29
4.4.4 Exatidão (recuperação)	30
4.4.5 Robustez	30

4.5 CURVA DE HIDRÓLISE COMPARATIVA	31
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
5.1 EXTRAÇÃO DA <i>KAPPA</i> -CARRAGENANA.....	33
5.2 PRODUÇÃO DE OLIGOSSACARÍDEOS PADRÕES	33
5.2.1 Hidrólise ácida parcial e redução dos oligossacarídeos	33
5.2.2 Métodos cromatográficos aplicados para isolamento dos oligossacarídeos ..	38
5.2.3 Análise de RMN das frações F-k2, F-k4 E F-k6.	40
5.2.4 cromatografia de exclusão e conversão para a forma Na ⁺ das frações F-k2, F-k4 e F-k6	49
5.2.5 Curva padrão de oligossacarídeos	55
5.3 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO E VALIDAÇÃO EM EC.....	55
5.3.1 Especificidade (ou seletividade)	56
5.3.2 Linearidade.....	58
5.3.3. Precisão	59
5.3.3.1 Repetibilidade.....	59
5.3.3.2 Precisão intermediária (inter-dia)	60
5.3.4 Ensaio de exatidão (recuperação).....	62
5.3.5 Ensaio de robustez.....	64
5.4 COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS POR HIDRÓLISE REDUTIVA PARCIAL (HRP) E HIDRÓLISE ÁCIDA PARCIAL (HAP) EM TERMOS DE PRODUÇÃO DE OLIGOSSACARÍDEOS OBTIDOS A PARTIR DA DA <i>KAPPA</i> -CARRAGENANA DE <i>Kappaphycus alvarezii</i>	67
6 CONCLUSÕES	73
REFERÊNCIAS.....	75

1 INTRODUÇÃO

Galactanas sulfatadas (agaranas e carragenanas) extraídas de algas vermelhas (*Rodophyta*) são biopolímeros que se apresentam na forma de polissacarídeos sulfatados de alta massa molecular. Estas galactanas são amplamente utilizadas pela indústria alimentícia, cosmética e farmacêutica em virtude de suas propriedades físico-químicas. As características estruturais destes compostos, como exemplo: caráter aniônico, padrão de substituição de grupamentos sulfato, tipo de ligação glicosídica e variações em sua massa molecular, favorecem a interação destes compostos com outras moléculas dotadas de cargas positivas, promovendo assim, importante potencial farmacológico a estes polissacarídeos sulfatados.

A produção de carragenanas é estimada em US\$ 240 milhões anuais (MCHUGH, 2003). A demanda mundial tem apresentado crescimento da ordem de 5 % ao ano; na década passada foram utilizadas quase oito milhões de toneladas de algas provenientes de cultivos ou estoques naturais, com preços que variam de US\$ 10 a US\$ 30 o quilo, dependendo das suas especificações e qualidade (BIXLER, 1996; PICKERING *et al.*, 2007). Na última década, *Kappaphycus alvarezii* foi responsável pelo fornecimento de 71 % de toda matéria prima utilizada para a extração de carragenana do tipo kappa (ARECES, 1995).

Partindo-se de galactanas sulfatadas e, usualmente, através de determinados processos hidrolíticos, é possível a obtenção de moléculas com menor massa molecular: os oligossacarídeos ainda sulfatados. Apesar de formarem uma família diversa, tendo em vista a variedade de monossacarídeos existentes e as diferentes formas pelas quais estes podem estar glicosidicamente ligados, as galactanas, com estrutura repetitiva e padrão de sulfatação homogêneo, quando degradadas, fornecem oligossacarídeos naturalmente sulfatados com o mesmo padrão de sulfatação do polissacarídeo de origem. A presença e a localização destes grupamentos sulfato estão diretamente ligadas à sua atividade biológica, sendo importante, por exemplo, no reconhecimento da molécula por receptores (HOOPER *et al.*, 1996).

Aos oligossacarídeos sulfatados e seus derivados, obtidos através de semi-síntese, sendo os oligossacarídeos são empregados como unidades moldes, atribuem-se atividades: antitumorais (YUAN *et al.*, 2005); antivirais (KATSURAYA

et al., 1998); anticoagulantes (WALL *et al.*, 2001) e antiangiogênicas (KASBAUER *et al.*, 2000).

Neste trabalho, foram aplicadas comparativamente duas metodologias para a obtenção de oligossacarídeos sulfatados - hidrólise redutiva parcial (HRP) e hidrólise ácida parcial (HAP). Estes se mostram eficientes métodos para a obtenção de oligossacarídeos sulfatados com diferentes graus de polimerização a partir de carragenanas sulfatadas obtidas da alga vermelha *Kappaphycus alvarezii*. A presença de unidades 3,6-anidrogactose (açúcar lábil em meio ácido) na estrutura de determinadas carragenanas tornam estas ligações glicosídicas mais susceptíveis aos processos de hidrólise por HAP ou HRP.

Considerando que o processo hidrolítico dos polissacarídeos (realizado por HRP ou HAP) depende da concentração de ácido e temperatura, e que o processo de hidrólise ocorre em função do tempo, sendo que as cadeias de polissacarídeos originam oligossacarídeos, o desenvolvimento de técnicas analíticas é uma importante ferramenta para o monitoramento do processo de hidrólise. Estas análises são úteis para maximizar o rendimento em relação à produção total de oligossacarídeos e também auxiliar na otimização das condições hidrolíticas para a produção de um oligossacarídeo de interesse. A técnica de análise utilizada neste trabalho - Eletroforese Capilar (EC) – permitiu a quantificação dos oligossacarídeos formados de forma rápida e simples, com relativo baixo custo. Adicionalmente, este método analítico foi validado, garantindo a confiabilidade dos resultados.

Destaca-se também que a obtenção de oligossacarídeos sulfatados utilizando um método simples e econômico é importante em termos tecnológicos, uma vez que o processo de obtenção dos oligossacarídeos pode ser revertido em patentes, além de fornecer moléculas com estruturas químicas inéditas com potencial bioatividade.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 GALACTANAS DE ALGAS MARINHAS

As carragenanas e agaranas são os principais polissacarídeos presentes no componente amorfo, que, juntamente com o componente fibrilar, formam a parede celular das algas vermelhas.

As galactanas apresentam uma estrutura linear formada por unidades repetitivas de β -D-galactopiranosose ligadas glicosidicamente através das ligações (1 \rightarrow 3) (unidade A) e α -galactopiranosose ligadas (1 \rightarrow 4) (unidade B, frequentemente na forma de 3,6-anidrogactose). Assim, as galactanas formam um arranjo alternado entre as unidades A e B, ou seja, (AB)_n. De acordo com a estereoquímica da unidade B, as galactanas podem ser classificadas como: agaranas, onde esta unidade pertence à série L, e carragenanas quando pertence à série D (PAINTER, 1983). Existem ainda galactanas cuja unidade B pode pertencer tanto a série D como L, sendo denominadas de galactanas híbridas (STORTZ e CERESO, 2000; ZIBETTI *et al.*, 2005; ZIBETTI *et al.*, 2009).

Carragenanas são classificadas de acordo com o padrão de sulfatação da unidade A. A família kappa (κ), apresentam a unidade A sulfatada no carbono quatro (C-4). Nas outras famílias de carragenanas, denominadas lambda (λ) e omega (ω), a sulfatação ocorre em C-2 e em C-6, respectivamente; enquanto na família beta (β) não ocorre a presença de sulfato na unidade A. Já a unidade B é usualmente encontrada na forma de 3,6-anidrogactose, com algumas variações dentro e entre as famílias (tabela 1).

TABELA 1 - CLASSIFICAÇÃO DAS CARRAGENANAS DE ACORDO COM PADRÃO DE SULFATAÇÃO DA UNIDADE A. UNIDADES A E B SÃO CONSIDERADAS ESTRUTURAS IDEAIS.

FAMÍLIA	3-O- β -D-Galp UNIDADE A	4-O- α -D-Galp UNIDADE B	CÓDIGO DE LETRAS ¹
KAPPA			
κ (<i>kappa</i>)	β -D-Galp-4-sulfato	α -D-3,6-anidrogalp	G4S-DA
ι (<i>iota</i>)	β -D-Galp-4-sulfato	α -D-3,6-anidrogalp-2-sulfato	G4S-DA2S
μ (<i>mu</i>)	β -D-Galp-4-sulfato	α -D-Galp-6-sulfato	G4S-D6S
ν (<i>nu</i>)	β -D-Galp-4-sulfato	α -D-Galp-2,6-dissulfato	G4S-D2S, 6S
LAMBDA			
λ (<i>lambda</i>)	β -D-Galp-2-sulfato	α -D-Galp-2,6-dissulfato	G2S-D2S, 6S
ξ (<i>xi</i>)	β -D-Galp-2-sulfato	α -D-Galp-2-sulfato	G2S-D2S
θ (<i>theta</i>)	β -D-Galp-2-sulfato	3,6-anidrogalp-2-sulfato	G2S-DA2S
BETA			
β (<i>beta</i>)	β -D-Galp	α -D-3,6-anidrogalp	G-DA
α (<i>alfa</i>)	β -D-Galp	α -D-3,6-anidrogalp-2-sulfato	G-DA2S
γ (<i>gamma</i>)	β -D-Galp	α -D-Galp-6-sulfato	G-D6S
δ (<i>delta</i>)	β -D-Galp	α -D-Galp-2,6-dissulfato	G-D2S, 6S
OMEGA			
ω (<i>omega</i>)	β -D-Galp-6-sulfato	α -D-3,6-anidrogalp	G6S-DA
ψ (<i>psi</i>)	β -D-Galp-6-sulfato	α -D-Galp-6-sulfato	G6S-D6S

¹Adaptado de Knutsen, *et al.*, (1994)

2.2 OBTENÇÃO DE OLIGOSSACARÍDEOS VIA PROCESSOS DE HIDRÓLISE

Por definição, oligossacarídeo é um composto constituído por um número reduzido de unidades monossacarídicas (STANEK, J.; CERNY, M.; PACAK, J.; 1965). Estes podem ser classificados de acordo com o número de unidades monossacarídicas presentes (dissacarídeos, trissacarídeos, tetrassacarídeos, etc.).

Aos oligossacarídeos sulfatados e a seus derivados, obtidos através de semi-síntese, sendo os oligossacarídeos empregados como unidades moldes, atribuem-se atividades: antitumorais (YUAN *et al.*, 2005); antivirais (KATSURAYA *et al.*, 1998); anticoagulantes (WALL *et al.*, 2001) e antiangiogênicas (KÄSBAUER *et al.*, 2001). A estereoquímica e regioquímica dos grupamentos sulfato, o grau de sulfatação, bem como a massa molecular são fatores determinantes para a atividade biológica destas moléculas (DUCATTI, 2009). Neste contexto, a produção de oligossacarídeos a partir de galactanas de algas vermelhas tem ganhado

destaque devido à variedade de atividades biológicas que estas moléculas apresentam.

Oligossacarídeos podem ser obtidos por processos de hidrólise *in vitro* ou *in vivo*, a partir de carboidratos de maior massa molecular, glicoproteínas ou glicolipídeos. Além da hidrólise, a obtenção de oligossacarídeos pode ser feita através de síntese química e/ou enzimática, no entanto estes processos são limitados. Isto ocorre porque a síntese química de oligossacarídeos envolve várias etapas, bem como proteção ou exposição de hidroxilas presentes nas unidades monossacarídicas (DUCATTI, 2005) e a disponibilidade comercial de enzimas.

Complexas misturas de oligossacarídeos podem ser originadas após uma hidrólise parcial. Deste modo, várias técnicas cromatográficas preparativas podem ser utilizadas para o fracionamento destes açúcares. Para mistura de oligossacarídeos neutros, a separação pode ser feita por filtração em gel utilizando Sephadex (dextrana) ou Bio-Gel P-2 (gel de poliacrilamida), por cromatografia de partição em celulose ou por cromatografia de adsorção em carvão-Celite (GONÇALVES, 2001)

A hidrólise ácida parcial (HAP), em condições relativamente brandas, promove a quebra seletiva da ligação 3,6-anidro- α -glicosídica e gera oligossacarídeos de número par, contendo, ao final da hidrólise, a unidade anidrogactosídica na forma de aldeído hidratado (YU *et al.*, 2002; DUCATTI *et al.*, 2011). Estas unidades formadas podem ser então posteriormente reduzidas, para a obtenção de oligossacarídeos na forma de alditóis. Já a hidrólise reductiva parcial (HRP) (USOV; ELASHVILI, 1991), que também promove a quebra da ligação 3,6-anidro- α -glicosídica, é realizada com um agente redutor estável em meio ácido – 4-metilmorfolina borano –, o qual é responsável pela redução dos terminais gerados durante o processo de hidrólise. Ao final de ambos os processos de hidrólise e redução são gerados oligossacarídeos com unidades de 3,6-anidrogactitol na sua extremidade, enquanto os grupos sulfato são substancialmente retidos (GONÇALVES, 2005).

Quando condições de hidrólise forem suficientemente drásticas, como, por exemplo, pelo: aumento na concentração ou tipo de ácido, aumento na temperatura ou tempo de hidrólise, haverá degradação de unidades terminais 3,6-anidrogactose (GONÇALVES, 2005; YU *et al.*, 2002). Sendo assim, condições brandas de hidrólise devem ser aplicadas para permitir a quebra seletiva das

ligações 3,6-anidro- α -glicosídicas, sem que ocorra a degradação desta unidade ou hidrólise das ligações glicosídicas envolvendo outros tipos de unidades monossacarídicas.

Os oligossacarídeos alditois produzidos por HRP têm o nome usual baseado em sua origem, número de unidades e acrescentando-se o sufixo itol. Já para os oligossacarídeos obtidos via HAP e não reduzidos (forma de aldeído hidratado), resultando em terminal redutor, utiliza-se o sufixo ose (USOV; ELASHVILI, 1991, 1997). Como exemplo, um dissacarídeo derivado de *kappa-carragenana*, obtido por HRP, tem o nome de carrabiitol 4² – sulfato. Já um dissacarídeo obtido via HAP tem nome carrabiose 4² – sulfato.

Um destaque importante no estudo de carboidratos e seus oligossacarídeos é a diversidade e complexidade estrutural, que estão relacionadas com as diversas funções exercidas por essas moléculas em sistemas biológicos. Diversas estruturas oligossacarídicas são encontradas ligadas a proteínas e lipídeos na superfície celular. Muitos estudos têm revelado que estas estruturas estão envolvidas no reconhecimento celular, tendo importante função para o sistema imune. Além disso, tem-se observado a importância dos carboidratos como receptores para toxinas, vírus e hormônios, o que torna estas moléculas alvos para o desenvolvimento de drogas (WITCZAK, 1997).

A avaliação de métodos de obtenção de oligossacarídeos, feito, por exemplo, através de curvas de hidrólises, comparando-se assim o processo de hidrólise, se justifica devido grande potencial bioativo destas moléculas. A avaliação do processo de hidrólise é, em geral, realizada através de técnicas de cromatografia (ex. CLAE – cromatografia líquida de alta eficiência) (DUCATTI, 2009) e eletroforéticas (ex. E.C. – eletroforese capilar) (GONÇALVES, 2005). O desenvolvimento analítico busca um método rápido, prático e capaz de quantificar oligossacarídeos com maior número de unidades monossacarídicas possível.

2.3 ELETROFORESE CAPILAR E SEPARAÇÃO DE OLIGOSSACARÍDEOS

Eletroforese capilar pode ser definida como o transporte, em solução eletrolítica, de compostos carregados eletricamente sob a influência de um campo elétrico, no qual a separação entre dois solutos ocorre com base em suas

diferenças de mobilidade eletroforéticas (HOFFSTETTER-KUHN, 1993). É uma técnica capaz de promover rápida separação com alta sensibilidade, a partir de volumes de amostras extremamente pequenos. A alta resistência elétrica do capilar permite a aplicação de campos elétricos de alta intensidade, pois gera um aquecimento mínimo. Além disso, o formato de capilar propicia uma dissipação eficiente do calor gerado. O uso de campos elétricos de alta intensidade resulta em tempo de análise curto, alta eficiência e resolução (ALTRIA, 1996; QUEIROZ; JARDIM, 2001).

Nesta técnica, um campo elétrico é aplicado ao capilar, o qual está preenchido com uma solução tampão e possui suas extremidades mergulhadas em recipientes, que contêm a solução tampão. Este campo elétrico gera uma corrente no interior do capilar. Os eletrodos são feitos de um material inerte, tal como platina, e são também mergulhados na solução para fechar o circuito. O capilar passa através de um detector, usualmente um detector espectrofotométrico de absorção no ultravioleta (UV) (ALTRIA, 1996; QUEIROZ; JARDIM, 2001). Uma pequena quantidade de amostra é introduzida em uma das extremidades do capilar. A aplicação do campo elétrico provoca o movimento dos analitos em direção aos eletrodos.

A presença de um fluxo eletricamente induzido, denominado fluxo eletrosmótico (FEO), faz com que os solutos se movimentem em direção ao detector. O FEO é um fenômeno eletroforético que gera o fluxo dentro do capilar, e esta é a base das separações em EC (GONGALVES, 2005). Este fluxo pode reduzir significativamente o tempo de análise ou forçar um íon a reverter a sua tendência de migração em direção a um eletrodo, pelo qual está sendo atraído, devido ao sinal de sua carga (ALTRIA, 1996; QUEIROZ; JARDIM, 2001). Quando em contato com soluções tampão com alto valor de pH, grupamentos silanóis (SiOH) - presentes na parede interna do capilar- se ionizam, ficando na forma SiO^- . A fim de manter a eletroneutralidade, esta superfície carregada negativamente é compensada com a presença de contraíons (cátions) que se dispõem próximos à parede do capilar, gerando assim uma dupla camada e uma diferença de potencial próxima à parede do capilar. Quando é aplicada uma diferença de potencial (ddp), estes íons metálicos, juntamente com moléculas associadas solvatadas com água, migram em direção ao cátodo (ALTRIA, 1996; QUEIROZ; JARDIM, 2001). Baseando-se neste princípio, espera-se que cátions

migram mais rapidamente, pois estão sendo atraídos pelo cátodo; moléculas neutras corram na mesma velocidade do FEO; e ânions migrem lentamente, pois estão sendo atraídos pelo ânodo, porém, devido ao FEO, serão arrastados até o cátodo (CARNEY; OSBOURNE, 1991; QUEIROZ; JARDIM, 2001).

Quando comparado o perfil parabólico (fluxo laminar) da CLAE, com o perfil do FEO, vemos que a EC apresenta um efeito benéfico em relação ao perfil do pico, especificamente em relação a seu alargamento. A CLAE apresenta fluxo induzido por pressão, ou seja, fluxo laminar. Neste tipo de fluxo, a solução move-se mais lentamente quando próxima da parede da coluna e mais rapidamente no centro, resultando em ligeiras diferenças nas velocidades de migração do soluto dentro da coluna. Já o FEO apresenta perfil tipo plano ou *plug*, garantindo mobilidades muito próximas entre moléculas do soluto (GONÇALVES, 2005; QUEIROZ; JARDIM, 2001).

Além do acompanhamento do processo de hidrólise parcial destas macromoléculas, o monitoramento através de métodos analíticos também é útil para a verificação da pureza dos oligossacarídeos obtidos (GONÇALVES, 2005). O caráter hidrofílico destas moléculas permite o emprego de técnicas de separação baseadas em métodos aquosos, como CLAE, eletroforese em gel de poliacrilamida e eletroforese capilar. Destas técnicas, a EC apresenta separação mais eficiente, tempos de análise mais curtos e com menor consumo de reagentes e solventes (EL RASSI, 1996).

Por não possuírem propriedades físicas como emissão de fluorescência ou absorção na região do ultravioleta, métodos de detecção indireta são utilizados para a análise de oligossacarídeos em EC. Assim, juntamente com o tampão utilizado na técnica, é adicionado um co-íon, que possui alta absorvidade molar na região do ultravioleta (UV). Este eletrólito irá gerar um sinal contínuo (absorção) sempre que o tampão estiver passando na janela do detector. O sinal será interrompido quando o oligossacarídeo, que não absorve no UV, passar pela janela de detecção, interrompendo a absorção promovida pelo co-íon. Este evento de interrupção do *background* gerado pelo co-íon detectável irá provocar a formação de picos negativos proporcionais à quantidade de analito não absorvente no eletroferograma resultante (EL RASSI, 1996). O poder de resolução da técnica – EC - está ligado à voltagem, à temperatura, ao comprimento do capilar utilizado na análise e, principalmente, à constituição do tampão.

2.4 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO

O desenvolvimento de um método analítico, a adaptação ou implementação de método conhecido envolvem o processo de avaliação que estime sua eficiência (BRITO *et al.*, 2003). Este processo é chamado de validação. A validação de metodologia analítica tem por finalidade garantir, através de ensaios e estudos, a confiabilidade do resultado obtido em determinado ensaio. Sendo assim, uma validação de métodos deve buscar, entre outros, especificidade, linearidade, intervalo, precisão, exatidão e robustez adequados à análise, conforme a finalidade do teste (BRASIL, 2003). De forma simplificada, pode-se dizer que determinado método é considerado validado se suas características estiverem de acordo com os pré-requisitos estabelecidos.

O uso de testes estatísticos adequados (t de *Student*, Fisher, Cochran, Grubbs, ANOVA, testes de hipóteses) torna as decisões menos subjetivas o que faz com que o processo de validação de métodos analíticos seja mais objetivo, fácil de demonstrar e implementar (BARROS; HIRATA, 2002).

2.4.1 Critérios de validação

Os parâmetros de validação de métodos analíticos envolvem especificidade/seletividade, intervalo de trabalho, linearidade, sensibilidade, exatidão, precisão (repetitividade, precisão intermediária e reprodutividade) e robustez (BRITO *et al.*, 2003). Estes critérios são baseados na: Resolução - RE nº 899, de 29 de maio de 2003 - GUIA PARA VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS E BIOANALÍTICOS (ANVISA), na USP (“UNITED STATES PHARMACOPEIA”) e na ICH - Conferência Internacional de Harmonização - Comunidade Européia, Japão e Estados Unidos – 2005.

3 OBJETIVO GERAL

Desenvolvimento e validação de um método eletroforético (eletroforese capilar) para quantificar a produção e o tipo de oligossacarídeo em função do tempo de hidrólise.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realização da hidrólise ácida parcial (HAP) da *kappa*-carragenana extraída da alga vermelha *Kappaphycus alvarezii*, para a obtenção de oligossacarídeos de referência.
- Isolamento e purificação dos oligossacarídeos de referência.
- Determinação da estrutura química dos oligossacarídeos de referência por análises de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) mono e bidimensionais.
- Otimização das condições eletroforéticas: determinação de condições ideais de análise, seleção de tampão, co-íon detectável, temperatura, tempo de injeção e padrão interno.
- Validação do método de análise em eletroforese capilar (EC)
- Avaliar comparativamente, via eletroforese capilar (EC), a produção de oligossacarídeos sulfatados em termos qualitativos e quantitativos, obtidos via hidrólise ácida parcial (HAP) e hidrólise redutiva parcial (HRP) da *kappa*-carragenana de *Kappaphycus alvarezii*.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ORIGEM E EXTRAÇÃO DAS GALACTANAS DE *Kappaphycus alvarezii*

Amostras de *Kappaphycus alvarezii* obtidas por meio de cultivo foram gentilmente cedidas pelo Núcleo de Pesquisa do Litoral Norte, em Ubatuba, São Paulo. Inicialmente, a alga foi lavada com água corrente e seca a temperatura de 60°C, até peso constante. Em seguida a alga foi tratada com KOH 6 % por 48 horas em temperatura ambiente, lavada com água corrente e seca a 60 °C até peso constante. A alga seca e moída (40 g) foi submetida à extração com tampão fosfato 0,025 M, pH 7,0 (2 g% p/v) sob agitação mecânica, a 65 °C, por 5 horas. O extrato obtido foi centrifugado (8000 rpm por 20 minutos) e ao sobrenadante obtido foi adicionado etanol (3 volumes). Após centrifugação, os polissacarídeos precipitados foram separados do sobrenadante etanólico e liofilizados, com rendimento de 59,9 %. Uma parte da fração polissacarídica liofilizada (10 g) foi solubilizada em água destilada (0,25 g% p/v) e tratada com cloreto de potássio (KCl) até a obtenção de concentração 0,1 M. Após a adição de KCl a solução foi mantida sob agitação mecânica por três horas e posteriormente em repouso por 16 horas à temperatura de 4 °C. A solução foi centrifugada (8000 rpm por vinte minutos). O polissacarídeo precipitado foi dialisado sequencialmente contra cloreto de sódio (NaCl) 1M e água destilada até remoção do sal e posterior liofilização, com rendimento de 72 %.

4.2 PRODUÇÃO DE OLIGOSSACARÍDEOS DE REFERÊNCIA

4.2.1 Hidrólise ácida parcial (HAP) e redução dos oligossacarídeos

Os polissacarídeos sulfatados foram hidrolisados de acordo com o método de hidrólise ácida parcial (YU *et al.*, 2002; DUCATTI *et al.*, 2011). Foram dissolvidos 750 mg de polissacarídeo em 67,5 mL de água destilada. Esta mistura foi aquecida a 60 °C até completa solubilização. Na sequência, foi adicionado TFA 1 M (7,5 mL), sendo a mistura em seguida incubada em banho termostatizado a 65 °C por 3 horas. Ao final do processo, o ácido presente no meio de reação foi

removido através de co-destilação em pressão reduzida com água destilada (3 vezes consecutivas) e tolueno (3 vezes consecutivas), sendo que esta fração foi denominada F-k (rendimento de 82,5%). Para converter os oligossacarídeos para sua forma alditol, estes foram submetidos à redução do grupamento aldeído. O material liofilizado (fração F-k, 619 mg) foi solubilizado em 11,25 mL de água destilada juntamente com 135 mg de borohidreto de sódio (NaBH_4), esta mistura foi mantida sob agitação e em banho de gelo por 6 horas. Após isso, procedeu-se à evaporação em pressão reduzida da mistura seguida de liofilização.

4.2.2 Métodos cromatográficos aplicados para isolamento e identificação dos oligossacarídeos

4.2.2.1 Cromatografia em coluna aniônica

A cromatografia foi realizada em coluna contendo DEAE- Sephacel em coluna com 250 mL de gel (4,8 x 14 cm), em fluxo de 1 mL/min. A eluição foi realizada com água destilada e em diferentes concentrações molares de carbonato de amônio – 0,05M; 0,075M; 0,100M; 0,125M. A presença de carboidratos foi detectada através da reação frente à solução de fenol 5% (0,5 ml) e ácido sulfúrico concentrado (2,5 ml), conforme descrito por Dubois e colaboradores (1956).

Três frações foram obtidas desta cromatografia, denominadas F-k2= 259 mg (41,8%), F-k4= 119 mg (19,21%) e F-k6= 40 mg (6,5%).

4.2.2.2 Cromatografia em camada delgada (CCD)

A cromatografia em camada delgada foi realizada em placas de sílica gel (2:2:1 BuOH-AcOH-H₂O) e reveladas com orcinol 0,5% (EtOH – H₂SO₄ 20:1).

4.2.2.3 Cromatografia de exclusão

Parte das frações F-k2 (26mg), F-k4 (23mg) e F-k6 (20mg) foram solubilizadas em 0,5 mL de água ultrapura e submetidas à cromatografia de exclusão, realizada em coluna Bio-Gel P-2 (1,8 x 38 cm, faixa de exclusão peso

molecular de 100 a 1800), com fluxo de 0,5 mL/ min. Os oligossacarídeos foram eluídos com água destilada e detectados pelo método do fenol ácido sulfúrico (DUBOIS *et al.*,1956). As frações obtidas foram denominadas F-k2d (22 mg), F-k4d (19 mg) e F-k6d (16 mg).

Teste de condutividade: 20 mg de NaCl em 0,5 mL de água. O material foi aplicado no gel e monitorado via condutividade do eluato. Em experimento paralelo, foi aplicado 1 mg de solução blue dextran 1 mg/mL, sendo a leitura realizada em espectrofotômetro com comprimento de onda de 620 nm.

4.2.3 Conversão do contraíon amônio para sódio

Os oligossacarídeos foram submetidos a tratamento com resina trocadora de íons catiônica (Dowex 50w x8) na forma íons sódio (Na⁺). A resina foi preparada com NaCl 2 % até pH neutro, em seguida lavada com água ultrapura até condutividade zero. As amostras F-k2d (22 mg), F-k4d (19 mg) e F-k6d (16 mg) foram dissolvidas em 0,5 mL de água ultrapura e, então, tratadas com 2 mL de resina, filtradas (membranas de 20 µm) e liofilizadas.

4.2.4 – Análise por espectrometria de massas do tipo *electrospray*

Soluções preparadas em água ultrapura (1 mg/mL) das frações F-k2dNa, F-k4dNa e F-k6dNa foram analisadas em espectrômetro de massas Quattro LC, triplo quadrupólo (Waters). Nitrogênio foi utilizado como gás de nebulização e dessolvatação e argônio como gás de colisão para realização de fragmentações por CID. A detecção foi feita em modo positivo e negativo de ionização em pressão atmosférica (API). As amostras foram aplicadas por injeção direta, utilizando uma bomba de infusão (KD-Scientific) a um fluxo de 10 µL/min. Aquisição e o processamento de dados foram realizados utilizando o software MassLynx 3.5, e as análises foram obtidas em modo de *scan* contínuo.

4.2.5 Ressonância magnética nuclear

As análises de ressonância magnética foram realizadas em equipamento da marca BRUKER, modelo DRX 400, série AVANCE, em tubo (*widebore probe*) de 5

mm de diâmetro externo, em água deuterada (D₂O) 99 %, a temperaturas de 50 ou 60 °C. Os espectros de RMN de ¹³C, desacoplados de ¹H, foram obtidos na frequência base de 100,61 MHz, com intervalo de aquisição de sinal 0,6 segundos. Foram feitas no mínimo 2000 aquisições e o intervalo entre os pulsos foi 0,1 segundo.

Os deslocamentos químicos expressos em ppm foram determinados utilizando-se padrão interno acetona (2,23 ppm e 30,2 ppm, ¹H e ¹³C, respectivamente). Foram realizados experimentos de ¹H, ¹³C, ¹H-¹H COSY, ¹H-¹³C HSQC.

4.2.6 - Curva padrão de oligossacarídeos

As amostras liofilizadas foram pesadas em balança analítica (F-k2dNa = 4,1 mg; F-k4dNa = 8,2 mg e F-k6dNa = 7,0 mg) e diluídas em água ultrapura, gerando soluções padrões de oligossacarídeos na concentração de 5 mg/mL. A partir destas três soluções, juntamente com uma solução de padrão interno eritritol 10mg/mL, as concentrações da curva-padrão (1,000; 0,500; 0,250; 0,125; 0,0625 mg/mL) foram elaboradas através de sucessivas pipetagens, partindo-se sempre das soluções padrões (tabela 2).

TABELA 2 - INTERVALO DE LINEARIDADE UTILIZADO NA CURVA-PADRÃO

Intervalo de Linearidade (mg/mL)	F-k2dNa (5mg/MI) µL	F-k4dNa (5mg/MI) µL	F-k6dNa (5mg/MI) µL	Eritritol (padrão interno) (10 mg/mL) µL	H ₂ O µL	vol. final µL
1,000	100	100	100	25	175	500
0,500	50	50	50	25	325	500
0,250	25	25	25	25	400	500
0,125	25	25	25	50	875	1000
0,0625	25	25	25	100	1825	2000

Em seguida as amostras foram analisadas em triplicata por EC e computadas as áreas de cada oligossacarídeo. Para os cálculos da equação da reta, foi utilizada a seguinte relação: $y=ax+b$, onde y é igual à razão entre a área do oligossacarídeo padrão e a área do padrão interno e x representa a concentração do oligossacarídeo. A equação de reta foi calculada a partir da média das triplicatas.

4.3 ELETROFORESE CAPILAR

Para as análises eletroforéticas foi utilizado equipamento P/ACE Beckman 5010 sob as seguintes condições: 20 kV a 30° C em tampão constituído de borato a 10 mM, pH 9, tempo de injeção 3 segundos (equivalente a 3,98 nl de amostra), em capilar de sílica fundido de 50 cm de comprimento e 50 µm de diâmetro interno. A detecção foi realizada pelo método de detecção indireta usando ácido *p*-toluenosulfônico 10 mM como co-íon detectável a 214 nm e o poliol eritritol como padrão interno, na concentração de 0,500 mg/mL. Antes de cada corrida, a seguinte sequência de lavagem foi aplicada: água ultrapura por 2 minutos; solução de NaOH 0,1 M por 2 minutos; solução tampão por 3 minutos.

4.4 - VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO

Os parâmetros de validação de método analítico envolveram ensaios de especificidade (ou seletividade), linearidade, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), exatidão (recuperação) e robustez.

4.4.1 Especificidade

Neste ensaio, foram preparadas três amostras. A primeira amostra (A) foi preparada a partir de oligossacarídeos padrões disponíveis em nosso laboratório (carrabitol 4²-sulfato, tetrassacarídeo carratetraitol 4², 4⁴-dissulfato e hexassacarídeo carrahexaitol 4², 4⁴, 4⁶-trissulfato) e padrão interno (eritritol), todos a 0,250 mg/mL dissolvidos em água. A segunda amostra (B) foi obtida através de Hidrólise Redutiva Parcial (HRP). A HRP foi preparada da seguinte maneira: 20 mg de *kappa*-carragenana, 1,5 mL de água destilada, 0,135 g complexo borano-4-metil-morfolina, 0,5 mL de TFA (ácido trifluoroacético) 2 M. Esta mistura foi submetida a banho termostaticado a 65 °C por 45 minutos. Em seguida, após adição de 1 mL de água destilada ao meio, foi realizado congelamento, liofilização e adição de padrão interno. Após liofilização, a amostra foi suspensa em 0,500 mL de água ultrapura, centrifugada (5 minutos a 10000 rpm), e filtrada em membrana de 0,22 µm. Da amostra filtrada, tomou-se 20 µL e adicionou-se 160 µL de água

ultrapura e procedeu-se à análise em EC. A terceira amostra (C) contém o meio reacional de hidrólise (HRP), preparado conforme descrito para o item B, porém sem a adição do polissacarídeo.

4.4.2 Linearidade

O ensaio de linearidade foi realizado conforme descrito no item Curva padrão de oligossacarídeos (4.2.6).

4.4.3 Precisão

O ensaio de precisão foi realizado em dois níveis: repetibilidade e precisão intermediária.

4.4.3.1 Repetibilidade

Para cobrir todo o intervalo da curva de linearidade do método, o ensaio de repetibilidade foi avaliado em três concentrações (0,0625; 0,500 e 1,000 mg/mL) de cada tipo de oligossacarídeo padrão. Estas três concentrações (amostras) foram as mesmas empregadas na curva padrão de oligossacarídeos (item 4.2.6), porém, submetidas a nova análise. As análises em EC foram conduzidas em triplicatas para cada uma das três concentrações, e realizadas todas no mesmo dia, sob as mesmas condições. Nos valores de áreas corrigidas (áreas relativas ao padrão interno), foi aplicado o DPR (ou desvio padrão relativo).

4.4.3.2 Precisão intermediária

A precisão intermediária foi avaliada através da comparação entre resultados obtidos entre análises da mesma amostra, realizadas em dias diferentes. Em cada dia de análise, soluções de rinsagem e tampão foram preparadas, e as amostras foram analisadas sob as mesmas condições. A mesma metodologia aplicada no teste de repetibilidade foi aplicada neste ensaio, porém em dois dias seguidos, sendo os resultados do segundo dia, aproveitados para o ensaio de repetibilidade. Neste ensaio, além de RSD, foi aplicado também o teste t

de student (*student t test*) entre os valores médios de área obtidos para cada oligossacarídeo nos diferentes dias, sob os seguintes argumentos: *paired, two-tailed distribution*.

4.4.4 Exatidão (recuperação)

Para realização do ensaio de recuperação, uma amostra “branco”, contendo apenas meio de hidrólise (0,75 mL de água + 0,0675 g do complexo Borano-4metil-morfolina + 250 µL de TFA 2 M), foi preparada. Após liofilização, esta amostra foi suspensa em 0,500 mL de água ultrapura. Em seguida, concentrações conhecidas de oligossacarídeos foram adicionadas ao meio de hidrólise, conforme tabela 3. Assim como no ensaio de repetibilidade, o ensaio de exatidão foi avaliado em três concentrações diferentes 0,0625; 0,500 e 1,000 mg/mL.

TABELA 3 - DILUIÇÕES UTILIZADAS NO ENSAIO DE RECUPERAÇÃO

Recuperação (mg/mL)	Sol. HRP (branco) µL	F-k2dNa (5mg/mL) µL	F-k4dNa (5mg/mL) µL	F-k6dNa (5mg/mL) µL	Eritritol (5 mg/mL) µL	H ₂ O µL	Vol. final µL
1,000	50	50	50	50	25	25	250
0,500	50	25	25	25	25	100	250
0,0625	400	25	25	25	200	1325	2000

As amostras foram então submetidas à centrifugação (5 minutos a 10.000 rpm) e filtração em membrana 0,22 µm e analisadas em EC.

As concentrações experimentais foram calculadas através da equação da reta (ver tópico 4.3.6). A partir do cálculo das concentrações experimentais, calculou-se as porcentagens de recuperação para cada oligossacarídeo em cada concentração, e também de forma geral (média das recuperações).

4.4.5 Robustez

Três concentrações diferentes dos oligossacarídeos (0,0625; 0,500; 1,000 mg/mL) foram submetidas à análise em EC onde foram introduzidas variações na concentração do tampão e temperatura de trabalho. Para o parâmetro analítico tampão, a quantidade pesada de tetraborato de sódio foi variada em 10% do valor

nominal, ou seja, 9 mM e 11 mM. Os valores de temperatura da análise também foram variados em 10%, sendo os testes realizados em 27 e 33° C. Cada concentração foi avaliada em triplicata.

Os resultados foram avaliados pelo teste t de *student*, sob os seguintes argumentos: *paired, two-tailed distribution*. Neste ensaio, também foi avaliado o efeito destas variações (tampão e temperatura) sobre o tempo de retenção dos oligossacarídeos. Para tanto, utilizou-se a área corrigida dividida pelo tempo de retenção relativo. Nestes resultados, aplicou-se o cálculo de DPR (desvio padrão relativo).

4.5 CURVA DE HIDRÓLISE COMPARATIVA

Quantidades iguais (10 mg) de polissacarídeo (*kappa*-carragenana) foram submetidas a dois tipos de hidrólise, HAP e HRP, por diferentes períodos. As hidrólises foram preparadas através do fracionamento de duas soluções-mãe, sendo uma (HRP) formada por 250 mg de *kappa*-carragenana, 18,75 mL de água destilada, 6,25 mL de TFA 2 M e 1,7 g de 4-MMB e a outra (HAP) por 250 mg de *kappa*-carragenana, 22,5 mL de água destilada e 2,5 mL de TFA 1 M.

As soluções-mãe foram então fracionadas em viais (1 mL por vial, equivalente a 10 mg do polissacarídeo), e estes submetidos a banho termostatizado a 65 °C. Os seguintes tempos de hidrólise foram aplicados: 15; 30; 60; 120; 180; 240; 480; 1080 minutos para curva HRP, e 1; 15; 30; 45; 60; 120; 240 e 360 minutos para curva HAP. O experimento foi realizado em triplicata, ou seja, para cada tempo de coleta, três viais independentes – a, b e c (obtidos da mesma solução mãe) estavam sendo hidrolisados. Cada vial obtido foi analisado em EC também em triplicata. Ao final de cada tempo, para ambos os tipos de hidrólise, a seguinte marcha foi aplicada: adição de 0,5 mL de água destilada ao meio reacional, adição de padrão interno (50 µL de solução 1,25 mg/50 µL), congelamento e liofilização.

Em seguida, o material liofilizado foi suspenso em 0,500 mL de água ultrapura. Neste ponto, as amostras obtidas por HAP foram submetidas à redução com NaBH₄ (1,8 mg/vial, banho de gelo, por 6 horas). Em seguida, as amostras provenientes de ambas as curvas foram centrifugadas (5 minutos a 10000 rpm) e

filtradas (membrana de 0,22 μm). As amostras filtradas foram então diluídas e aplicadas em EC.

Para quantificação via EC dos oligossacarídeos, diferentes diluições precisaram ser aplicadas para a adequação das amostras à linearidade do método. Inicialmente a seguinte diluição foi aplicada para todos os pontos e ambas as metodologias de hidrólise: tomou-se 50 μL da amostra filtrada e nestes adicionou-se 200 mL de água ultrapura. Através desta diluição inicial foi possível quantificar tetrassacarídeos e hexassacarídeos em todos os pontos da curva, bem como dissacarídeos produzidos até 60 minutos obtidos por ambos os tipos de hidrólise.

Após o tempo de 60 minutos, para a correta quantificação do dissacarídeo, além desta primeira diluição, diferentes diluições foram preparadas. Na curva HAP, os pontos 2, 4 e 6 horas, foram diluídos da seguinte maneira: 50 μL da amostra, 100 μL de solução eritritol 1 mg/mL, 100 μL de água ultrapura. Para as amostras obtidas na curva HRP, os pontos 2, 3, 4, 8 e 18 horas foram diluídos partindo-se de 75 μL de amostra, 112,5 μL de solução de padrão interno eritritol 1 mg/mL e 112,5 μL de água ultrapura.

A quantificação dos oligossacarídeos produzidos foi dada em porcentagem, considerando-se 10 mg (massa inicial de polissacarídeo submetida à hidrólise) como 100%. Os valores de áreas obtidos em EC foram convertidos em miligramas através da equação de reta (ver tópico 4.2.6).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 EXTRAÇÃO DA *KAPPA*-CARRAGENANA

Com a finalidade de obtenção de *kappa*-carragenana, a macroalga vermelha *Kappaphycus alvarezii* seca e moída (40 g) foi submetida à extração aquosa a quente (65°C por 5 horas). Após centrifugação, o sobrenadante foi tratado com etanol para a precipitação dos polissacarídeos (rendimento 59,9%). Uma parte da fração polissacarídica liofilizada (10 g) foi solubilizada em água destilada (0,25 g% p/v) e tratada com cloreto de potássio (KCl) até a obtenção de concentração 0,1M. O precipitado foi submetido a diálise contra NaCl 1 M e, posteriormente, com água destilada até remoção do sal. Após diálise, a solução foi congelada e liofilizada. O material precipitado (rendimento de 70,2%) corresponde a carragenanas do tipo *kappa*. Este fracionamento com KCl em baixas concentrações molares está relacionado com a quantidade de grupamentos sulfato presentes. Desta forma, carragenanas da família a *kappa* (um grupo sulfato a cada dissacarídeo repetitivo) são precipitadas em baixas concentrações molares de KCl, enquanto carragenanas da família *iota* (dois grupamentos sulfato a cada dissacarídeo repetitivo) necessitam de concentrações molares de KCl maiores, por possuírem maior número de grupamentos sulfato em sua estrutura (MATULEWICZ et al., 1989; PERNAS et al., 1967; REES, 1963). Este mecanismo está relacionado com a presença do cátion K⁺ que é capaz de suprimir a repulsão eletrostática entre os grupamentos sulfato presentes na estrutura, usualmente em forma de mola ou dupla-hélice, do polissacarídeo em solução. Esta supressão eletrostática permite a formação de agregados moleculares, favorecendo a associação de duplas-hélices, característicos da estrutura gel.

5.2 PRODUÇÃO DE OLIGOSSACARÍDEOS PADRÕES

5.2.1 Hidrólise ácida parcial e redução dos oligossacarídeos

A metodologia utilizada para a hidrólise parcial da *kappa*-carragenana de *Kappaphycus alvarezii* foi realizada de acordo com o método descrito por Stevenson e Furneaux em 1991 e por Ducatti e colaboradores em 2011, sendo o

polissacarídeo submetido à hidrólise com ácido trifluoroacético (TFA) 0,1 M a 65 °C por 3 horas. Esta metodologia promove, através da hidrólise parcial ácida, a hidrólise específica de ligações 3,6-anidro- α -galactosídicas, gerando assim oligossacarídeos redutores. Os oligossacarídeos formados apresentam unidades terminais de anidrogalactose na forma de aldeído hidratado, como apresentado na figura 1.

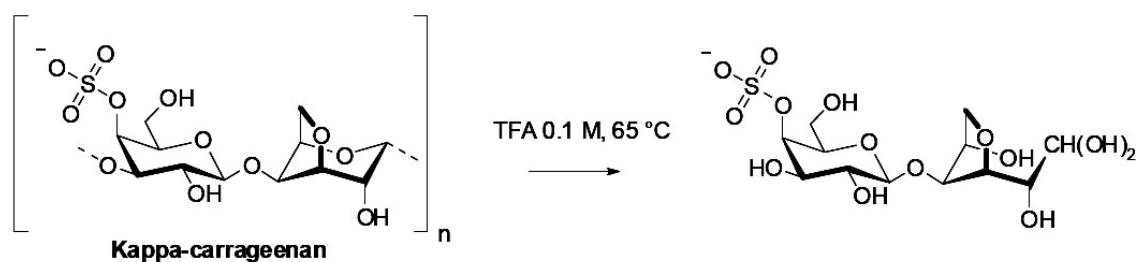


FIGURA 1 - PRODUÇÃO DE OLIGOSSACARÍDEOS VIA HIDRÓLISE ÁCIDA PARCIAL DA KAPPA-CARRAGENANA. (ADAPTADO DE DUCATTI *et al.*, 2011)

O produto de hidrólise ácida parcial apresentou rendimento de 82,5% (619 mg) e foi denominado fração F-k. Análises de RMN ^1H comparativas da fração F-k (figura 2A) e da *kappa*-carragenana (figura 2B) confirmaram a ocorrência da hidrólise.

O espectro de RMN de ^1H da *kappa*-carragenana apresentou sinais característicos desta galactana (USOV, 1984). Na tabela 4, são apresentados os valores de deslocamento químico (H-1 a H-6) das unidades constituintes da díade β -D-galp ligada a unidades de 3,6-An- α -D-galp.

TABELA 4 - DESLOCAMENTOS QUÍMICOS (PPM) DE PRÓTON (^1H) DETERMINADOS A 30°C DA KAPPA-CARRAGENANA DE *Kappaphycus alvarezii*

		β -D-Galp	3,6-An- α -D-Galp
próton	1	4,65	5,10
	2	3,60	4,15
	3	4,02	4,52
	4	4,86	4,68
	5	3,81	4,62
	6	3,81	4,21
	6'	3,81	4,05

O espectro de RMN ^1H da fração F-k (figura 2A) mostrou na região de 4,9 a 5,10 ppm, a presença do sinal em 5,01 ppm, que corresponde ao H-1 da unidade redutora da 3,6-anidrogactose (DUCATTI *et al.*, 2011), confirmando a ocorrência da hidrólise das ligações 3,6-anidrogactosídicas. A presença do sinal em 5,10 ppm, referente ao H-1 de unidades 3,6-anidrogactose ligadas (internas) (USOV, 1984), indica que a hidrólise parcial gerou, além de dissacarídeos, oligossacarídeos com maior grau de polimerização.

Através da integração das áreas relativas aos sinais em 5,10 ppm (H-1 de unidades 3,6-anidrogactose 4-ligadas) e 5,01 ppm (H-1 da unidade redutora da 3,6-anidrogactose), foi possível estimar uma relação entre o tipo de oligossacarídeo produzido majoritariamente. Caso esta relação seja 1:1, espera-se que a hidrólise tenha gerado oligossacarídeos que apresentam igual contribuição entre prótons anoméricos correspondentes a unidades de 3,6-anidrogactose 4-ligadas (5,10 ppm) e unidades de 3,6-anidrogactose redutoras (5,01 ppm), ou seja, um tetrassacarídeo - molécula formada por 4 unidades monossacarídicas, a qual apresenta uma unidade 3,6-anidrogactose 4-ligada e uma unidade em sua forma redutora. Relações superiores a 1 indicam que a hidrólise gerou oligossacarídeos maiores do que tetrassacarídeos. Por fim, relações inferiores a 1 indicam a presença majoritária de oligossacarídeos menores do que tetrassacarídeos, ou seja, dissacarídeos. Neste caso, a ausência do sinal em 5,10 ppm indicaria a hidrólise total das ligações 3,6-anidrogactosídicas presentes no polímero original, gerando máxima produção de dissacarídeos via hidrólise ácida parcial.

Nas condições de hidrólise utilizadas nesta hidrólise ácida, a relação obtida entre estes sinais (5,10 e 5,01 ppm) foi de 0,7, o que indica que a hidrólise gerou majoritariamente dissacarídeos e preservou, em parte, as ligações 3,6-anidrogactosídicas presente no polímero original.

Para converter os oligossacarídeos para sua forma alditol, estes foram submetidos à redução do grupamento aldeído utilizando-se NaBH_4 . A fração F-k (619 mg) foi solubilizada em de água juntamente com NaBH_4 (135 mg) e esta mistura foi mantida sob agitação magnética em banho de gelo por 6 horas. Após redução do volume por evaporação em pressão reduzida e liofilização, obteve-se a fração F-kr (770 mg).

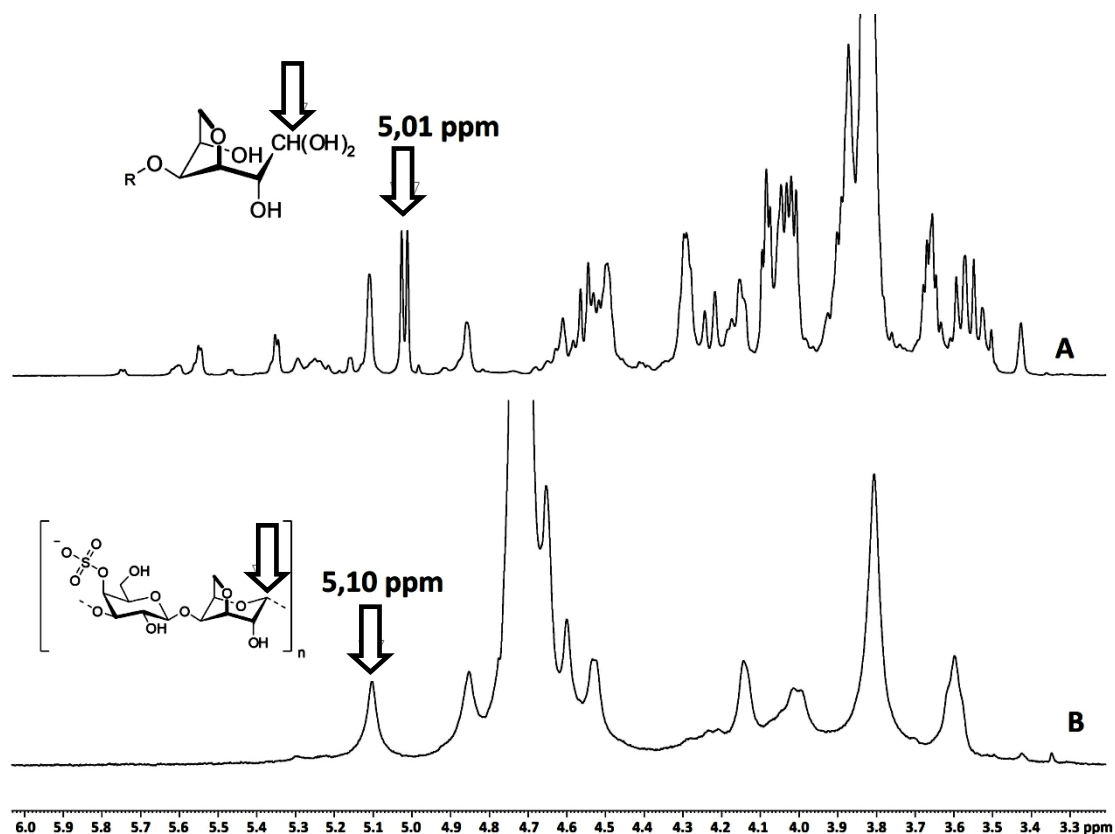


FIGURA 2 - A - ESPECTRO DE RMN - ¹H DOS PRODUTOS DE HIDRÓLISE ÁCIDA PARCIAL (FRAÇÃO F-k), OBTIDOS A PARTIR DA KAPPA-CARRAGENANA DE *Kappaphycus alvarezii*. A seta indica sinal em 5,01 ppm correspondente a H-1 da unidade 3,6-anidrogactose na forma de aldeído hidratado. B - ESPECTRO DE RMN - ¹H DA KAPPA-CARRAGENANA DE *Kappaphycus alvarezii*. A seta indica sinal em 5,10 ppm correspondente a H-1 da unidade 3,6-anidrogactose na forma 4-ligada (interna).

Para confirmar a redução dos grupamentos aldeído presentes nesta fração Fk-r, foi utilizada a análise de RMN de ¹H. Através da análise dos espectros das amostras F-k e F-kr (antes e após etapa de redução, respectivamente, figura 3), pode-se observar o deslocamento do sinal em 5,01 ppm (H-1 da unidade 3,6-anidrogactose, quando na forma redutora) para 3,71 ppm (H-1 da mesma unidade, quando na forma reduzida). Estes resultados confirmam a obtenção de oligossacarídeos alditóis.

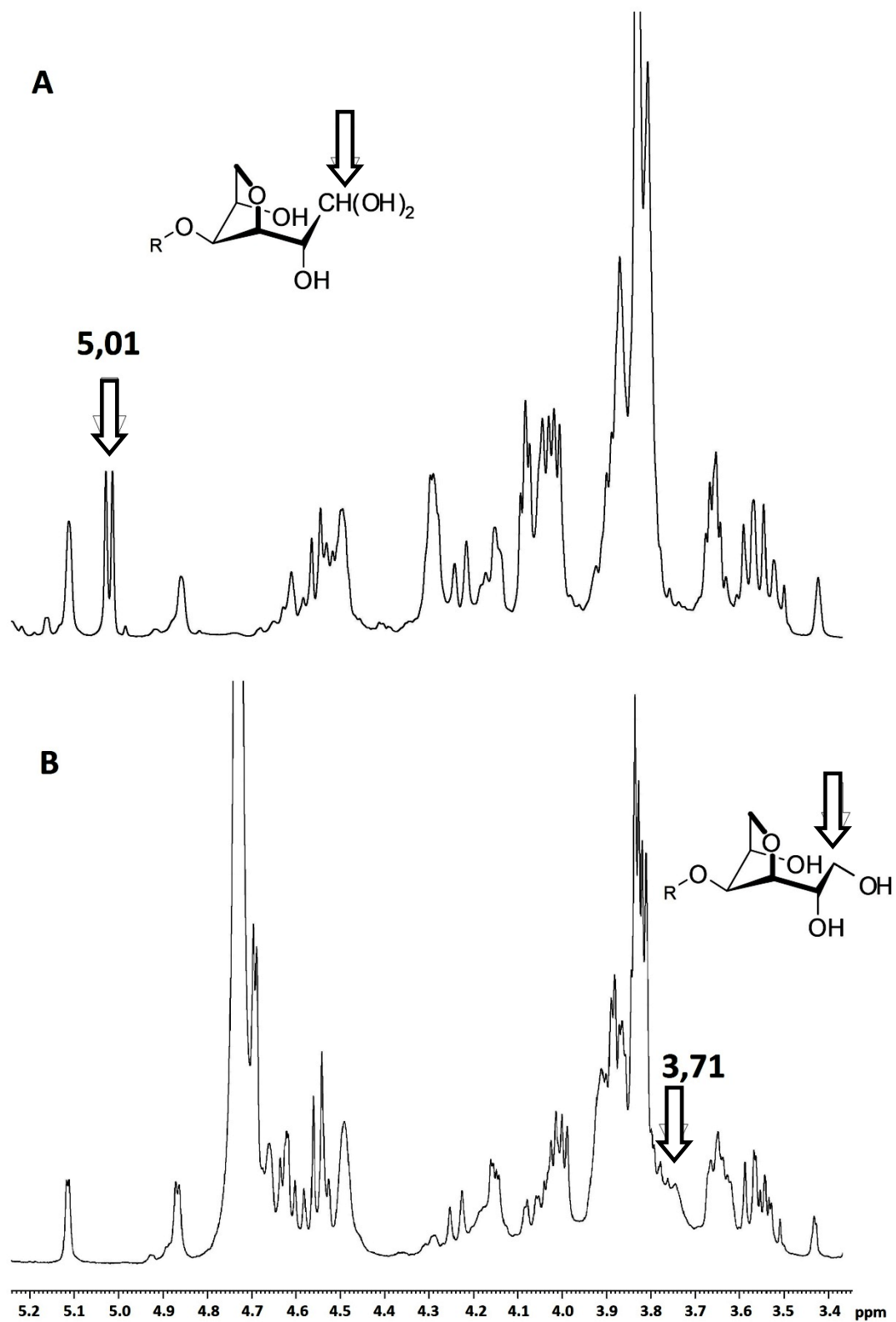


FIGURA 3 - A – ESPECTRO DE RMN - ^1H DOS PRODUTOS DE HIDRÓLISE ÁCIDA PARCIAL DA FRAÇÃO F-k. B - ESPECTRO DE RMN - ^1H DA FRAÇÃO F-Kr.

5.2.2 Métodos cromatográficos aplicados para isolamento dos oligossacarídeos

A fração F-kr contendo oligossacarídeos alditóis foi submetida à cromatografia de troca iônica em DEAE–Sephacel. A eluição foi realizada inicialmente com água destilada e, em seguida, com diferentes concentrações molares de carbonato de amônio (0,05 M; 0,075 M; 0,100 M; 0,125 M). O acompanhamento do processo de eluição foi realizado pelo método de detecção de carboidratos totais (DUBOIS *et al.*, 1956) sendo que o perfil cromatográfico está apresentado na figura 4.

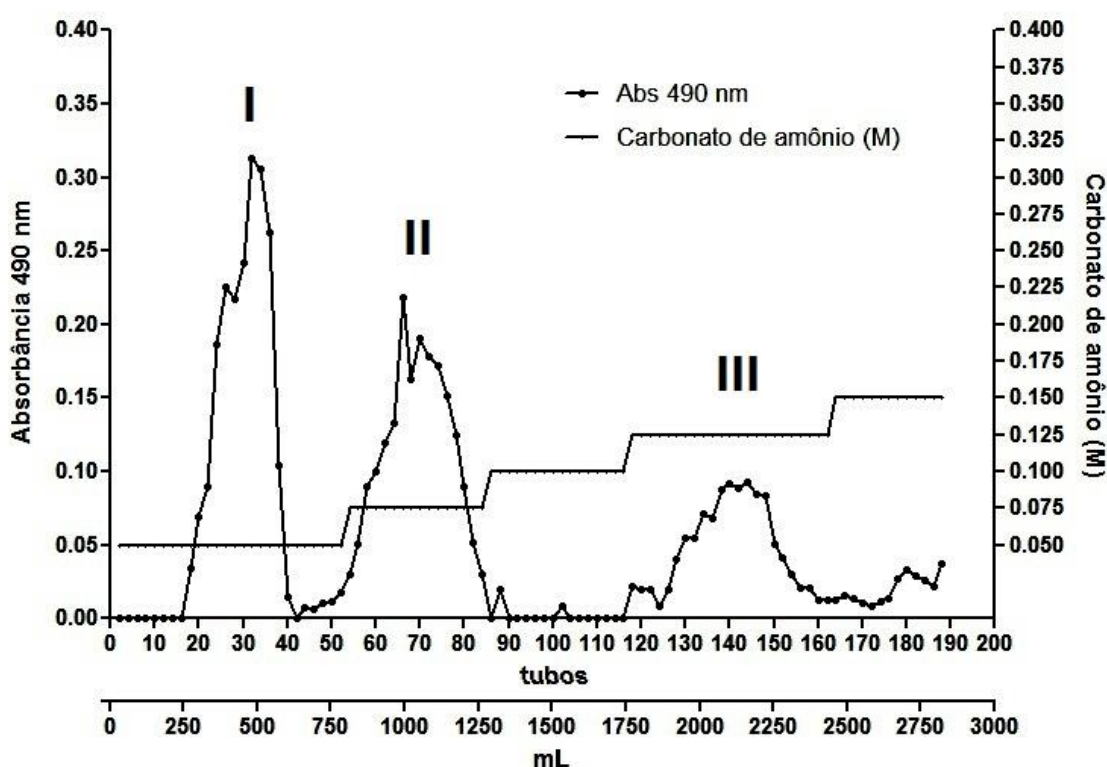


FIGURA 4 - PERFIL DE ELUIÇÃO OBTIDO POR CROMATOGRAFIA DE TROCA ANIÔNICA (DEAE–SEPHACEL) DA FRAÇÃO F-Kr.

O perfil de eluição (figura 4) revelou três picos bem definidos (I, II e III) para as seguintes concentrações de carbonato de amônio: 0,05; 0,075 e 0,125 M, respectivamente. As frações eluídas com carbonato de amônio 0,100 M e 0,150 M, por não apresentarem quantidades significativas de carboidratos, foram descartadas.

Algumas amostras fracionadas dos picos I, II e III foram selecionadas para análise em cromatografia de camada delgada (CCD). Do pico I (referente

reunidos, tratados conforme descrito anteriormente, originando as frações F-k4 e F-k6, respectivamente.

Os rendimentos foram: F-k2= 259 mg (41,8%), F-k4= 119 mg (19,21%) e F-k6= 40 mg (6,5%).

5.2.3 Análise de RMN das frações F-k2, F-k4 E F-k6.

As frações F-k2, F-k4 e F-k6 foram submetidas à análise de RMN de ^1H (espectros estão representados nas figuras 6, 7 e 8, respectivamente), RMN ^{13}C (figura 9) e análises de RMN bidimensionais (HSQC e COSY, figuras 12, 13 e 14). Os assinalamentos estão apresentados na tabela 5.

Através da análise da região do espectro de ^1H correspondente à faixa de 4,7 a 5,2 ppm das três frações (figura 9), podemos fazer algumas considerações. A fração F-k2 (dissacarídeo carrabitol 4²-sulfato), apresenta sinal (duplete) em 4,69 ppm, sendo este referente ao H-4 da unidade de β -D-galactopiranosose 4-sulfato (GONÇALVES, 2005). A fração F-k4 (tetrassacarídeo) apresenta três sinais (dupletes) nesta região: 4,69; 4,84 e 5,10 ppm; referentes ao H-4 da unidade β -D-galactopiranosose 4-sulfato externa, H-4 da unidade β -D-galactopiranosose 4-sulfato interna e H-1 da unidade de 3,6-anidro- α -galactopiranosose interna, respectivamente (GONÇALVES, 2005; USOV, 1984). A integração dos sinais acima citados fornecem uma relação 1:1:1; confirmando a presença do tetrassacarídeo carratetraitol 4², 4⁴-dissulfato. No espectro de RMN- ^1H da fração F-k6 (hexassacarídeo) também estão presentes os sinais acima citados, porém, devido à presença de duas unidades β -D-galactopiranosose 4-sulfato internas, duas unidades 3,6-anidro- α -galactopiranosose internas e uma unidade β -D-galactopiranosose 4-sulfato externa, a integração dos sinais referentes a estes prótons obedeceu à relação 2:2:1, confirmando assim a presença do hexassacarídeo carrahexitol 4², 4⁴, 4⁶-trissulfato. Deste modo, a análise de RMN ^1H na faixa de 4,7 a 5,2 ppm do espectro permitiu a identificação do tipo de oligossacarídeo presente nas frações F-k2, F-k4 e F-k6.

Os assinalamentos obtidos nestes experimentos foram comparados com dados descritos em literatura para os oligossacarídeos de *kappa*-carragenana

(GONÇALVES, 2005; DUCATTI *et al.*, 2011). Foi confirmado que os oligossacarídeos presentes na amostra F-k2 e F-k4 se mostraram compatíveis com a estrutura dos oligossacarídeos carrabitol 4² – sulfato e carratetraitol 4²,4⁴ – dissulfato, respectivamente (GONÇALVES, 2005). Para o completo assinalamento químico de próton e carbono da estrutura do oligossacarídeo presente na fração F-k6 (hexassacarídeo carrahexaitol 4², 4⁴, 4⁶-trissulfato), experimentos bidimensionais (COSY e HSQC, figura 11) foram necessários, sendo este pela primeira vez completamente assinalado (tabela 5).

A nomenclatura utilizada na tabela 5 para indicar as unidades monossacarídicas dos oligossacarídeos presentes nas frações F-k2, F-k4 e F-k6 obedeceram ao esquema apresentado na figura 10.

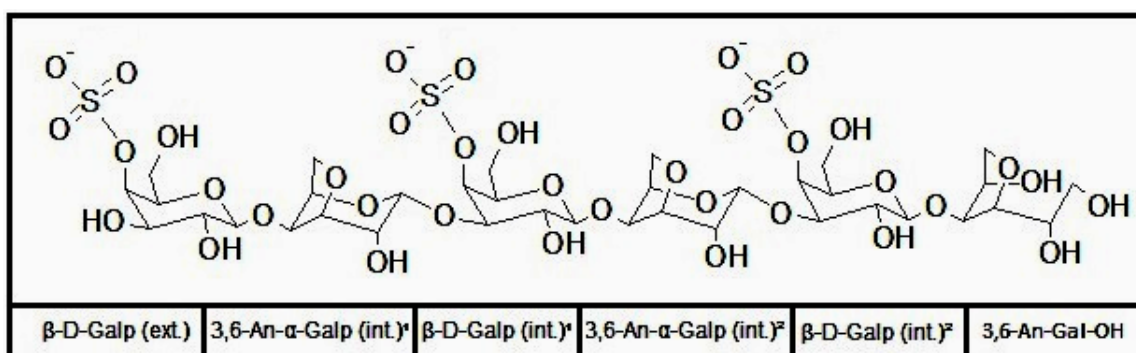


FIGURA 6 - NOMENCLATURA DAS UNIDADES MONOSSACARÍDICAS DO OLIGOSSACARÍDEO HEXASSACARÍDEO CARRAHEXAITOL 4², 4⁴, 4⁶-TRISSULFATO PRESENTE NA FRAÇÃO F-K6

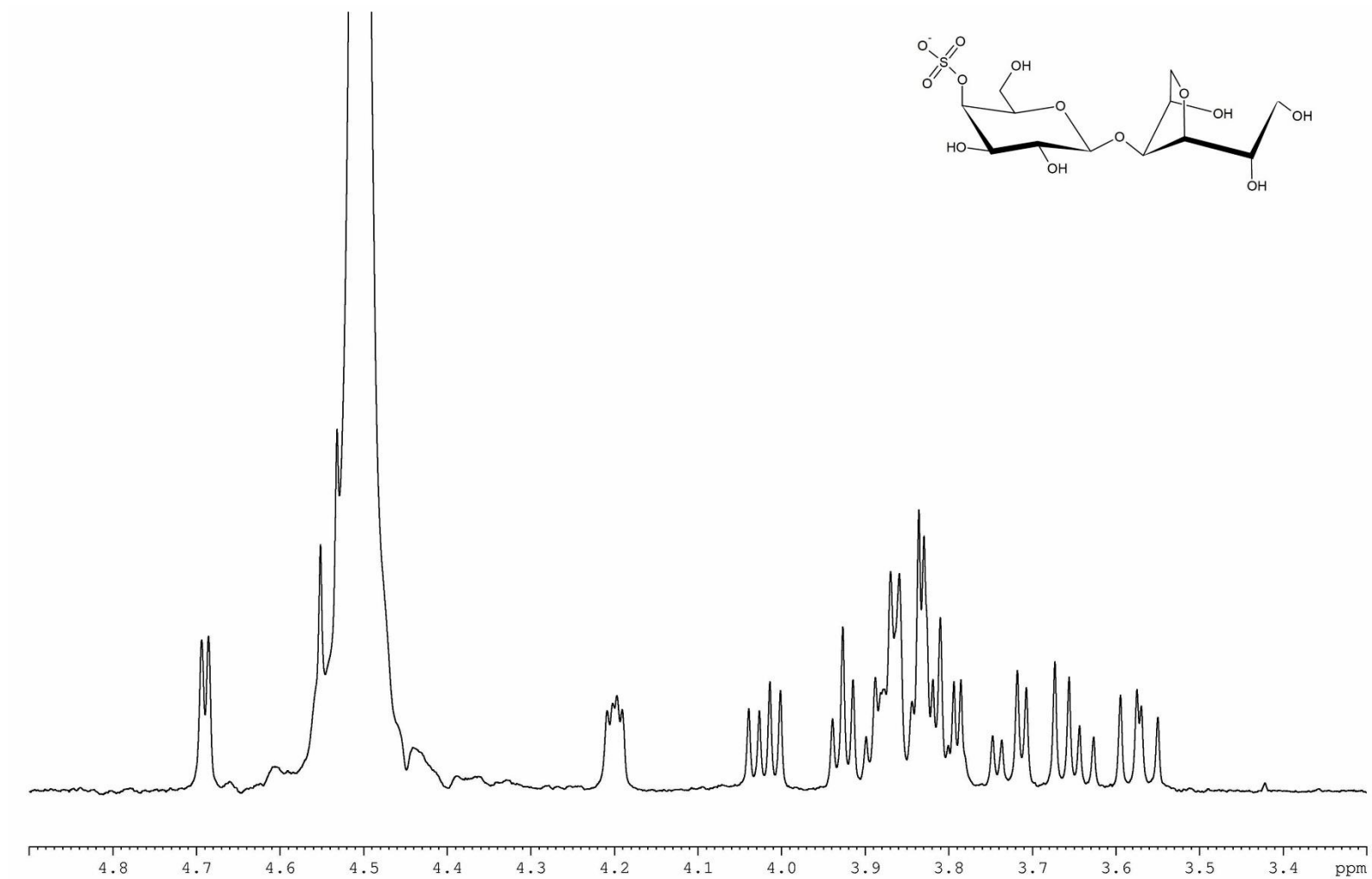


FIGURA 7 - ESPECTRO DE RMN- ^1H DA FRAÇÃO F-k2 (CARRABIITOL 4² – SULFATO)

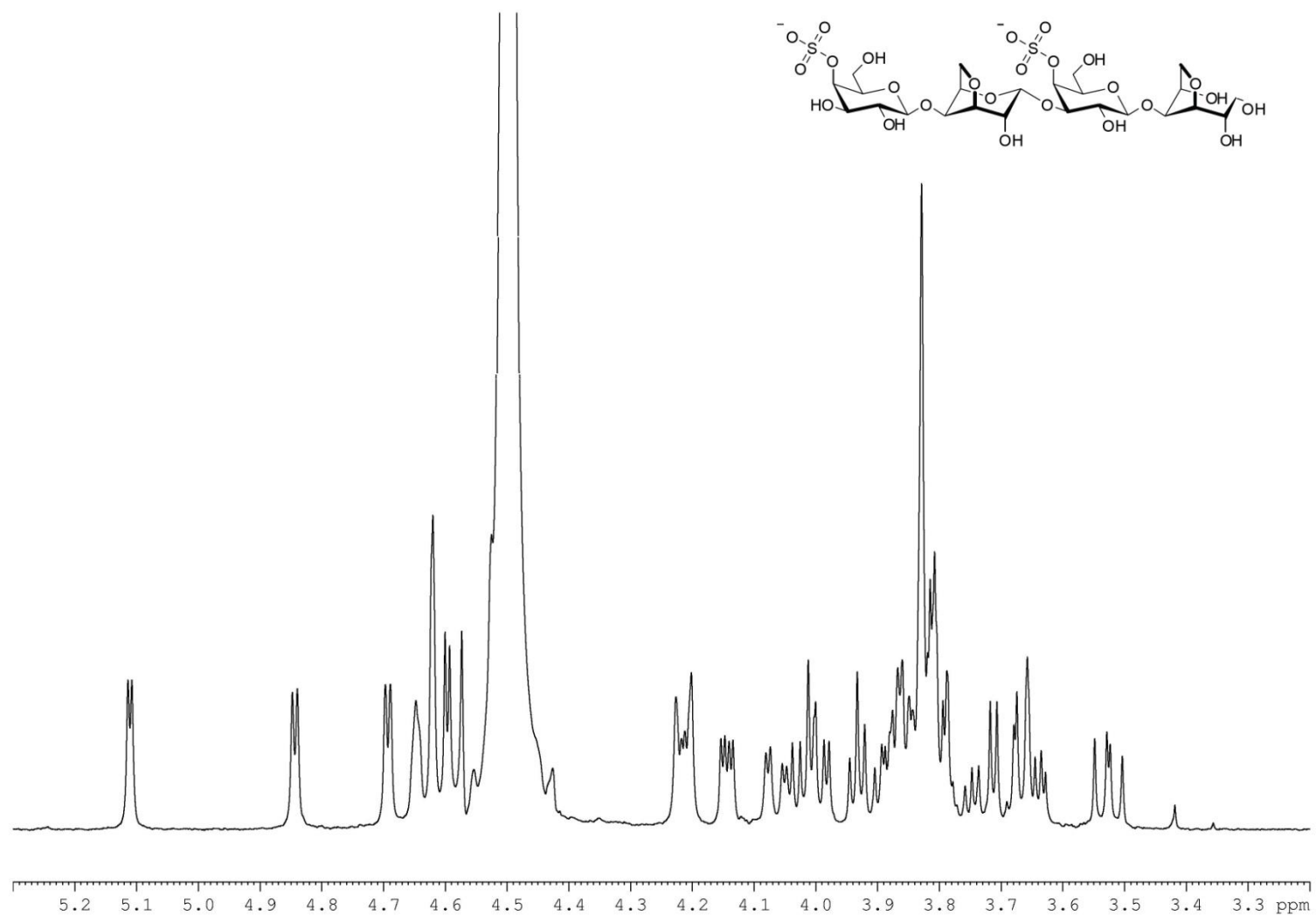


FIGURA 8 - ESPECTRO DE $^1\text{H-NMR}$ DA FRAÇÃO F-k4 (CARRATETRAITOL 4²,4⁴ - DISSULFATO)

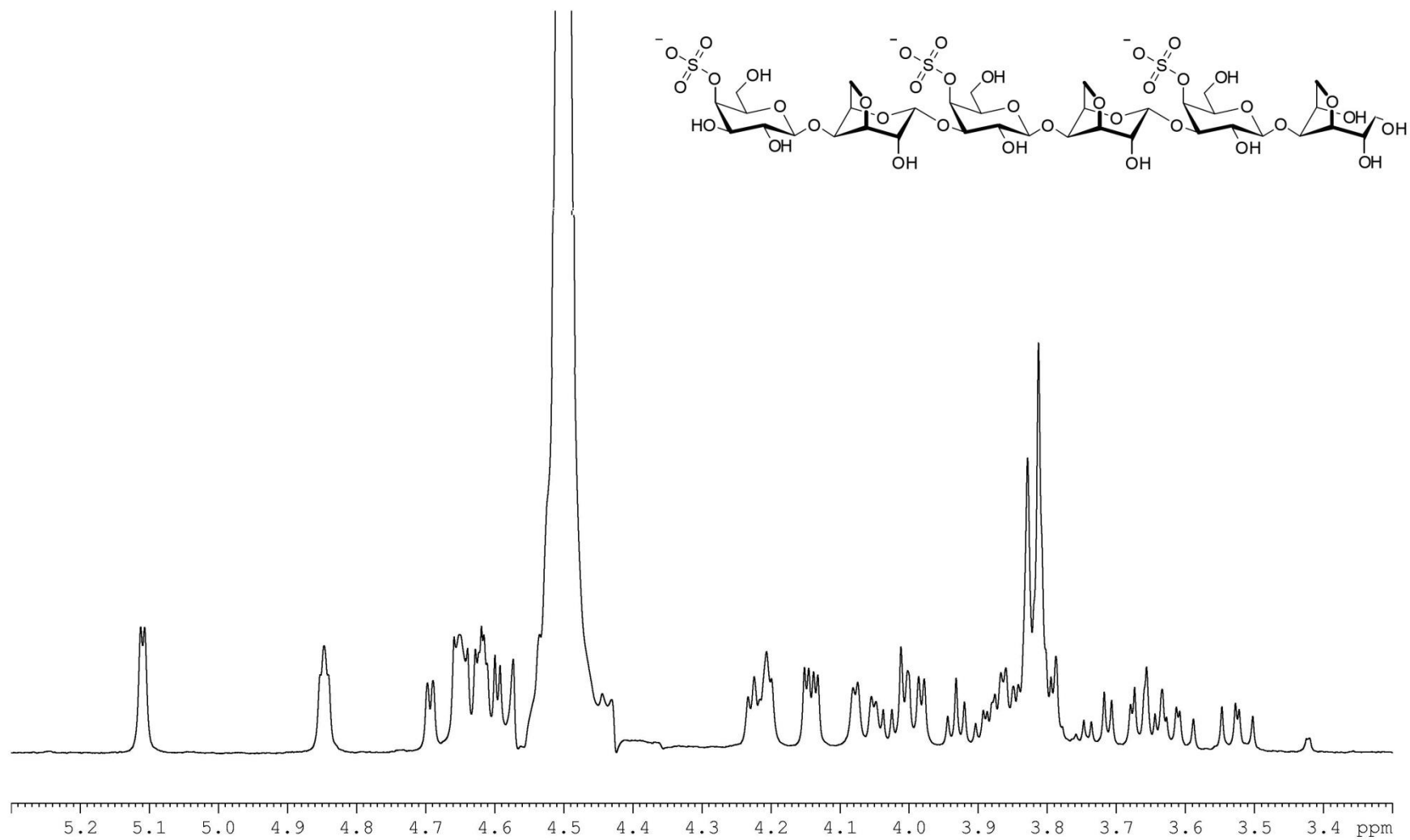


FIGURA 9 - ESPECTRO DE ¹H-RMN DA FRAÇÃO F-k6 (CARRAHEXAITOL 4², 4⁴, 4⁶- TRISSULFATO)

TABELA 5 - ASSINALAMENTOS DE RMN DE ^1H E ^{13}C DOS OLIGOSSACARÍDEOS OBTIDOS A PARTIR DA KAPPA -CARRAGENANA DE *Kappaphycus alvarezii* POR HIDRÓLISE ÁCIDA PARCIAL

Unidade	átomo	Fração					
		F-k2 (carrabiitol 4 ² -sulfato)		F-k4 (carratetraitol 4 ² , 4 ⁴ - dissulfato)		F-k6 (carrahexaitol 4 ² , 4 ⁴ , 4 ⁶ - trissulfato)	
		^1H	^{13}C	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C
β -D-Galp (ext.)	1	4,52	103,04	4,59	102,20	4,59	102,20
	2	3,55	70,83	3,51	70,75	3,51	70,80
	3	3,77	71,72	3,78	71,70	3,77	71,78
	4	4,67	76,38	4,68	76,43	4,69	76,46
	5	3,85	74,52	3,82	74,42	3,81	74,47
	6	3,81	60,94	3,80	60,93	3,81	60,96
	6'	3,81	-	3,80	-	3,81	-
3,6-An- α -Galp (int.) ¹	1	/	/	/	/	5,10	94,55
	2	/	/	/	/	4,13	69,37
	3	/	/	/	/	4,51	78,73
	4	/	/	/	/	4,61	77,83
	5	/	/	/	/	4,64	76,26
	6	/	/	/	/	4,20	69,03
	6'	/	/	/	/	4,05	-
β -D-Galp (int.) ¹	1	/	/	/	/	4,63	102,00
	2	/	/	/	/	3,61	69,15
	3	/	/	/	/	3,98	78,12
	4	/	/	/	/	4,83	73,40
	5	/	/	/	/	3,81	74,50
	6	/	/	/	/	3,81	60,81
	6'	/	/	/	/	3,80	-
3,6-An- α -Galp (int.) ²	1	/	/	5,10	94,42	5,10	94,55
	2	/	/	4,13	69,29	4,13	69,37
	3	/	/	4,50	78,71	4,51	78,73
	4	/	/	4,62	77,80	4,61	77,83
	5	/	/	4,65	76,20	4,64	76,26
	6	/	/	4,06	69,03	4,20	69,03
	6'	/	/	4,20	-	4,05	-
β -D-Galp (int.) ²	1	/	/	4,57	102,70	4,57	102,70
	2	/	/	3,65	69,10	3,65	69,15
	3	/	/	3,98	77,96	3,98	78,12
	4	/	/	4,82	73,34	4,83	73,50
	5	/	/	3,83	74,42	3,81	74,39
	6	/	/	3,80	60,80	3,81	60,81
	6'	/	/	3,80	-	3,81	-
3,6-An-Galp-OH	1	3,69	62,75	3,71	62,75	3,70	62,81
	1'	3,62	-	3,65	-	3,65	-
	2	3,86	71,24	3,88	71,20	3,87	71,24
	3	3,90	83,21	3,92	83,19	3,92	83,23
	4	4,18	87,17	4,21	87,09	4,20	87,07
	5	4,47	75,59	4,49	75,58	4,48	75,61
	6	4,98	72,67	4,00	72,68	3,99	72,72
6'	3,81	-	3,84	-	3,84	-	

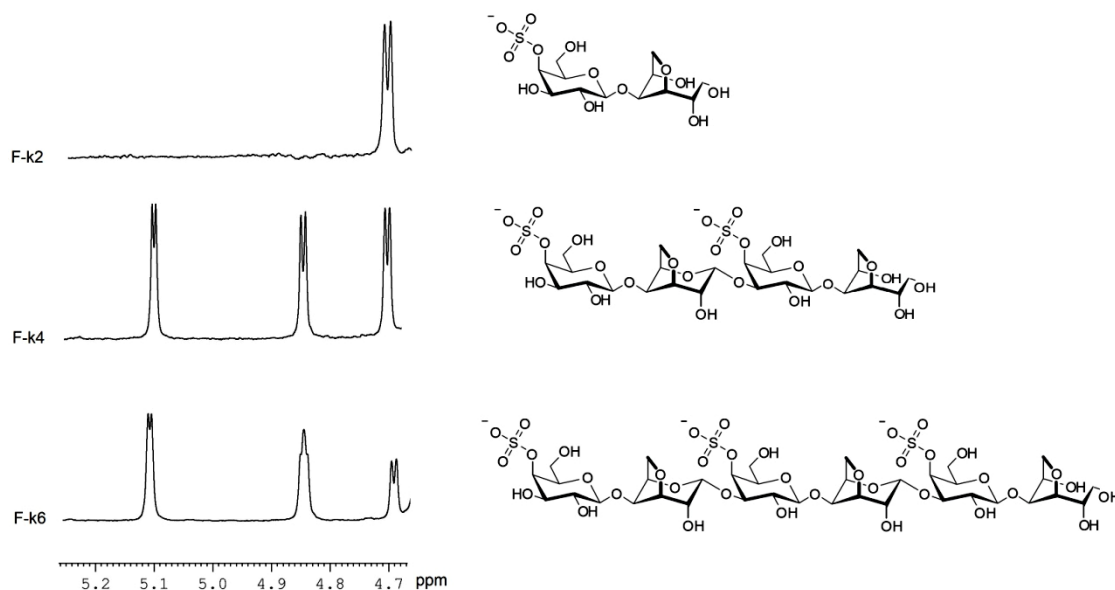


FIGURA 10 - ESPECTROS DE RMN-¹H (REGIÃO DE 4,7 A 5,3 PPM) DAS FRAÇÕES F-k2, F-k4, F-k6

Ensaio de RMN - ¹³C também foram realizados para a determinação da estrutura química das frações F-k2, F-k4 e F-k6 (figura 11A, 11B e 11C respectivamente). O espectro da fração F-k2 (figura 11A), mostrou um sinal na região anomérica (103,4 ppm, correspondente ao C-1 da unidade de β-D-Galp). Além disso, não está presente neste espectro o sinal em 94,4 ppm, característico de C-1 das unidades de 3,6-An-α-Galp internas, ou seja, estes resultados confirmam que a fração F-k2 corresponde ao dissacarídeo carrabiitol 4² – sulfato.

Na figura 11B, está representado o espectro da fração F-k4. Este espectro apresenta dois sinais em 102,2 e 102,7 ppm – correspondentes ao carbono C-1 das duas unidades de β-D-Galp, externa e interna, respectivamente. Neste espectro, também é observado a presença do sinal anomérico em 94,4 ppm, correspondente às unidades de 3,6-An-α-Galp 4-ligada interna, ou seja, estes espectros são compatíveis com a estrutura do tetrassacarídeo carratetraitol 4²,4⁴ – dissulfato anteriormente descrito.

A análise do espectro da fração F-k6 (figura 11C) apresentou três sinais na região anomérica: 102,70; 102,20 e 102,00 ppm (compatíveis com os três sinais das unidades β-D-Galp, β-D-Galp (int.)², β-D-Galp (ext.) e β-D-Galp (int.)¹,

respectivamente). Ainda em relação à figura 10 C, observamos no espectro de RMN – ^{13}C a intensificação do sinal em 94,4 ppm, indicando a presença da unidade de 3,6-An- α -Galp 4-ligada interna. Estes resultados confirmam que o oligossacarídeo hexassacarídeo carrahexaitol 4², 4⁴, 4⁶-trissulfato está presente na fração F-k6.

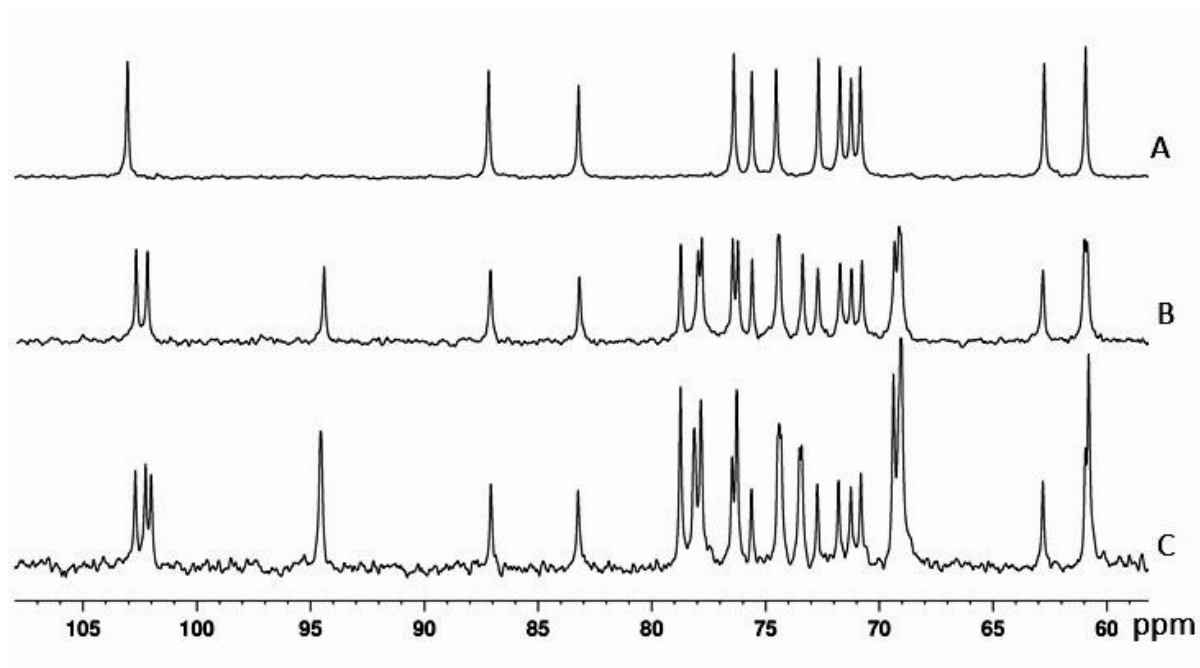


FIGURA 11 - A – ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DA FRAÇÃO F-k2. B - ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DA FRAÇÃO F-k4. C - ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DA FRAÇÃO F-k6

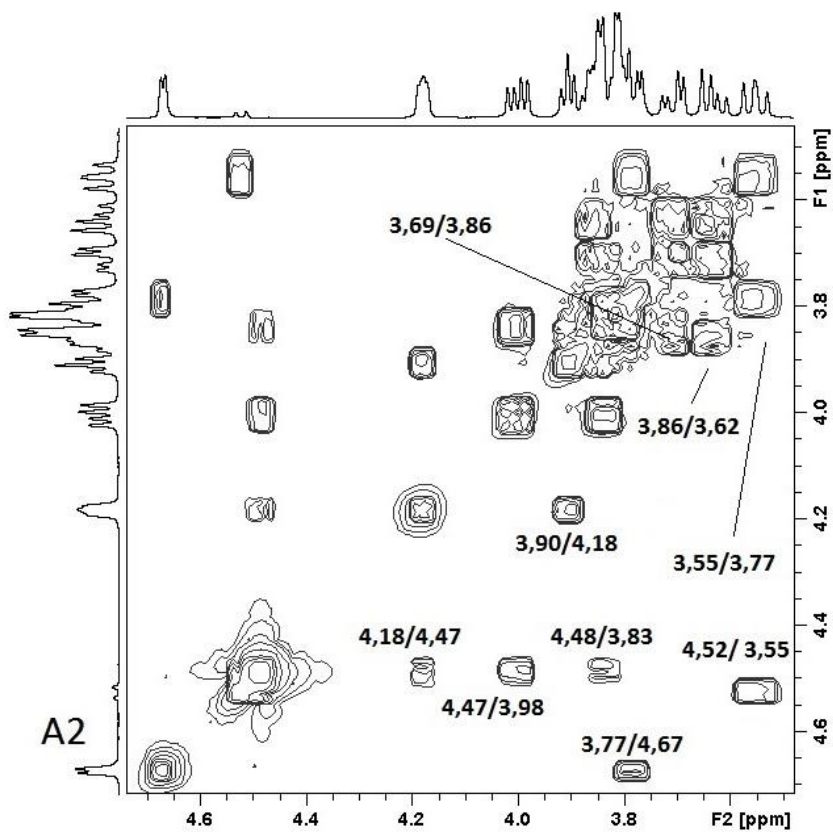
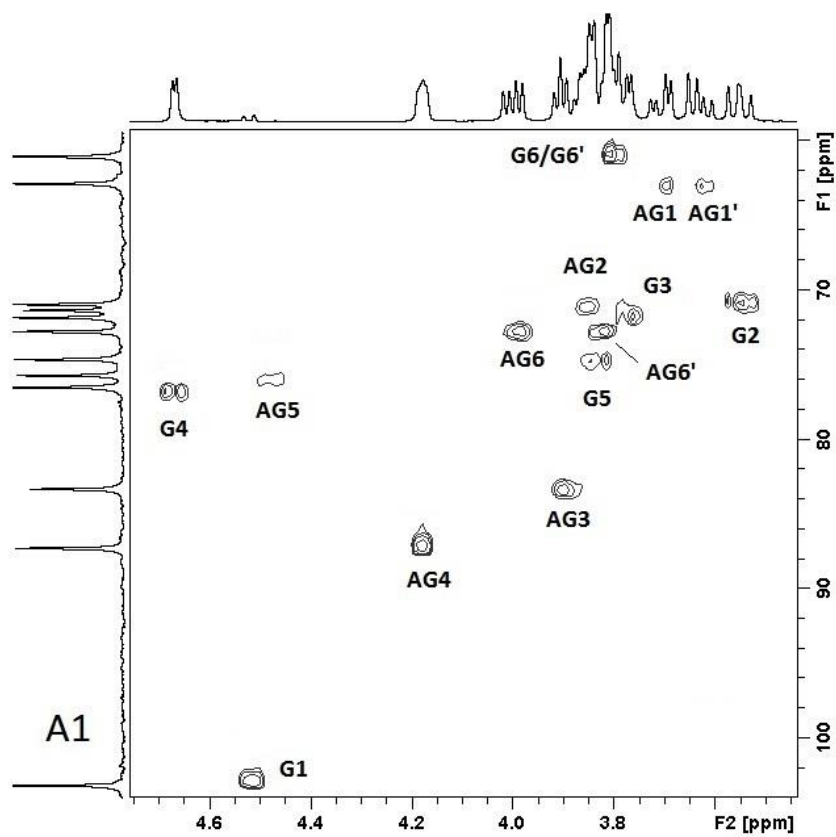


FIGURA 12 - ESPECTROS DE RMN BIDIMENSIONAIS HSQC (A1) E COSY (A2) DA FRAÇÃO Fk-2. No espectro de HSQC, **G**, e **AG** correspondem a Galp, e 3,6-AnGalOH, respectivamente.

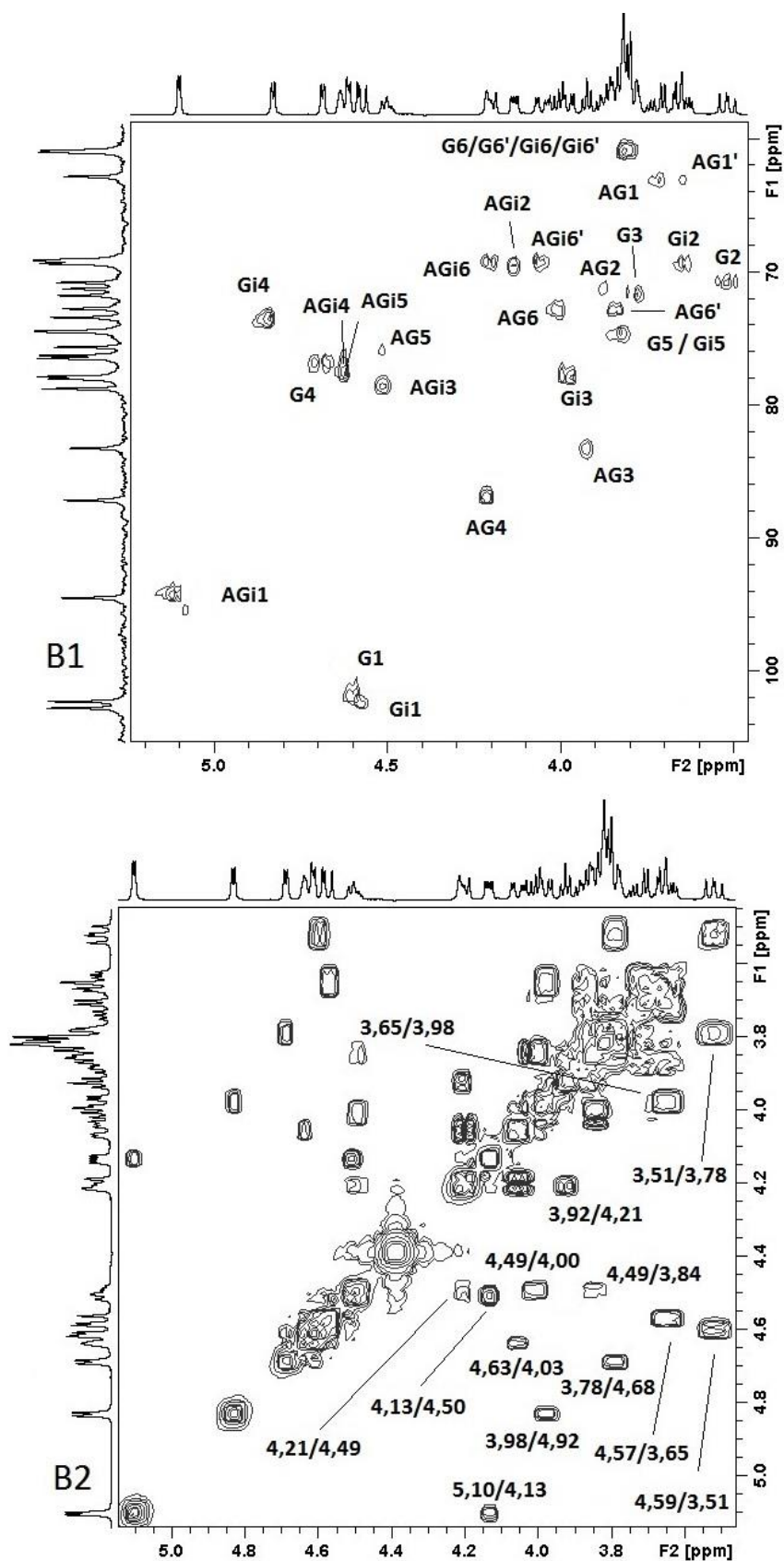


FIGURA 13 - ESPECTROS DE RMN BIDIMENSIONAIS HSQC (B1) E COSY (B2) DA FRAÇÃO Fk-4. No espectro de HSQC, G, AGi, Gi, e AG correspondem a Galp externa, 3,6-AnGalp, Galp interna, e 3,6-AnGalOH, respectivamente

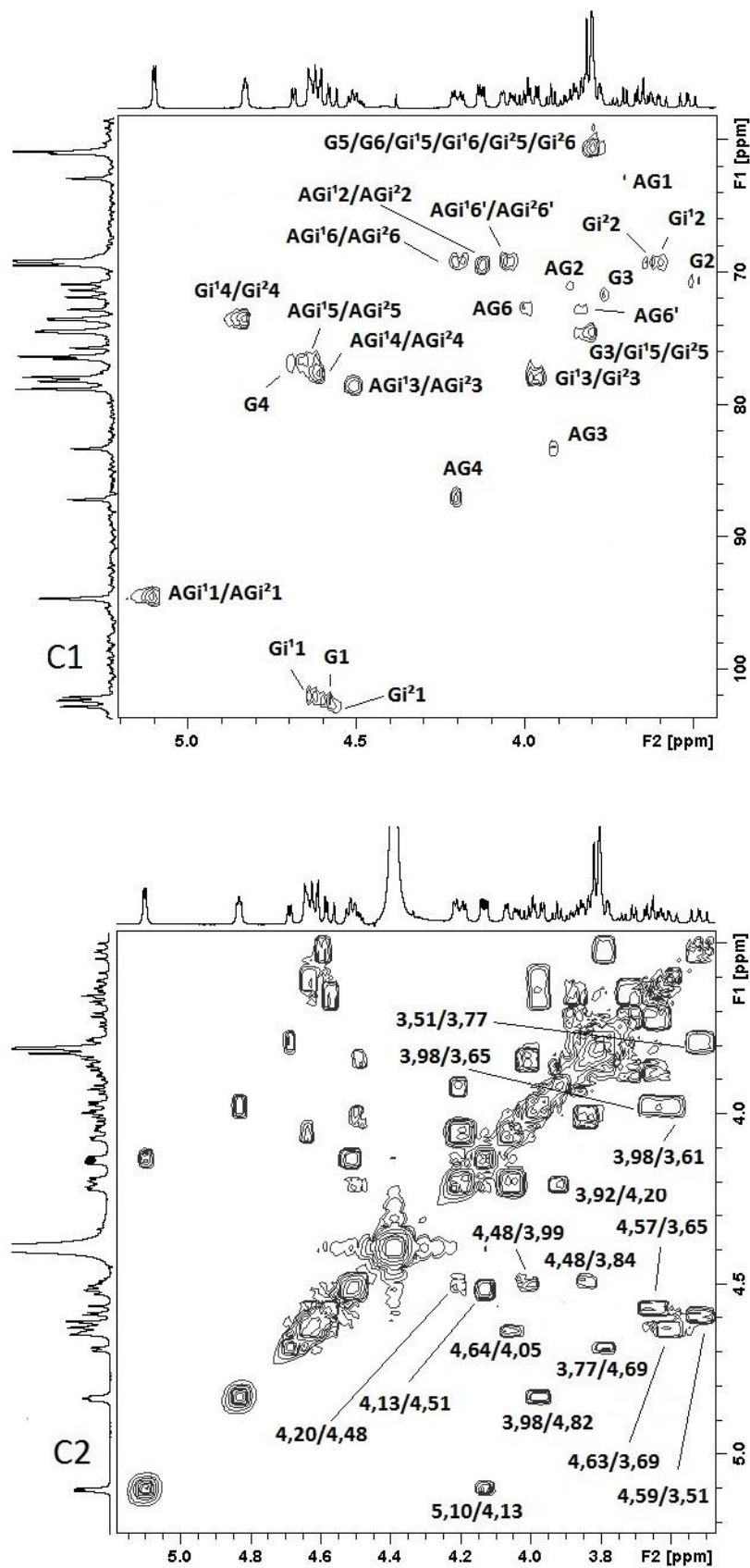


FIGURA 14 - ESPECTROS DE RMN BIDIMENSIONAIS HSQC (C1) E COSY (C2) DA FRAÇÃO Fk-6. No espectro de HSQC, G, AGi, Gi, e AG correspondem a Galp externa, 3,6-AnGalp, Galp interna, e 3,6-AnGalOH, respectivamente.

5.2.4 Cromatografia de exclusão e conversão para a forma Na⁺ das frações F-k2, F-k4 e F-k6

Parte das frações F-k2 (26mg), F-k4 (23mg) e F-k6 (20mg) foram solubilizadas em 0,5 mL de água ultrapura e submetidas à cromatografia de exclusão (filtração em gel – BioGel P-2) para a eliminação de sal e subprodutos da hidrólise, sendo a eluição realizada com água ultrapura, originando as frações F-k2d (22 mg), F-k4d (19 mg) e F-k6d (16 mg). O perfil de eluição foi determinado frente à reação de fenol-sulfúrico, com leitura de absorbância a 490nm (figura 15).

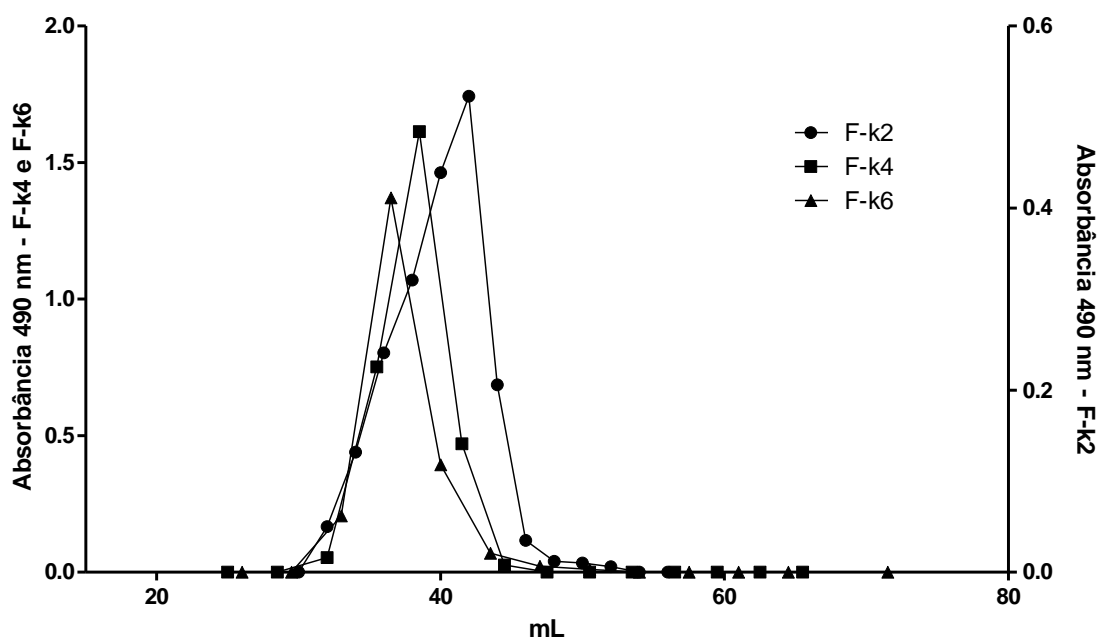


FIGURA 15 - PERFIL DE ELUIÇÃO (SOBREPOSTOS) DAS FRAÇÕES F-k2, F-k4 E F-k6 EM FILTRAÇÃO EM GEL – BIOGEL P-2.

Para verificar a eficiência da separação da cromatografia realizada na coluna BioGel-P2 descrita anteriormente, um teste com NaCl foi realizado. Foram preparados 20mg de NaCl em 0,5mL de água ultrapura. O material foi aplicado no gel, eluído com água ultrapura e o processo foi monitorado via condutividade do eluato (figura 16). Em experimento paralelo, na mesma

coluna foi aplicado 1 mg de solução blue dextran 1mg/mL, sendo a leitura realizada a 620 nm.

A análise do perfil de eluição obtido mostra a adequada resolução entre os dois compostos, primeiro o carboidrato de alta massa molecular – blue dextran – em seguida o sal de baixa massa – NaCl, com ápice dos picos de eluição em 30 e 70 mL, respectivamente. Estes dados indicam que o gel aplicado foi adequado para a separação dos oligossacarídeos de quantidades significativas de sal.

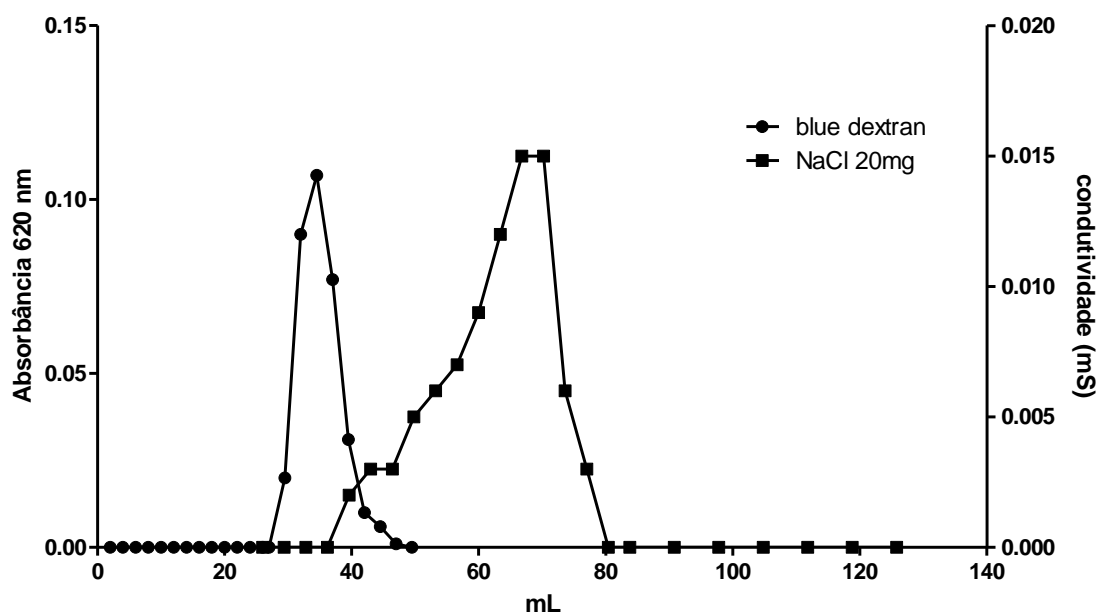


FIGURA 16 - PERFIL DE ELUIÇÃO (SOBREPOSTO) EM BIOGEL-P2 DE SOLUÇÃO DE NaCl E BLUE DEXTRAN

Em seguida, as amostras F-k2d (22 mg), F-k4d (19 mg) e F-k6d (16 mg) foram submetidas a cromatografia de troca iônica (Dowex 50 X 8 forma Na⁺) para troca do contra-íon que fica adjunto ao grupamento sulfato da molécula. O contra-íon presente até esta etapa é o amônio (NH₄⁺), sendo o propósito desta cromatografia deixar os oligossacarídeos em sua forma sódica (Na⁺), visto que o polissacarídeo de partida se encontra nesta forma. As amostras foram solubilizadas em 0,5 mL de água ultrapura e então tratadas com 2 mL de resina, em seguida filtradas (membranas de 22 µm) e liofilizadas. As amostras foram então renomeadas F-k2dNa, F-k4dNa e F-k6dNa e apresentaram os

seguintes rendimentos: 81,8 % (18 mg), 73,7 % (14 mg) e 87,5 % (14 mg), respectivamente.

Experimentos de espectrometria de massa confirmaram a conversão destes oligossacarídeos para sua forma sódica. Soluções a 1 mg/mL das amostras F-k2dNa, F-k4dNa e F-k6dNa foram preparadas em água ultrapura e analisadas por ESIMS modo positivo (figura 17) e negativo (figura 18).

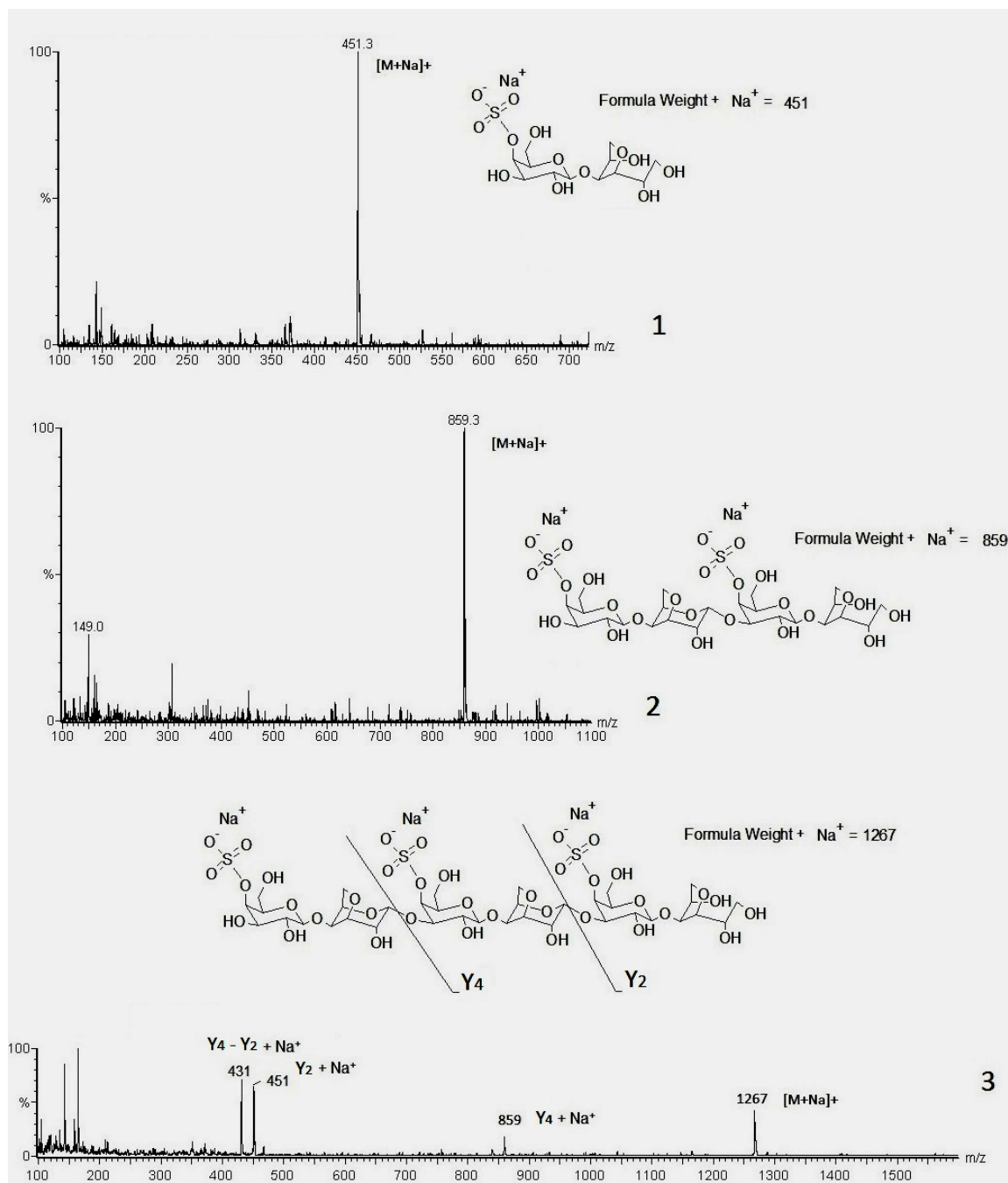


FIGURA 17 - ANÁLISE DE ESIMS (MODO POSITIVO) DAS FRAÇÕES F-k2dNa (1), F-k4dNa (2) E F-k6dNa (3).

As amostras de oligossacarídeos foram analisadas também por espectrometria de massas em modo negativo. Os principais íons estão representados na figura 15 e estão de acordo com dados apresentados na literatura para estes oligossacarídeos (GONÇALVES *et al.*, 2010).

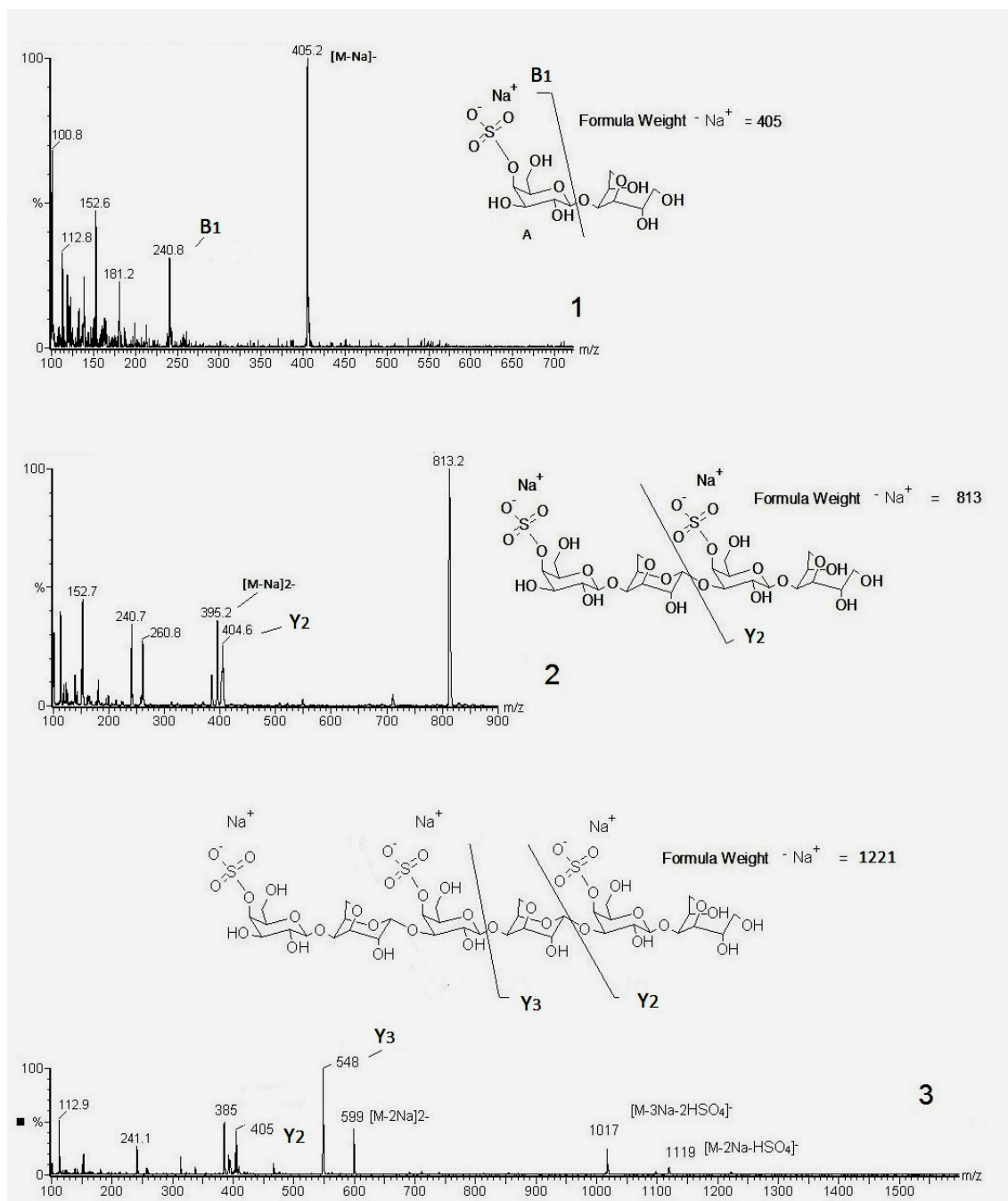


FIGURA 18 - ANÁLISE DE ESIMS (MODO NEGATIVO) DAS FRAÇÕES FK2dNa (1), F-K4dNa (2) E F-K6dNa (3).

5.2.5 Curva padrão de oligossacarídeos

As frações F-k2dNa, F-k4dNa e F-k6dNa foram utilizadas para a construção de curvas-padrão aplicadas para quantificação pela técnica de eletroforese capilar (EC). A curva contempla as seguintes concentrações de oligossacarídeos padrões: 1,000; 0,500; 0,250; 0,125; 0,0625 mg/mL. Além destas concentrações de oligossacarídeos, a cada ponto da curva foi adicionado a quantidade fixa de 0,500 mg/mL de padrão interno (poliol eritritol). Para os cálculos da equação da reta, foi utilizada a seguinte relação: $y=ax+b$, sendo y igual à área do oligossacarídeo padrão dividida pela área do padrão interno e y representa a concentração do oligossacarídeo.

As amostras liofilizadas foram pesadas em balança analítica (F-k2dNa = 4,1 mg; F-k4dNa = 8,2 mg e F-k6dNa = 7,0 mg) e diluídas em água ultrapura, gerando soluções padrões de oligossacarídeos na concentração de 5 mg/mL. A partir das respectivas soluções à 5 mg/mL, juntamente com uma solução de padrão interno eritritol 10 mg/mL, as concentrações da curva-padrão foram elaboradas através de sucessivas pipetagens, partindo-se das soluções padrões 5mg/mL (tabela 6).

TABELA 6 - INTERVALO DE LINEARIDADE UTILIZADO NA CURVA-PADRÃO

Intervalo de linearidade (mg/mL)	F-k2dNa (5mg/mL) μ L	F-k4dNa (5mg/mL) μ L	F-k6dNa (5mg/mL) μ L	Eritritol (padrão interno) (10 mg/mL) μ L	H ₂ O μ L	vol. final μ L
1,000	100	100	100	25	175	500
0,500	50	50	50	25	325	500
0,250	25	25	25	25	400	500
0,125	25	25	25	50	875	1000
0,0625	25	25	25	100	1825	2000

5.3 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO E VALIDAÇÃO EM EC

O desenvolvimento do método em EC para a detecção de oligossacarídeos sulfatados foi baseado em metodologias já aplicadas em nosso laboratório (GONÇALVES, 2005). Contudo, além da validação do método, algumas modificações foram aplicadas, como exemplo na constituição de tampão (que se mostra fator determinante na análise destes compostos), na escolha de padrão interno, voltagem e temperatura de análise. Estes

parâmetros foram decisivos para o aperfeiçoamento da técnica, de forma a minimizar etapas de purificação, para que o acompanhamento do processo hidrolítico dos polissacarídeos fosse otimizado.

Todas as análises foram realizadas no mínimo em triplicatas e os seguintes parâmetros foram avaliados na validação do método: especificidade (ou seletividade), linearidade, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), exatidão (recuperação) e robustez. Os ensaios e resultados se adequaram às especificações presentes na RE 899/2003 (ANVISA - GUIA PARA VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS E BIOANALÍTICOS), ICH 2005 (Conferência internacional de harmonização) e AOAC INTERNATIONAL (Association of Analytical Communities).

O método de análise desenvolvido permite não somente a análise de *kappa*-oligossacarídeos com o tamanho de até seis unidades monossacarídicas (hexassacarídeo), mas também oligossacarídeos maiores (até 16 unidades monossacarídicas), os quais, como foi observado, são gerados durante processos de HAP e HRP. Como exemplos, nas figuras a seguir estão representados eletroferogramas obtidos de uma amostra de *kappa*-carragenana submetida à HAP (65°C por 30 minutos– figura 19) e HRP (65°C por 15 minutos– figura 20). Sendo assim, uma vez em posse de padrões, estes oligossacarídeos poderiam ser identificados e quantificados pela metodologia desenvolvida.

5.3.1 Especificidade (ou seletividade)

Este ensaio busca confirmar a capacidade do método de identificar corretamente um composto em presença de outros componentes, ditos interferentes. Os testes foram realizados comparando-se três soluções: uma contendo apenas oligossacarídeos purificados, diluídos em água, a outra contendo oligossacarídeos e meio reacional de hidrólise e a terceira composta apenas de meio de hidrólise, sem a presença dos oligossacarídeos. Por ser a mais crítica em relação à quantidade sal/oligossacarídeo, por utilizar 4BMM (agente redutor estável em meio ácido), a HRP (hidrólise redutiva parcial) foi escolhida (relação sal/carboidrato = 6,75).

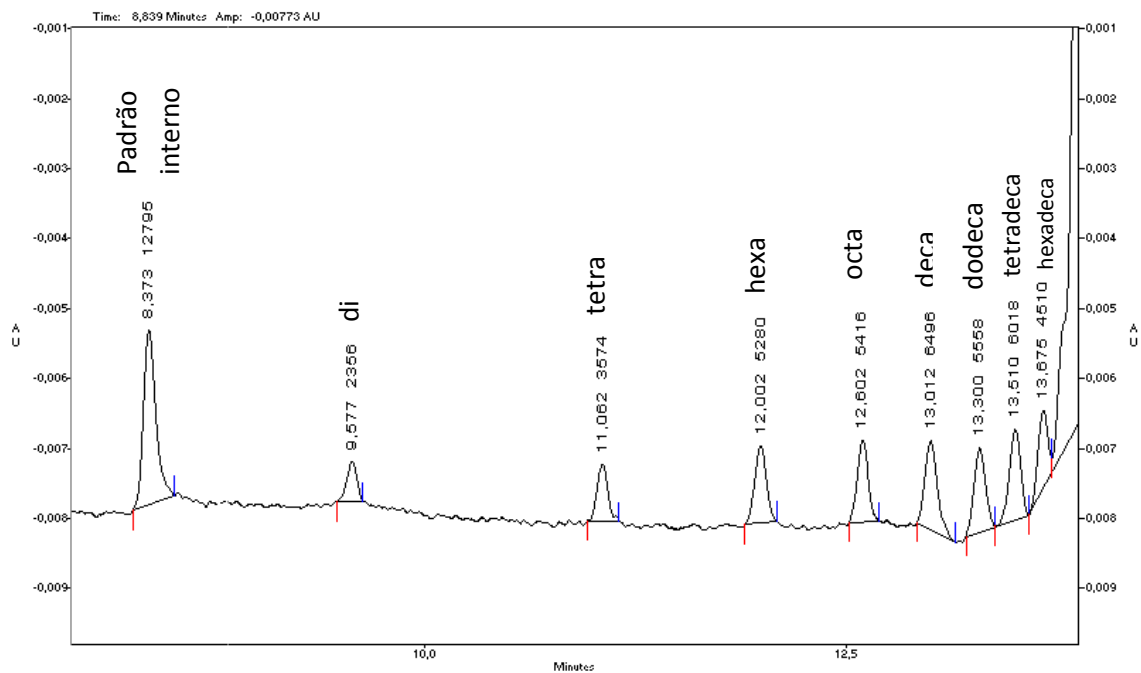


FIGURA 19 - ELETROFEROGRAMA CONTENDO *KAPPA*-OLIGOSSACARÍDEOS OBTIDOS VIA HAP DE *KAPPA*-CARRAGENANA (65°C POR 30 MINUTOS). Na figura, a primeira sequencia de números acima de cada pico faz referência ao tempo de retenção e a segunda sequência faz referência à área do pico.

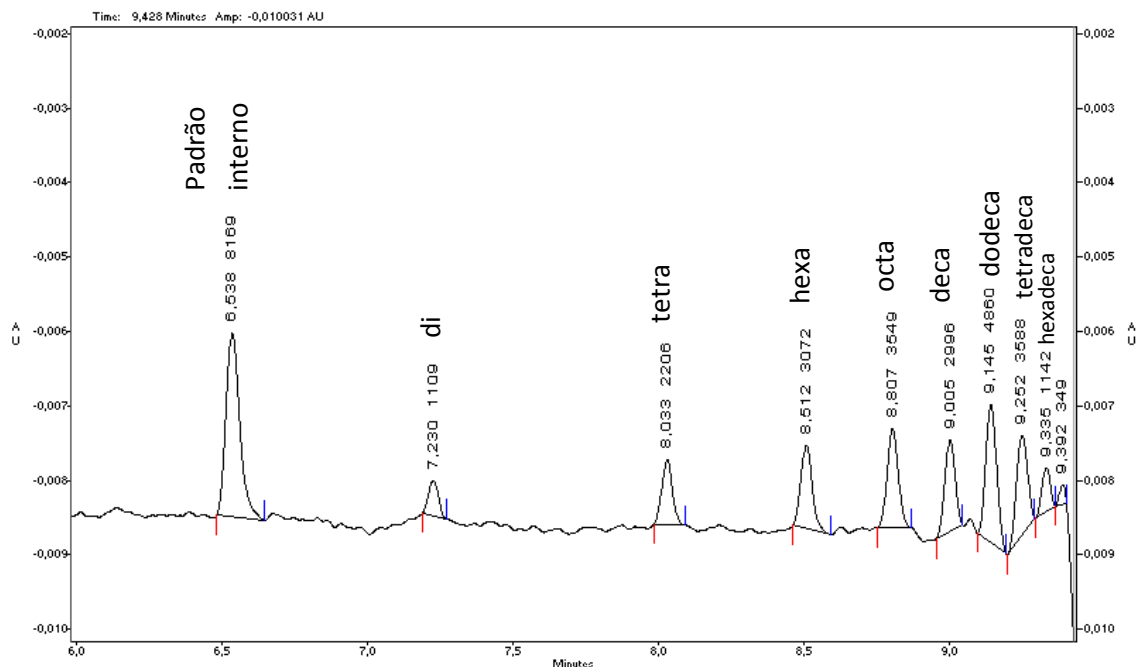


FIGURA 20 - ELETROFEROGRAMA CONTENDO *KAPPA*-OLIGOSSACARÍDEOS OBTIDOS VIA HRP DE *KAPPA*-CARRAGENANA (65°C POR 15 MINUTOS). Na figura, a primeira sequencia de números acima de cada pico faz referência ao tempo de retenção e a segunda sequência faz referência à área do pico.

Na figura 21 são apresentados três eletroferogramas sobrepostos. Em “A” temos o eletroferograma resultante da aplicação em E.C. da solução contendo padrão interno e oligossacarídeos padrões. Em “B” temos os produtos hidrólise (HRP, por 45 minutos), os quais foram submetidos apenas à centrifugação e filtração em membrana (0,22 μm). Em “C” é apresentado o eletroferograma resultante da aplicação em EC do meio de hidrólise (HRP). Estes procedimentos (centrifugação e filtração) são procedimentos padrões antes de qualquer análise pela técnica de EC.

É possível concluir que tanto oligossacarídeos isolados quanto oligossacarídeos presentes em meio de hidrólise são corretamente detectados pela metodologia desenvolvida, sendo que meio de hidrólise não interfere análise.

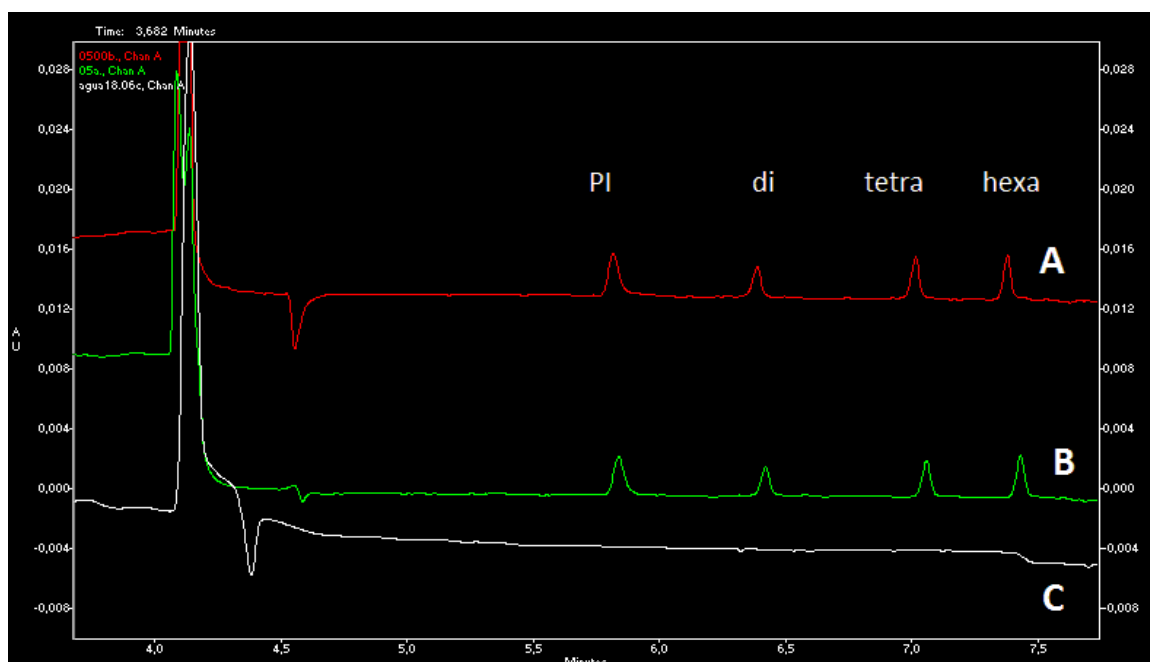


FIGURA 21 - ELETROFEROGRAMAS SOBREPOSTOS OBTIDOS NO ENSAIO DE ESPECIFICIDADE. A-OLIGOSSACARÍDEOS DISSOLVIDOS EM ÁGUA. B-OLIGOSSACARÍDEOS EM MEIO DE HIDRÓLISE (HRP). C-AMOSTRA CONTENDO APENAS MEIO DE HIDRÓLISE (HRP).

5.3.2 Linearidade

A linearidade foi determinada conforme recomendações do ICH e realizada conforme item 5.2.5. O ensaio de linearidade, os valores de R^2 e a equação de reta para cada oligossacarídeo estão representados na figura 22.

Destaca-se que segundo a RE899, o mínimo valor aceitável de coeficiente de correlação (R^2) é 0,99 (quanto maior este valor, maior a probabilidade de acerto quando relacionamos eixos x e y). Os valores de R^2 obtidos (0,9992, 0,9994 e 0,9995 para o dissacarídeo, tetrassacarídeo e hexassacarídeo, respectivamente) foram maiores do que 0,999, indicando alta correlação entre os eixos. As equações de reta obtidas para o dissacarídeo, tetrassacarídeo e hexassacarídeo foram: $y = 1,1x + 0,016$, $y = 1,4718x + 0,0065$ e $y = 1,6951x - 0,0296$, respectivamente.

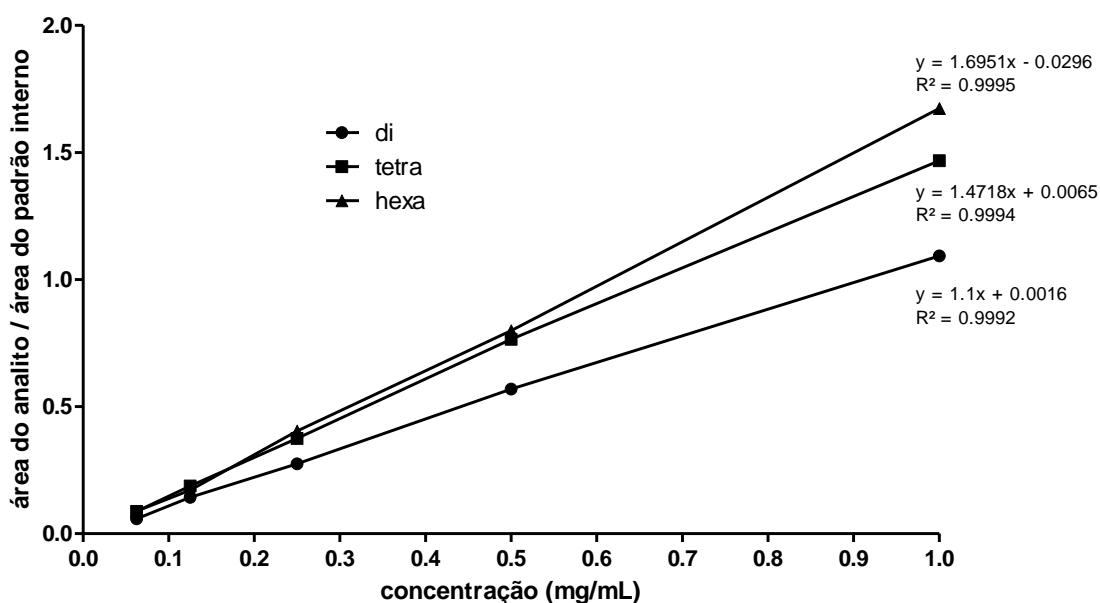


FIGURA 22 - LINEARIDADE DO MÉTODO

5.3.3. Precisão

O ensaio de precisão foi realizado em dois níveis: repetibilidade e precisão intermediária. A avaliação da precisão usualmente se dá com base no DPR% (desvio padrão percentual), sendo que a RE899 considera adequados valores inferiores a 5%.

5.3.3.1 – Repetibilidade

O ensaio de repetibilidade (ou ensaio intra-dia) foi realizado conforme determinações do ICH, ou seja, nove determinações cobrindo todo o intervalo da curva de linearidade (triplicata de três concentrações diferentes).

A repetibilidade é avaliada através do cálculo de RSD (ou DPR), ou seja, desvio padrão percentual. A RE899 sugere valores de DPR inferiores a 5%. O maior valor encontrado em nossas análises foi 2,25%, portanto, todas as avaliações realizadas neste ensaio satisfazem o critério (tabela 7).

TABELA 7 - ENSAIO DE REPETIBILIDADE

triplicata	Concentração (mg/mL)											
	1,000				0,500				0,0625			
	Pi ¹	di	tetra	hexa	Pi	di	tetra	hexa	Pi	di	tetra	hexa
a	8660	9632	12844	14327	7536	4470	5768	6250	7306	370	520	601
b	8422	8984	12388	13830	7350	4243	5724	5906	7627	394	563	655
c	8463	9152	12481	13916	7840	4480	5873	6336	7576	380	560	630
	áreas corrigidas ²			áreas corrigidas			áreas corrigidas					
a		1,112	1,483	1,654		0,593	0,765	0,829		0,051	0,071	0,082
b		1,067	1,471	1,642		0,577	0,779	0,804		0,052	0,074	0,086
c		1,081	1,475	1,644		0,571	0,749	0,808		0,050	0,074	0,083
Stddev ³		0,023	0,006	0,007		0,011	0,015	0,014		0,001	0,002	0,002
média		1,087	1,476	1,647		0,581	0,764	0,814		0,051	0,073	0,084
RSD		2,14	0,42	0,40		1,94	1,94	1,69		1,51	2,13	2,25

¹Pi = padrão interno (eritritol). ²áreas corrigidas = relação entre a área da amostra e área do padrão interno. ³stddev = desvio padrão.

5.3.3.2 – Precisão intermediária (inter-dia)

Esta análise foi realizada em dois dias consecutivos, os valores obtidos no dia 2 foram utilizados no ensaio de repetibilidade. Em cada dia, soluções de rinsagem e tampão foram preparadas e as amostras foram analisadas sob as mesmas condições.

Assim como no ensaio de repetibilidade, valores de RSD menores do que 5% foram encontrados quando comparadas as análises entre o primeiro e segundo dia, sendo o maior valor igual a 2,93 (tabela 8).

Além do cálculo de RSD, no ensaio de precisão intermediária foi aplicado o teste *student t test*. O teste, através da comparação entre as médias, foi capaz de indicar que todas as análises, nas três concentrações avaliadas, foram estatisticamente aprovadas. Esta conclusão é dada pelo valor de p calculado no teste ser superior a 0,05 (tabela 5), aceitando-se assim a hipótese de que as médias são equivalentes. Isto indica que as análises realizadas em dias diferentes, não são capazes de interferir estatisticamente nos resultados obtidos.

TABELA 8 - ENSAIO DE PRECISÃO INTERMEDIÁRIA

	1,000 mg/mL - área DIA 1				1,000 mg/mL - área DIA 2				0,500 mg/mL - área DIA 1				0,500 mg/mL - área DIA 2				0,0625 mg/mL - área DIA 1				0,0625 mg/mL - área DIA 2			
	Pi ¹	di	tetra	hexa	Pi	di	tetra	hexa	Pi	di	tetra	hexa	Pi	di	tetra	hexa	Pi	di	tetra	hexa	Pi	di	tetra	hexa
triplicata																								
a	8715	9826	13002	14800	8660	9632	12844	14327	7815	4482	6048	6321	7536	4470	5768	6250	7306	352	520	650	7306	370	520	601
b	8422	9133	12437	14281	8422	8984	12388	13830	8420	4691	6524	6580	7350	4243	5724	5906	7627	394	563	655	7627	394	563	655
c	8760	9354	13300	15232	8463	9152	12481	13916	7775	4482	5996	6266	7840	4480	5873	6336	7695	380	580	641	7576	380	560	630
a- corrigido ²	1,127	1,492	1,698		1,112	1,483	1,654		0,574	0,774	0,809		0,593	0,765	0,829		0,048	0,071	0,089		0,051	0,071	0,082	
b- corrigido	1,084	1,477	1,696		1,067	1,471	1,642		0,557	0,775	0,781		0,577	0,779	0,804		0,052	0,074	0,086		0,052	0,074	0,086	
c- corrigido	1,068	1,518	1,739		1,081	1,475	1,644		0,576	0,771	0,806		0,571	0,749	0,808		0,049	0,075	0,083		0,050	0,074	0,083	
Stddev ³	0,031	0,021	0,024		0,023	0,006	0,007		0,010	0,002	0,015		0,011	0,015	0,014		0,002	0,002	0,003		0,001	0,002	0,002	
média	1,093	1,496	1,711		1,087	1,476	1,647		0,569	0,773	0,799		0,581	0,764	0,814		0,050	0,073	0,086		0,051	0,073	0,084	
RSD	2,82	1,41	1,41		2,14	0,42	0,40		1,83	0,24	1,88		1,94	1,94	1,69		3,55	2,89	3,30		1,51	2,13	2,25	

	Inter- dia - 1,000 mg/mL						inter-dia 0,500 mg/mL						inter-dia 0,0625 mg/mL							
	Inter dia - 1 mg/mL			t test (p) - 1,000 mg/mL			Inter dia - 0,500 mg/mL			t test (p) - 0,500 mg/mL			Inter dia - 0,0625 mg/mL			t test (p) - 0,0625 mg/mL				
	di	tetra	hexa	di	tetra	hexa	di	tetra	hexa	di	tetra	hexa	di	tetra	hexa	di	tetra	hexa		
Stddev**	0,025	0,017	0,038				stddev	0,012	0,011	0,015				stddev	0,001	0,002	0,002			
média	1,09	1,486	1,679	0,587	0,251	0,054	media	0,575	0,769	0,806	0,298	0,359	0,143	media	0,05	0,073	0,085	0,276	0,423	0,41
RSD	2,26	1,18	2,29				RSD %	2,02	1,39	1,89				RSD %	2,69	2,30	2,93			

¹Pi = padrão interno (eritritol). ²corrigido = relação entre a área da amostra e área do padrão interno. ³stddev = desvio padrão

5.3.4 – Ensaio de exatidão (recuperação)

Quantidades conhecidas dos oligossacarídeos padrões (F-k2dNa, F-k4dNa e F-k6dna) foram adicionadas à uma solução contendo apenas meio de hidrólise (chamada amostra branco) e submetidas à análise em EC. Para que não ocorresse hidrólise dos oligossacarídeos, a solução de hidrólise foi submetida à liofilização antes da adição dos oligossacarídeos (para volatilização do TFA).

O ensaio de exatidão foi realizado utilizando-se análises em triplicata de três concentrações de oligossacarídeos padrões: 0,0625; 0,500 e 1,000 mg/mL, contemplando toda a faixa da linearidade do método, conforme recomendação de ICH e ANVISA.

Após análise das amostras em EC e através da aplicação da equação de reta (ver item 5.3.2), foi possível estimar se a quantidade calculada (recuperada) pelo método era equivalente àquela adicionada propositalmente na amostra (tabela 9).

TABELA 9 - ENSAIO DE RECUPERAÇÃO – CÁLCULO DAS CONCENTRAÇÕES EXPERIMENTAIS

triplicata	Concentrações (mg/mL)											
	1,000				0,500				0,0625			
	Pi ¹	di	tetra	hexa	Pi	di	tetra	hexa	Pi	di	tetra	hexa
a	8546	9877	12534	13654	7613	4413	5518	6236	8415	534	798	698
b	8755	9987	12885	14098	8098	4550	5802	6450	8233	510	776	702
c	8699	9927	12789	13998	8295	4730	5966	6568	8315	517	777	698
a – corrigido ²		1,156	1,467	1,598		0,580	0,725	0,819		0,063	0,095	0,083
b – corrigido		1,141	1,472	1,610		0,562	0,716	0,796		0,062	0,094	0,085
c – corrigido		1,141	1,470	1,609		0,570	0,719	0,792		0,062	0,093	0,084
concentração experimental (mg/mL)		1,049	0,992	0,960		0,526	0,488	0,501		0,056	0,060	0,066
		1,036	0,996	0,967		0,509	0,482	0,487		0,055	0,060	0,068
		1,036	0,994	0,967		0,517	0,484	0,485		0,055	0,059	0,067

¹Pi = padrão interno (eritritol). ²corrigido = relação entre a área da amostra e área do padrão interno

A partir da concentração experimental, calculou-se o índice de recuperação das amostras, relacionando-se concentrações nominais e as concentrações obtidas através das leituras experimentais para cada oligossacarídeo (tabela 10). A recuperação foi calculada para cada concentração testada, para cada tipo de

oligossacarídeo (média das recuperações obtidas nas diferentes concentrações) e também de forma geral (média da recuperação dos três oligossacarídeos).

TABELA 10 - ENSAIO DE RECUPERAÇÃO – CÁLCULO DAS RECUPERAÇÕES MÉDIAS

		Dissacarídeo		Tetrassacarídeo			Hexassacarídeo			Média Recuperação por concentração (%)
Conc. Nominal (mg/mL)	Conc. experimentais (mg/mL)	Média (mg/mL)	Recuperação (%)	Conc. experimentais (mg/mL)	Média (mg/mL)	Recuperação (%)	Conc. experimentais (mg/mL)	Média (mg/mL)	Recuperação (%)	
	0,056			0,060			0,066			
0,0625	0,062	0,060	96,19	0,060	0,060	95,31	0,068	0,067	107,28	99,59
	0,062			0,059			0,067			
	0,526			0,488			0,501			
0,500	0,509	0,517	103,45	0,482	0,485	96,98	0,487	0,491	98,17	99,53
	0,507			0,484			0,485			
	1,049			0,992			0,960			
1,000	1,036	1,040	104,03	0,996	0,994	99,40	0,967	0,965	96,47	99,97
	1,036			0,994			0,967			
Média de recuperação por oligo (%)			101,23				97,23	100,64		
Média de recuperação geral (%)						99,70				

Existem várias metodologias para de verificação de exatidão de um método, e, com isso, vários valores de referência (intervalos de aceitação) para ensaios de recuperação, com valores variando de mínimo 70 e máximo 130 % (BRITO, 2002). O mais aceitável, no entanto, é que o valor da faixa se recuperação seja variável, em função da concentração do analito, onde quanto maior quantidade de analito a ser analisada pelo método, mais rígido é o intervalo de aceitação (BRITO 2002; AOAC,1993). Os valores de recuperação considerados adequados, quando em relação à concentração do analito (AOAC, 1993), estão representados na tabela 11.

Com base na tabela 11 e considerando o método desenvolvido neste trabalho, onde quantidades de 0,0625 mg/mL de oligossacarídeos são quantificadas, a faixa aceitável de recuperação é de 80 a 110 %. Todos os valores das médias obtidas no ensaio de recuperação atendem esta especificação.

TABELA 11 - RECUPERAÇÃO DO ANALITO EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO

Concentração do analito (%)	Intervalo de recuperação aceito (%)
≥ 10	98 – 102
≥ 1	97 – 103
≥ 0,1	95 – 105
≥ 0,01	90 – 107
≥ 0,001 - ≥ 0,00001	80 – 110
≥ 0,000001	60 – 115
≥ 0,00000001	40 - 120

FONTE: AOAC,1993

5.3.5 - Ensaio de robustez

O ensaio de robustez tem como objetivo medir a capacidade do método em resistir a pequenas variações, deliberadamente introduzidas nos parâmetros do método. É um indicativo da confiança do método durante a sua aplicação de forma rotineira (BRASIL, 2003). Cada parâmetro é avaliado em um intervalo de ± 5 -10% do valor estipulado para o método (ALTRIA, 1996) e a robustez pode ser avaliada através da comparação da precisão obtida frente a cada uma das variações (Ribani, 2004).

O ensaio foi realizado em três concentrações diferentes de oligossacarídeos, os quais foram submetidos a análises com variações na concentração de tampão (tabela 12) e valor de temperatura (tabela 13), ambos $\pm 10\%$ do valor estipulado para o método.

Para a avaliação dos resultados, foi utilizado, assim como no teste de precisão intermediária, o *student T test* (teste t). Nas tabelas de resultados do ensaio de robustez, a coluna “T test” compara as médias das áreas de dois experimentos: o primeiro obtido com a condição normal do método, o segundo seria a média obtida em condições em que foram introduzidas mudanças no método. A partir do valor retornado pelo teste t (todos os valores superiores a 0,05), podemos verificar que as médias são estatisticamente equivalentes, e assim concluir que as mudanças introduzidas não afetaram os resultados de área de forma significativa.

Para este ensaio também foi avaliado o comportamento do tempo de retenção dos oligossacarídeos frente às mudanças introduzidas no método. Assim, avaliando

também a precisão do método, foi feito o cálculo da área corrigida (A) dividida pelo valor do tempo de retenção relativo (T), obtendo A/T. Nestes resultados aplicou-se o DPR considerando os valores de A/T obtidos nos ensaios em condições normais e valores de A/T obtidos nos ensaios com variação.

TABELA 12 - ENSAIO DE ROBUSTEZ EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DO TAMPÃO $\pm 10\%$

		di					tetra					hexa				
		A ¹	T ²	A/T	DPR A/T	T _{test}	A	T	A/T	DPR A/T	T _{test}	A	T	A/T	DPR A/T	T _{test}
tampão + 10 %	0,0625 mg/mL	0,0614	1,11	0,055			0,0879	1,20	0,073			0,0798	1,27	0,063		
		0,0612	1,11	0,055	3,35	0,44	0,0915	1,22	0,075	2,99	0,21	0,0824	1,29	0,064	2,61	0,09
		0,0583	1,10	0,053			0,0928	1,21	0,077			0,0791	1,26	0,063		
	0,500 mg/mL	0,5979	1,10	0,546			0,8214	1,20	0,682			0,7626	1,27	0,602		
		0,6115	1,09	0,562	3,61	0,09	0,8115	1,21	0,673	3,15	0,09	0,7456	1,27	0,586	2,93	0,78
		0,5685	1,10	0,518			0,7769	1,21	0,643			0,7065	1,27	0,556		
	1,000 mg/mL	1,1685	1,10	1,064			1,5080	1,21	1,248			1,5342	1,27	1,206		
		1,1404	1,10	1,036	2,64	0,44	1,4940	1,21	1,232	1,81	0,13	1,5552	1,28	1,218	3,00	0,61
		1,1065	1,10	1,005			1,4590	1,21	1,204			1,5269	1,28	1,195		
tampão de trabalho	0,0625 mg/mL	0,0642	1,09	0,059			0,0883	1,20	0,074			0,0835	1,25	0,067		
		0,0600	1,09	0,055			0,0854	1,20	0,071			0,0836	1,26	0,066		
		0,0603	1,10	0,055			0,0855	1,21	0,071			0,0809	1,27	0,064		
	0,500 mg/mL	0,5785	1,10	0,528			0,7682	1,20	0,639			0,7318	1,27	0,578		
		0,5823	1,10	0,530			0,7716	1,21	0,640			0,7627	1,27	0,601		
		0,5602	1,10	0,509			0,7633	1,21	0,633			0,7388	1,27	0,581		
	1,000 mg/mL	1,0968	1,10	1,000			1,4693	1,21	1,219			1,4389	1,27	1,132		
		1,0906	1,10	0,993			1,4330	1,20	1,190			1,5214	1,27	1,199		
		1,1380	1,10	1,030			1,4491	1,21	1,199			1,5789	1,28	1,238		
tampão - 10%	0,0625 mg/mL	0,0619	1,09	0,057			0,0814	1,21	0,067			0,0797	1,28	0,062		
		0,0619	1,10	0,056	2,71	0,63	0,0814	1,21	0,067	3,44	0,23	0,0768	1,28	0,060	3,85	0,17
		0,0635	1,10	0,058			0,0856	1,22	0,070			0,0803	1,28	0,063		
	0,500 mg/mL	0,5830	1,11	0,525			0,8275	1,22	0,680			0,7832	1,30	0,603		
		0,6141	1,10	0,558	3,11	0,15	0,7996	1,22	0,657	2,91	0,11	0,7664	1,28	0,597	1,95	0,15
		0,6058	1,12	0,542			0,7807	1,24	0,631			0,7883	1,31	0,604		
	1,000 mg/mL	1,1333	1,11	1,020			1,5208	1,23	1,239			1,5953	1,29	1,233		
		1,1444	1,11	1,028	1,59	0,26	1,5687	1,23	1,274	2,65	0,08	1,6201	1,30	1,250	3,59	0,16
		1,1318	1,10	1,030			1,5218	1,21	1,254			1,5931	1,30	1,230		

¹A = área corrigida. ²T = tempo de retenção relativo

Não existe uma faixa teórica aceitável para valores de robustez, visto que o objetivo do ensaio é apontar a criticidade de certos parâmetros para o método. O ICH recomenda este ensaio durante a fase de desenvolvimento do método, porém não agrupa o ensaio de robustez em sua lista de parâmetros típicos a serem

apresentados em uma validação. Usualmente, quando as mudanças provocadas nos parâmetros gerarem resultados dentro do limite de precisão do método, este será considerado robusto (RIBANI *et al.*, 2004).

Quando verificados os DRP obtidos, percebe-se que a alteração na concentração do tampão não afetou significativamente a quantificação e o tempo de retenção dos oligossacarídeos, pois a precisão do método foi mantida (DRP <5,00%), o mesmo ocorrendo quando a alteração foi de $\pm 10\%$ nos parâmetros de temperatura.

TABELA 13 - ENSAIO DE ROBUSTEZ EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA $\pm 10\%$

	di					tetra					hexa					
	A ¹	T ²	A/T	DPR A/T	T _{test}	A	T	A/T	DPR A/T	T _{test}	A	T	A/T	DPR A/T	T _{test}	
Tempe- ratura + 10 %	0,0625 mg/mL	0,0496	1,12	0,044			0,0798	1,25	0,064			0,0762	1,32	0,058		
		0,0497	1,11	0,045	2,55	0,21	0,0820	1,22	0,067	2,37	0,12	0,0782	1,29	0,060	3,93	0,33
		0,0527	1,13	0,047			0,0790	1,25	0,063			0,0752	1,32	0,057		
	0,500 mg/mL	0,6595	1,12	0,588			0,8577	1,26	0,681			0,7793	1,33	0,587		
		0,6403	1,10	0,580	3,05	0,18	0,8673	1,23	0,704	2,37	0,14	0,8089	1,31	0,617	1,88	0,13
		0,6650	1,12	0,592			0,8334	1,25	0,667			0,7782	1,32	0,591		
	1,000 mg/mL	1,2709	1,12	1,132			1,5917	1,24	1,289			1,6737	1,31	1,282		
		1,2652	1,12	1,134	1,84	0,42	1,6572	1,24	1,335	2,90	0,18	1,6857	1,31	1,286	2,62	0,13
		1,2581	1,11	1,136			1,6399	1,24	1,319			1,6686	1,31	1,272		
Tempe- ratura de trabalho	0,0625 mg/mL	0,0477	1,09	0,044			0,0779	1,20	0,065			0,0791	1,25	0,063		
		0,0494	1,09	0,045			0,0757	1,20	0,063			0,0773	1,26	0,061		
		0,0482	1,10	0,044			0,0764	1,21	0,063			0,0780	1,27	0,062		
	0,500 mg/mL	0,6361	1,10	0,580			0,7918	1,20	0,658			0,7683	1,27	0,607		
		0,6285	1,10	0,572			0,8331	1,21	0,691			0,7725	1,27	0,609		
		0,5973	1,10	0,543			0,8206	1,21	0,680			0,7648	1,27	0,602		
	1,000 mg/mL	1,2864	1,10	1,173			1,5701	1,21	1,303			1,5376	1,27	1,209		
		1,2339	1,10	1,124			1,4765	1,20	1,226			1,5677	1,27	1,236		
		1,2275	1,10	1,111			1,5606	1,21	1,292			1,6487	1,28	1,292		
Tempe- ratura - 10%	0,0625 mg/mL	0,0475	1,11	0,043			0,0785	1,21	0,065			0,0746	1,29	0,058		
		0,0486	1,12	0,043	2,90	0,23	0,0741	1,23	0,060	2,66	0,44	0,0776	1,30	0,060	2,98	0,47
		0,0457	1,10	0,041			0,0757	1,21	0,063			0,0781	1,30	0,060		
	0,500 mg/mL	0,6408	1,12	0,572			0,8541	1,24	0,689			0,8076	1,31	0,615		
		0,6447	1,10	0,584	2,58	0,20	0,8462	1,24	0,683	2,23	0,11	0,7817	1,30	0,602	1,83	0,12
		0,6398	1,10	0,579			0,8727	1,24	0,704			0,8200	1,30	0,631		
	1,000 mg/mL	1,2682	1,10	1,156			1,5932	1,21	1,311			1,6021	1,28	1,248		
		1,2190	1,11	1,102	2,39	0,87	1,5331	1,23	1,248	2,67	0,46	1,6809	1,30	1,290	2,57	0,24
		1,2527	1,10	1,134			1,5408	1,22	1,259			1,6421	1,30	1,265		

¹A = área corrigida. ²T = tempo de retenção relativo

5.4 COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS POR HIDRÓLISE REDUTIVA PARCIAL (HRP) E HIDRÓLISE ÁCIDA PARCIAL (HAP) EM TERMOS DE PRODUÇÃO DE OLIGOSSACARÍDEOS OBTIDOS A PARTIR DA *KAPPA-CARRAGENANA* DE *Kappaphycus alvarezii*

Após a definição dos parâmetros e conclusão da validação do método, o processo hidrolítico dos oligossacarídeos de *Kappaphycus alvarezii* (*kappa-carragenana*) foi analisado via EC.

Para comparação, em termos de produção de oligossacarídeos, quantidades iguais de polissacarídeos foram submetidas a dois tipos de hidrólise: HRP e HAP. As hidrólises foram, a partir de uma solução-mãe, fracionadas em vias e conduzidas em forma de curva de hidrólise, sendo que os vias contendo oligossacarídeos eram submetidos a banho-maria a 65 °C e retirados em tempos específicos. Em seguida, as alíquotas foram analisadas via EC, para determinação da quantidade de oligossacarídeos produzidos.

Os seguintes tempos foram utilizados na curva HRP: 15; 30; 60; 120; 180; 240; 480; 1080 minutos e na curva HAP: 1; 15; 30; 45; 60; 120; 240 e 360 minutos. O experimento foi realizado em triplicata, ou seja, para cada tempo de coleta, três amostras independentes – a, b e c - (obtidas da mesma solução mãe) estavam sendo hidrolisadas (figura 23). Cada produto de hidrólise parcial foi analisado em EC também em triplicata.

Ao final de cada tempo de hidrólise, as amostras provenientes de HRP e HAP foram processadas da seguinte maneira (figura 24A): adição de 0,5 mL de água ao meio reacional, adição de padrão interno (50µL de solução 1,25 mg/50 µL), congelamento e liofilização. Em seguida, o material liofilizado foi suspenso em 0,500 mL de água ultrapura. Neste ponto, as amostras obtidas por HAP, por serem oligossacarídeos com extremidades redutoras (aldeído hidratado), foram submetidas à redução. Esta etapa é dispensada nas amostras obtidas por HRP, visto que, devido a adição do agente redutor (4-MMB) diretamente ao meio de hidrólise, as unidades 3,6-anidro-galactosídicas destes oligossacarídeos se encontram já na forma alditol. Após esta etapa, as amostras foram centrifugadas e filtradas. As soluções filtradas, após diluição, foram analisadas em EC.

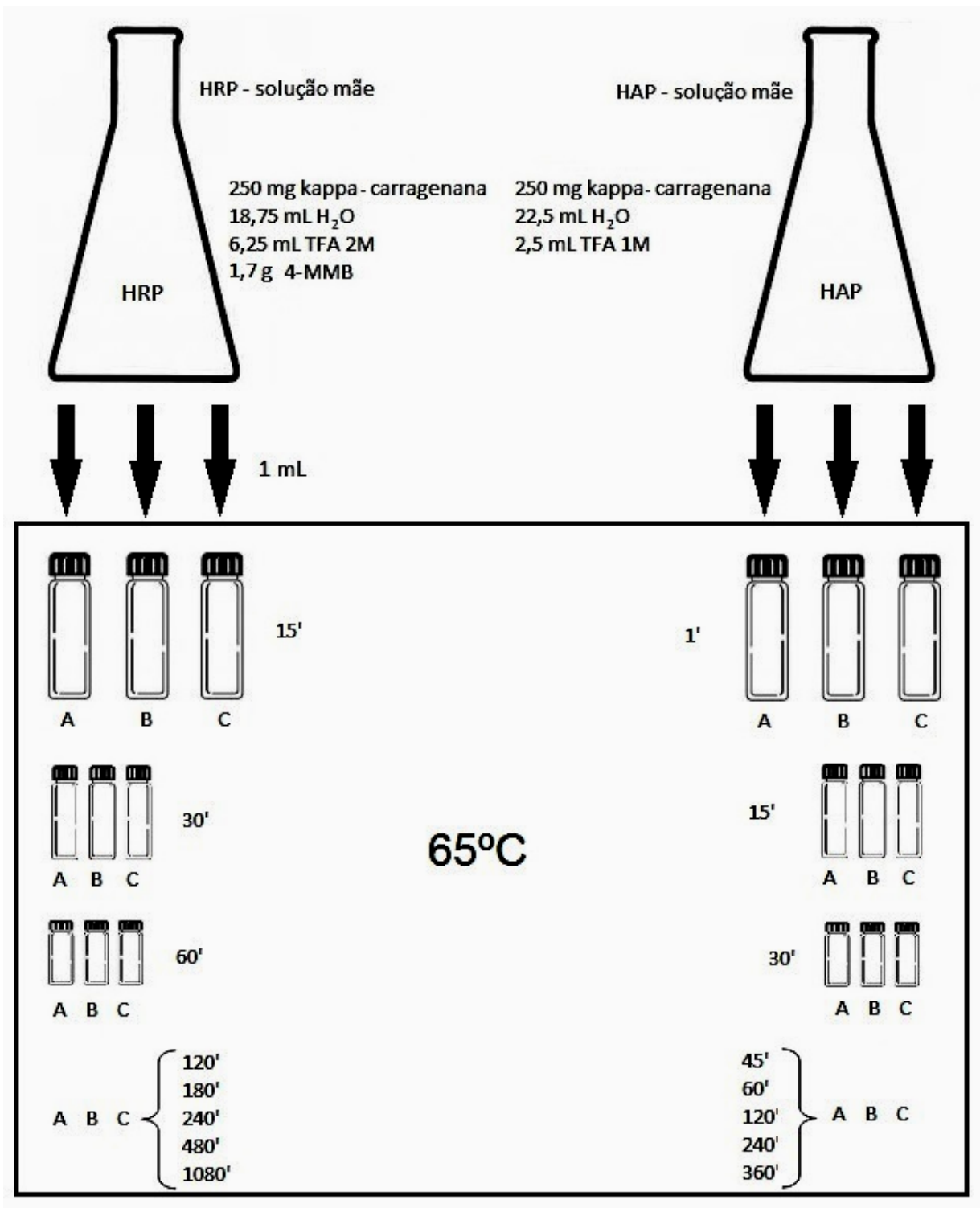


FIGURA 23 - ESQUEMA DE PREPARO DAS CURVAS DE HIDRÓLISE

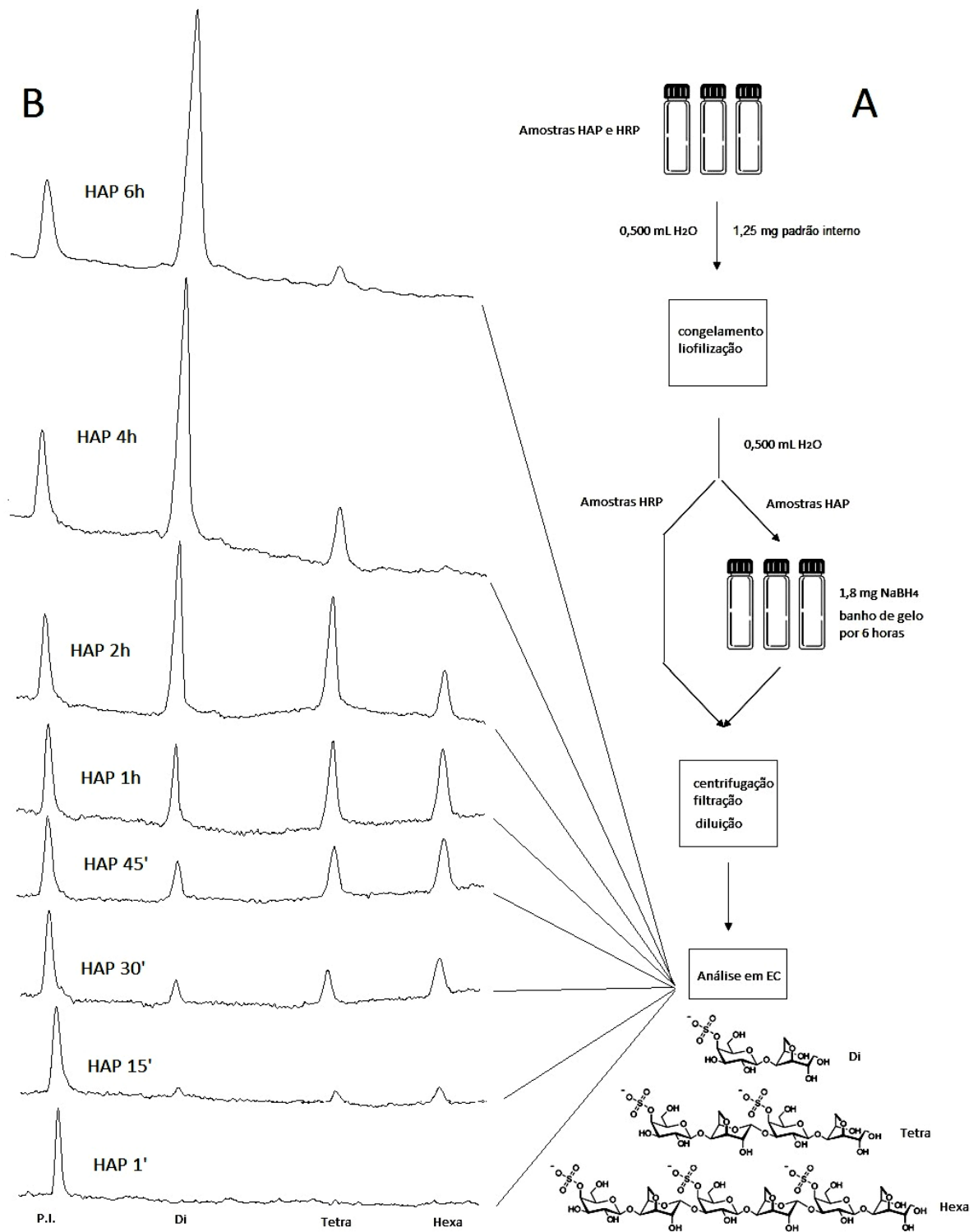


FIGURA 24 - A - PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS DA CURVA DE HIDRÓLISE OBTIDA POR HAP E HRP E ANÁLISE EM EC. B - eletroferogramas sobrepostos da curva obtida por HAP.

Através da equação de reta obtida no ensaio de linearidade, as concentrações dos oligossacarídeos foram calculadas a partir das áreas obtidas nos eletroferogramas. Os resultados estão representados na tabela 14 e figuras 25 e 26.

TABELA 14 - PRODUÇÃO DE OLIGOSSACARÍDEOS POR HRP E HAP

	Dissacarídeo				Tertrassacarídeo				Hexassacarídeo				soma (%)	
	tempo (min)	exp A (%)	exp B (%)	exp C (%)	média (%)	exp A (%)	exp B (%)	exp C (%)	média (%)	exp A (%)	exp B (%)	exp C (%)		média (%)
HRP	15	3,70	3,66	4,48	3,95	5,44	4,72	6,42	5,53	4,92	5,15	5,47	5,18	14,66
	30	10,14	10,01	8,32	9,49	11,08	11,80	9,52	10,80	9,05	10,10	7,50	8,88	29,17
	60	20,49	18,67	22,38	20,51	15,32	14,73	15,51	15,19	11,20	11,43	10,00	10,88	46,58
	120	25,96	24,43	24,65	25,01	20,03	16,29	15,32	17,21	10,83	8,14	7,76	8,91	51,14
	180	28,99	21,70	28,57	26,42	19,40	13,66	15,12	16,06	8,01	6,52	6,71	7,08	49,56
	240	28,93	28,97	29,60	29,17	14,44	13,22	13,78	13,81	6,52	5,81	5,69	6,00	48,99
	480	29,44	30,64	29,67	29,92	14,39	16,02	17,72	16,04	5,68	6,11	6,43	6,07	52,03
	1080	22,01	27,10	27,13	25,41	13,25	12,71	15,00	13,65	5,60	5,74	7,53	6,29	45,36
HAP	1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	15	1,20	1,07	1,32	1,20	1,39	1,40	1,20	1,33	1,65	1,74	1,23	1,54	4,07
	30	4,33	7,19	5,24	5,59	4,64	7,88	6,40	6,31	5,71	7,92	6,61	6,75	18,64
	45	9,13	10,54	13,25	10,97	11,19	11,03	15,16	12,46	10,70	11,55	12,96	11,74	35,17
	60	18,08	18,57	16,23	17,62	18,66	17,61	16,17	17,48	13,91	14,50	12,62	13,68	48,78
	120	46,65	39,82	35,62	40,70	23,58	24,96	21,48	23,34	8,76	7,59	7,15	7,84	71,88
	240	58,68	61,37	68,74	62,93	10,65	10,32	13,35	11,44	0,00	0,00	0,00	0,00	74,37
	360	77,66	74,99	75,09	75,91	2,68	3,37	3,28	3,11	0,00	0,00	0,00	0,00	79,02

As porcentagens são calculadas com base na massa de polissacarídeo submetida à hidrólise. Soma é calculada como o somatório da quantidade dos três oligossacarídeos produzidos em determinado tempo. Valores em negrito representam o maior valor obtido

Comparando-se os processos de HAP e HRP, é possível inferir da tabela e das curvas que a produção de oligossacarídeos se comporta de maneira distinta. Apesar de certa similaridade até cerca de 60 minutos, o processo de HRP apresenta-se estagnado após este período, com discreto aumento na produção do dissacarídeo e pequena variação nos demais oligossacarídeos. Já no processo de HAP, a formação do dissacarídeo aumenta consideravelmente em função do tempo, sugerindo que oligossacarídeos maiores vão sendo hidrolisados gerando oligossacarídeos com menor grau de polimerização.

No processo de obtenção de oligossacarídeos a partir de *kappa*-carragenana via HRP, temos produção de oligossacarídeos estabilizada no tempo de 120 minutos. Porém caso o alvo da hidrólise seja um hexassacarídeo por exemplo, o

melhor tempo seria o de 60 minutos, no qual cerca de 10 % da massa de polissacarídeo se encontraria neste grau de polimerização. Já para a obtenção de tetrassacarídeos e dissacarídeos, o tempo de 120 e 480 minutos, respectivamente, seriam os ideais.

No processo de obtenção de oligossacarídeos via HAP, temos a produção máxima de oligossacarídeos no tempo de 360 minutos, no qual 79 % do polissacarídeo original se encontra hidrolisado, sendo este o melhor tempo para a obtenção do dissacarídeo. O melhor tempo de hidrólise via HAP para obtenção de hexassacarídeos foi o de 60 minutos de hidrólise, no qual estes representam 13,7 % da massa submetida à hidrólise. O tetrassacarídeo foi obtido em maior quantidade (23,3%) com 120 minutos de hidrólise ácida parcial.

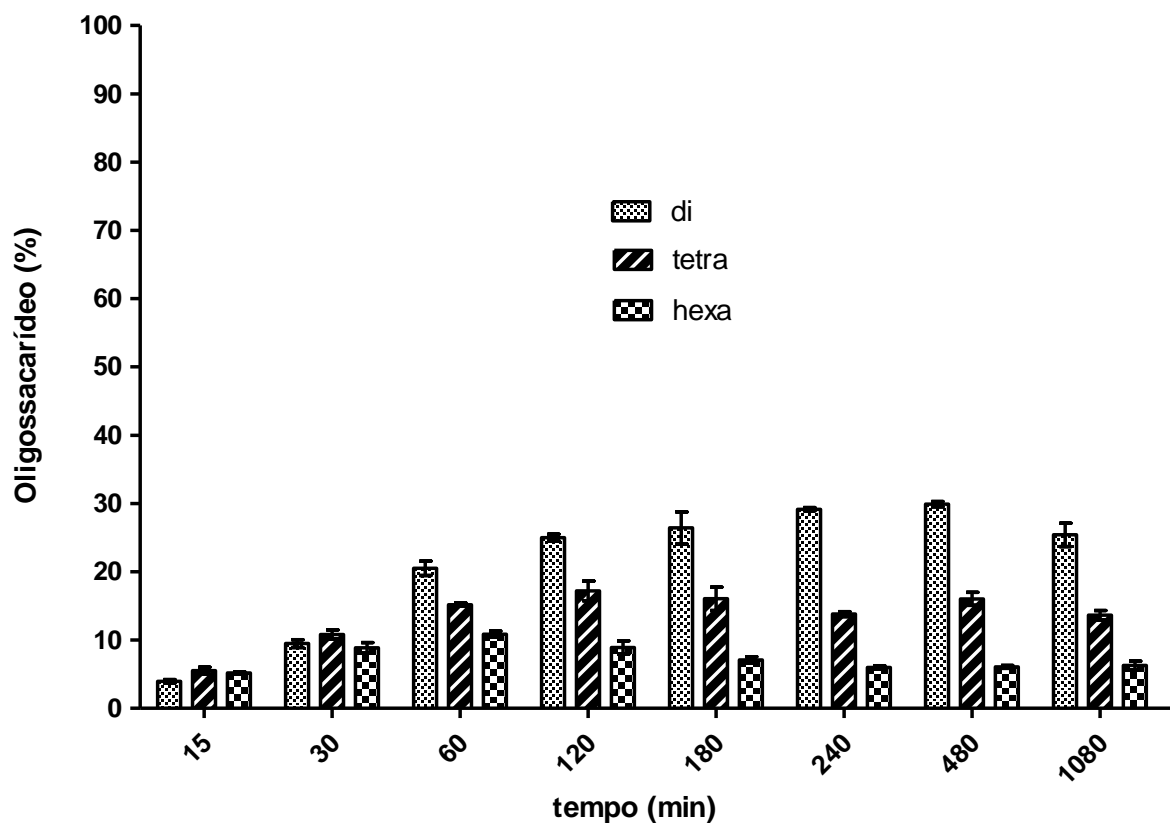


FIGURA 25 - CURVA DE OLIGOSSACARÍDEOS PRODUZIDOS POR HRP

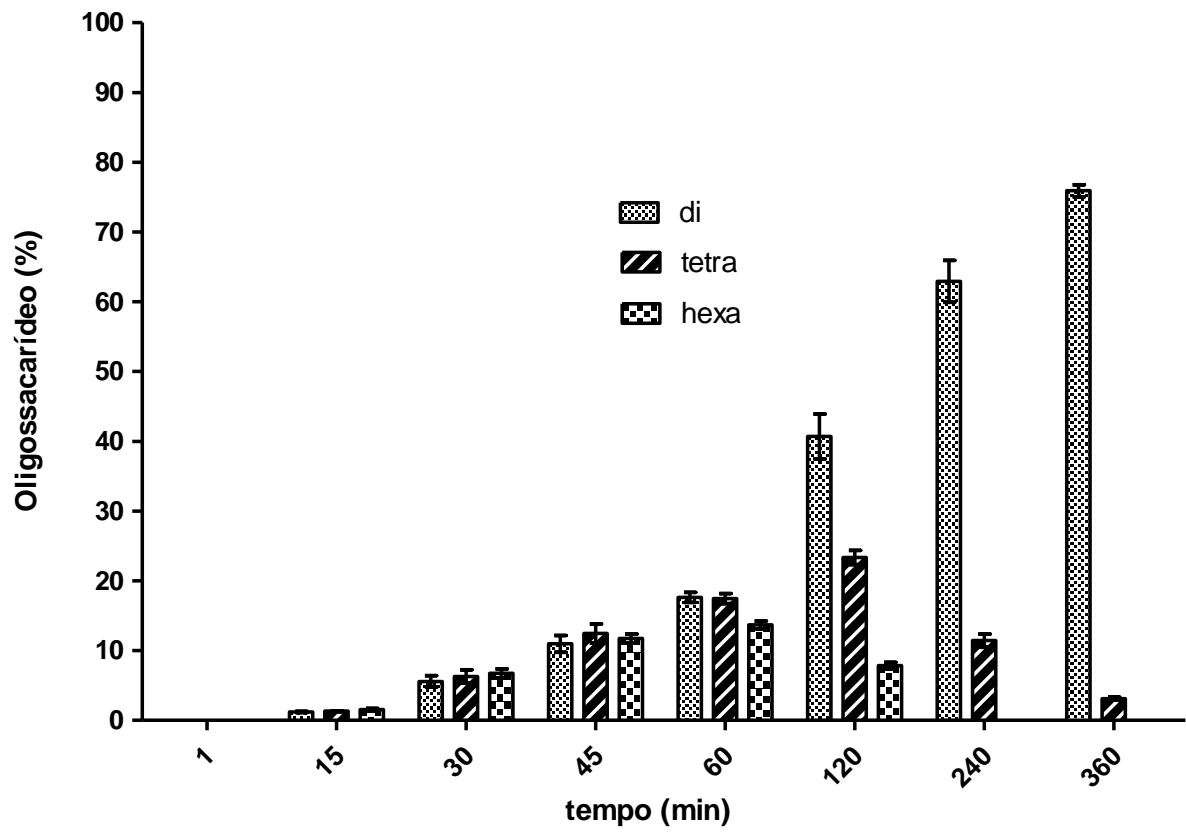


FIGURA 26 - CURVA DE OLIGOSSACARÍDEOS PRODUZIDOS POR HAP

Devido ao potencial biológico de oligossacarídeos sulfatados provenientes de *kappa*-carragenana (YUAN, *et al.*, 2005; XU, *et al.*, 2012; ABAD, *et al.*, 2011) e considerando que a massa molecular do oligossacarídeo pode estar relacionada a atividade biológica em estudo, o método de análise desenvolvido neste trabalho apresenta relevante papel para a obtenção de oligossacarídeos, facilitando sua aplicação em ensaios biológicos e na montagem de novas moléculas, usando oligossacarídeos padronizados como moldes.

6 CONCLUSÕES

A hidrólise ácida parcial (HAP) da *kappa*-carragenana extraída de *Kappaphycus alvarezii*. se mostrou eficaz na obtenção de oligossacarídeos sulfatados. A cromatografia em coluna aniônica permitiu a separação de di, tetra e hexassacarídeo (carrabitol 4²-sulfato; carratetraitol 4², 4⁴-dissulfato; e carrahexaitol 4², 4⁴, 4⁶-trissulfato). Estes foram identificados por técnicas cromatográficas (TLC) e métodos espectroscópicos (RMN de ¹³C, ¹H, COSY e HSQC). Após cromatografia de exclusão e de troca iônica, estes oligossacarídeos foram utilizados como padrões na técnica analítica de eletroforese capilar (EC).

O método de análise desenvolvido em EC foi validado, cumprindo todos os requisitos presentes nas principais recomendações nacionais e internacionais para validação de métodos analíticos. Além disso, o método apresentou a capacidade de ser utilizado para análises de oligossacarídeos provenientes de *kappa*-carragenana, com maior grau de polimerização.

Dois metodologias de hidrólise foram utilizadas para a obtenção de oligossacarídeos: hidrólise ácida parcial (HAP) e hidrólise redutiva parcial (HRP). Através da montagem de uma curva de hidrólise e análise dos resultados em EC, foi realizada uma análise comparativa entre as duas metodologias, revelando o perfil de oligossacarídeos gerados ao longo do processo hidrolítico.

Nas condições estabelecidas (65 °C, TFA 2 M, por até 1080 minutos) a HRP revelou que após uma hora de hidrólise ocorre apenas um discreto aumento na geração de dissacarídeos (20 % em 60 minutos, para aproximadamente 30 % em 480 minutos). A geração de tetrassacarídeos e hexassacarídeos, após uma hora, sofre pouca variação, com certa estabilização na geração destes oligossacarídeos.

Nas condições estabelecidas para HAP (65° C, TFA 1 M, por até 360 minutos), o perfil de geração de dissacarídeo foi crescente em relação ao tempo de hidrólise. Nesta metodologia (HAP), não foi observada a estabilização na geração dos oligossacarídeos e tempos ideais para a obtenção de dissacarídeos, tetrassacarídeo e hexassacarídeo puderam ser determinados (360, 120 e 60 minutos, respectivamente), com rendimentos, após 30 minutos, superiores àqueles obtidos por HRP.

Deste modo, foi demonstrado por eletroforese capilar (EC) que a HAP apresenta vantagens quando comparada à metodologia HRP, como por exemplo,

geração de oligossacarídeos em maior quantidade, especialmente o dissacarídeo. Além disso, a HAP apresenta menor consumo e custo de reagentes.

REFERÊNCIAS

- ABAD, L.V. et al., NMR analysis of fractionated irradiated k-carrageenan oligomers as plant growth promoter; **Radiation Physics and Chemistry**, v. 80, p. 977-982, 2011.
- ALTRIA, K. D., **Capillary Electrophoresis Guidebook**. Totowa: Humana Press, 1996. p. 3-103.
- ARECES, A. J.. Cultivo comercial de carragenófitas del género Kappaphycus. In: Alveal, K.; Ferrario, M. E.; Oliveira Filho, E. C. & Sar, E. (eds.). **Manual de métodos ficológicos**. Chile: Universidad de Concepción, 1995. p. 529-549.
- BARROS,C ; HIRATA,Y, 2002. **Apostila do Curso Estimativa da Incerteza nas Medições Laboratoriais** - Rev.02 -. CPTI.São Paulo. SP. Outubro/ 2002.
- BIXLER, H.J. Recent developments in manufacturing and marketing carrageenan. **Hydrobiologia**, v. 326-327, p. 35-37,1996.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução 899, de 29 de maio de 2003. **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. Brasília, 2003.
- BRITO, N. M.; AMARANTE JR, O. P.; POLESE, L.; RIBEIRO, M. L. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. Pesticidas: **Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, Curitiba, v.13, p. 129-146, jan./dez. 2003.
- BRITO, NATILENE M.; JUNIOR, OZELITO P. A.; POLESE, LUCIANA; RIBEIRO, MARIA L. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. iRd.aEsc: oRto.Excicoootol.x eic Mole. ieo MAmeiob ieAnmteb,i eCnutrei,t iCbau,r ivt.i b1a3,, vp. .1 132, 9ja-1n4./6d, ejza.n 2./0d0e3z. 2003.
- CARNEY, S. L.; OSBORNE, D. J., The separation of chondroitin sulfate disaccharides and hyaluronan oligosaccharides by capillary zone electrophoresis. **Anal. Biochem.**, v. 195, p. 132-140, 1991
- DUBOIS M. K.; *et al.* Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Anal. Chem.**, v. 28, p. 350-356, 1956.
- DUBOIS, M.K.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F., Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Anal. Chem.**, v. 28, p. 350-356, 1956.
- DUCATTI, D. R. B.; **Oligossacarídeos Obtidos Por Hidrólise Redutiva Parcial de Polissacarídeos de Algas Vermelhas: estudos de Ressonância Magnética Nuclear**. 113 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná. Curitiba; 2005.

DUCATTI, D. R. B.; **Hidrolise ácida de galactanas para produção de oligossacarídeos e c-glicosídeos: semisíntese de n-alquil e c-dihidropiridina glicosídeos**. Tese – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná. Curitiba; 2009.

DUCATTI, Diogo R. B. *et al.* Production of agaro- and carra-oligosaccharides by partial acid hydrolysis of galactans. **Rev. bras. farmacogn.** [online]. 2011, vol.21, n.2 [cited 2012-02-24], pp. 296-304. Available from: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-695X2011000200015&lng=en&nrm=iso>. Epub May 13, 2011. ISSN 0102-695X. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2011005000080>. Acesso em: 10/02/2013.

EL RASSI, R., **High Performance Capillary Electrophoresis of Carbohydrates**, Beckman Instruments Inc., Fullerton, pp. 1-32, 1996.

GÓES, H. GEROMEL, **Monitoramento da produção e do rendimento de carragenana da macroalga exótica *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty ex P. C. Silva e avaliação de técnicas de produção, em cultivo comercial na Baía de Sepetiba, RJ, Brasil**. Dissertação (mestrado em Botânica), Escola Nacional de Botânica Tropical, do Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2009.

GONÇALVES AG, DUCATTI DRB, GRINDLEY TB, DUARTE MER, NOSEDA MD
ESI-MS differential fragmentation of positional isomers of sulfated oligosaccharides derived from carrageenans and agarans. **J. Am. Soc. Mass. Spectrom.**, v 21, p. 1404-1416, 2010.

GONÇALVES, A. G. **Modificações químicas em oligossacarídeos derivados de polissacarídeos de algas marinhas**. Tese (Doutorado em Ciências – Bioquímica) Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

GONÇALVES, A. G. **Oligossacarídeos piruvatados e sulfatados obtidos a partir de galactanas de algas vermelhas (Rhodophyta)**. Dissertação - (Mestrado em Ciências, Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, 2001.

HOFFSTETTER-KUHN, S., **Capillary Electrophoresis: principles and practice**. Berlin: Springer Laboratory, 1993.

HOOPER, LORA V.; MANZELAA, STEPHEN M.; BAEZINGER, JACQUES U. From legumes to leukocytes: biological roles for sulfated carbohydrates. **FASEB J.**, v. 10, p. 1137-1 146, 1996.

KÄSBAUER, C. W.; PAPER, D. H.; FRANZ, G. Sulfated β -(1 \rightarrow 4) galactooligosaccharides and their effect on angiogenesis. **Carbohydr. Res.**, v. 330, p. 427-430, 2001.

KÄSBAUER, C. W.; PAPER, D. H.; FRANZ, G. Sulfated β -(1 \rightarrow 4)-galactooligosaccharides and their effect on angiogenesis. **Carbohydr. Res.**, v. 330, p. 427-430, 2001.

KATSURAYA, H.; *et al.* Synthesis of sulfated oligosaccharide glycosides having high anti-HIV activity and the relationship between activity and chemical structure. **Carbohydr. Res.**, v. 315, p. 234-242, 1999.

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

MATULEWICZ, M. C.; CIANCIA, M.; NOSEDA, M. D.; CEREZO, A. S. Carrageenan systems from tetrasporic and cystocarpic stages of *Gigartina skottsbergii* **Phytochemistry**, v. 28, p.2937–2941, 1989.

MCHUGH D. J. A guide to the seaweed industry. **FAO Fisheries Technical Paper. Food and Agriculture Organization of the United Nations**, Rome. 2003.

NYBERG, K.; EKBLAD, M.; BERGSTRÖM, T.; FREEMAN, C.; PARISH, C. R.; FERRO, V.; TRYBALA, E. The low molecular weight heparan sulfate-mimetic, PI-88, inhibits cell-to-cell spread of herpes simplex virus. **Antiviral Res.**, v. 63, p. 15-24, 2004.

PAINTER, T.J., Algal Polysaccharides. In: ASPINALL, G.O. (Ed.) **The Polysaccharides**. New York: Academic Press,1983. v. 2; p. 195-285.

PAULA, E.J.; PEREIRA, R.T.C.; OHNO, M. Strain selection in *Kappaphycus alvarezii*, var. *alvarezii* (Solieriaceae, Rhodophyta) using tetraspore progeny. **Journal of Applied Phycology**, v. 11, p. 111-121, 1999.

PERNAS, A.J., *et al.*,. Chemical heterogeneity of Carrageenans as shown by fractional precipitation with potassium chloride. **Acta Chem.Scand.**, 21:98-110. 1967.

PICKERING, T. D.; SKELTON, P. ; SULU, J. R. . Intentional introductions of commercially harvested alien seaweeds. **Botanica Marina**, v. 50, p. 338-350, 2007.

QUEIROZ, S. C. N.; JARDIM, I. C. S. F., (Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química). AGO/2001.

REES, D. A. The carrageenan system of polysaccharides. Part I. The relation between the κ - and λ -components J. **Chem. Soc.**, v. 85, p. 1821-1832, 1963.

RIBANI, MARCELO *et al.* Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 27, n. 5, Oct. 2004.

STANEK, J.; CERNY, M.; PACAK, J., **The oligosaccharides**. New York: Academic Press, 1965., 567 p.

STEVENSON, T.; FURNEAUX, R. 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., Room temperature, low-field ¹³C-nmr spectra of degraded kappa/iota carrageenans, **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 13, p. 101-104, 1991

USOV, A. I.; ELASHVILI, M., Investigation of sulfated galactan from *Laurencia nipponica* (Rhodophyta, Rhodomelaceae), using partial reductive hydrolysis. **Bot. Mar.**, v. 34, p. 553-560, 1991.

USOV, A. I. NMR spectroscopy of red seaweed polysaccharides: agars, carrageenans and xylans. **Bot. Mar.**, v. 27, p. 189-202, 1984.

USOV, A. I.; ELASHVILI, M. Polysaccharides from Algae. 51.1 Partial reductive hydrolysis of sulfated galactan from red alga *Laurencia coronopus* J. Ag. (Rhodophyta, Rhodomelaceae) **Russ. J. Bioorg. Chem.**, v. 23, p.502-511, 1997.

VARKI, A. Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct **Glycobiology**, v. 3, p. 97-130; 1993.

WALL, D.; *et al.* Characterization of the anticoagulant properties of a range of structurally diverse sulfated oligosaccharides. **Thromb. Res.**, v. 103, p. 325-335, 2001.

WITCZAK, Z. J.; NIEFORTH, K. A. **Carbohydrates in drug design**. New York: M. Dekker, 1997. 703 p.,

XU, LING *et al.*, The immune regulation of k-carrageenan oligosaccharide and its desulfated derivatives on LPS-activated microglial cells; **Neurochemistry International**, v. 6, p. 689-696, 2012.

YU, G. *et al.* Structural studies on κ-carrageenan derived oligosaccharides; **Carbohydr. Res.**, v. 337, p. 433-440, 2002.

YU, G.; GUAN, H.; IOANOVICIU, A. S.; SIKKANDER, S. A., THANAWIROON, C.; TOBACMAN, J. K.; TOIDA, T.; LINHARDT, R. J., Structural studies on -carrageenan derived oligosaccharides. **Carbohydr. Res.**, v. 331, p. 433-440, 2002.

YUAN, H.; *et al.* Preparation and in vitro antioxidant activity of k-carrageenan oligosaccharides and their oversulfated, acetylated and phosphorylated derivatives. **Carbohydr. Res.**, v. 340, p. 685-692, 2005.

ZIBETTI, ROSIANE G. M; DUARTE, MARIA E. R.; NOSEDA, MIGUEL D.; COLODI, FRANCIELY G.; DUCATTI, DIOGO R. B.; FERREIRA, LUCIANA G.; CARDOSO, MARCO A.; CEREZO, ALBERTO S. Galactans from *Cryptonemia* species. Part II: Studies on the system of galactans of *Cryptonemia seminervis* (Halymeniales) and on the structure of major fractions. **Carbohydrate Research**, v. 344, n. 17, p. 2364-2474, 2009.

ZIBETTI, ROSIANE G. M; NOSEDA, MIGUEL D.; CEREZO, ALBERTO S.; DUARTE, MARIA 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. **Carbohydrate Research**, v. 340, n. 4, p. 711-722, 2005.