

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

FRANCIELY GROSE COLODI

**GALACTANAS SULFATADAS EXTRAÍDAS DA ALGA VERMELHA**  
*Halymenia floridana* J. Agardh (HALYMENIALES, RHODOPHYTA)

CURITIBA

2007

FRANCIELY GROSE COLODI

**GALACTANAS SULFATADAS EXTRAÍDAS DA ALGA VERMELHA**  
*Halymenia floridana* J. Agardh (HALYMENIALES, RHODOPHYTA)

Monografia apresentada à disciplina de Estágio em Bioquímica como requisito parcial à conclusão do curso de Bacharelado em Ciências Biológicas, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Eugênia Duarte Nosedá

CURITIBA

2007

Ao meu pai e minha mãe, pela vida, amor e paciência.

Ao meu irmão, pelos momentos de descontração.

Ao Robson, pelo amor e ouvidos.

## AGRADECIMENTOS

Aos professores Maria Eugênia e Miguel, pela orientação, ensinamentos, dicas e paciência. Muito obrigada!

À Rosi, exemplo de dedicação e seriedade, pelos ensinamentos, conselhos e amizade. Obrigada!

À Rosane e à Andréia pelas análises e simpatia, além da sempre disposição em ajudar.

À Ju, pelos ensinamentos, conselhos, risadas, brincadeiras e principalmente pela paciência e amizade. Obrigada Ju!

À Elaine, por estar sempre presente, mesmo nos sábados, domingos e feriados e sempre disposta a ajudar. Obrigada Elaine!

Aos amigos Ju, Lu, Nirto, Marina, Bianca, Marco, Ale, Diogo, pela troca de idéias, pelas conversas, pelos conselhos, pelos favores e por todas as vezes que rimos juntos. Sem vocês o “Lab.” não seria tão divertido!

Aos amigos dos “Labs.” vizinhos Dirce, Andréia, Ana Helena, Fernanda, João, Mariana, Lúcia por estarem sempre dispostos a ajudar. Muito obrigada!

Em especial aos meus pais, Fátima e Pedro, pelo amor incondicional, pela confiança, pelas palavras, gestos e olhares, que sempre transmitem segurança pra seguir em frente. Muito obrigada! Amo vocês!

Ao meu irmão, sempre presente, pra conversar, brincar ou mesmo brigar (hehehe). Valeu mano!

À minha Vó Joana, exemplo de vida, força e perseverança.

Ao Robson, amor meu, por me fazer sorrir quando o que eu mais queira era chorar, por me ouvir quando o que eu mais precisava era falar e contar e falar mais uma vez. Muito obrigada! Te amo!

*é preciso força pra sonhar e  
perceber que a estrada vai além do que se vê...*

Marcelo Camelo

## RESUMO

Galactanas sulfatadas são polissacarídeos com estrutura repetitiva formada por unidades de  $\beta$ -D-galactose 3-ligada e  $\alpha$ -galactose 4-ligada denominadas unidades A e B, respectivamente. As galactanas produzidas majoritariamente por algas da ordem Halymeniales são do tipo DL-híbridas. Estas apresentam unidades B pertencentes a ambas as séries enantioméricas. A grande diversidade estrutural destas galactanas decorre da presença de grupos sulfato, metil ou xilose substituindo a cadeia principal, em diferentes posições, podendo ainda apresentar acetal de ácido pirúvico. Tais características influenciam diretamente as propriedades físico-químicas e biológicas destes polímeros. O objetivo do presente trabalho foi determinar a estrutura química dos polissacarídeos produzidos pela alga *Halymenia floridana* (Halymeniales, Rhodophyta). A alga seca e moída foi submetida à extração com tampão fosfato (25mM, pH 6,5 a 80°C) sendo os polissacarídeos fracionados com KCl. As frações de maior rendimento (HS-1, HPS e HS-2) permaneceram solúveis em KCl 2M e apresentaram-se com elevados teores de sulfato (22,8%, 32,0% e 26,3%, respectivamente). A composição monossacarídica destas galactanas indica galactose e 3,6-anidrogactose como principais monossacarídeos constituintes, além de derivados de galactose naturalmente metilados em baixas porcentagens. Análises por RMN de  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$  aliados a análises de metilação permitiram determinar que o padrão estrutural genérico destas galactanas corresponde a altas porcentagens de  $\beta$ -D-galactose 2-sulfato, as quais estão parcialmente substituídas por acetal de ácido pirúvico. As unidades de  $\alpha$ -galactose são pertencentes tanto a série estereoquímica D- ( $\alpha$ -D-galactose 2,6-sulfato; 3,6-anidro- $\alpha$ -D-galactose 2-sulfato; 3,6-anidro- $\alpha$ -D-galactose e  $\alpha$ -D-galactose) quanto L- (3,6-anidro- $\alpha$ -L-galactose e  $\alpha$ -L-galactose). Embora os teores de 3,6-anidrogactose (~8 mol%) sejam relativamente baixos, destaca-se que estas galactanas apresentam uma porcentagem significativa (9,1 - 13,2 mol%) de unidades precursoras de 3,6-anidro- $\alpha$ -D-galactose ( $\alpha$ -D-galactose 2,6-sulfato). Conjuntamente com os resultados obtidos por RMN ( $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$ ), as análises da enantiomericidade dos monossacarídeos constituintes destes polissacarídeos confirmaram o caráter híbrido destas galactanas. Assim para a galactana HS-2 foi determinado que a mesma é constituída por 55% de estruturas de agaranas e 45% de carragenanas. Portanto, estes resultados confirmam que as algas da ordem Halymeniales sintetizam como seus polissacarídeos majoritários, solúveis em meio aquoso, galactanas do tipo DL-híbridas.

Palavras-chave: galactanas DL-híbridas; enantiomericidade; estrutura química.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - ESTRUTURA BÁSICA REPETITIVA DAS GALACTANAS.....	3
FIGURA 2 - ESTRUTURA BÁSICA REPETITIVA DE UMA AGARANA.....	3
FIGURA 3 - ESTRUTURA BÁSICA REPETITIVA DE UMA CARRAGENANA.....	4
FIGURA 4 - ESTRUTURA BÁSICA REPETITIVA DE UMA GALACTANA DL-HÍBRIDA.....	4
FIGURA 5 - FOTO DA ALGA <i>Halymenia floridana</i> J. Agardh.....	10
FIGURA 6 - ANÁLISE DE HOMOGENEIDADE DA FRAÇÃO HS-1.....	29
FIGURA 7 - ANÁLISE DE HOMOGENEIDADE DA FRAÇÃO HPS.....	29
FIGURA 8 - ANÁLISE DE HOMOGENEIDADE DA FRAÇÃO HS-2.....	30
FIGURA 9 - ESPECTRO DE RMN DE $^{13}\text{C}$ DA FRAÇÃO HS-1.....	39
FIGURA 10 - ESPECTRO DE RMN DE $^{13}\text{C}$ DA FRAÇÃO HS-1D.....	40
FIGURA 11 - ESPECTRO DE RMN DE $^1\text{H}$ DA FRAÇÃO HS-1D.....	45
FIGURA 12 - ESPECTRO DE RMN DE $^{13}\text{C}$ DA FRAÇÃO HPS.....	48
FIGURA 13 - ESPECTRO DE RMN DE $^{13}\text{C}$ DA FRAÇÃO HPS-D.....	49
FIGURA 14 - ESPECTRO DE RMN DE $^1\text{H}$ DA FRAÇÃO HPS-D.....	52
FIGURA 15 - ESPECTRO DE RMN DE $^{13}\text{C}$ DA FRAÇÃO HS-2.....	55
FIGURA 16 - ESPECTRO DE RMN DE $^{13}\text{C}$ DA FRAÇÃO HS-2D.....	56
FIGURA 17 - ESPECTRO DE RMN DE $^1\text{H}$ DA FRAÇÃO HS-2D.....	59
FIGURA 18 - ASSINALAMENTOS: DÍADES DAS GALACTANAS DESSULFATADAS.....	61
FIGURA 19 - DÍADES DAS FRAÇÕES DESSULFATADAS HS-1D, HPS-D E HS-2D.....	63
FIGURA 20 - DÍADE PRESENTE NA GALACTANA NATIVA HS-2.....	64
FIGURA 21 - DÍADES PRESENTES NA GALACTANA NATIVA HS-1.....	64

## LISTA DE ESQUEMAS E TABELAS

ESQUEMA 1 - EXTRAÇÃO E FRACIONAMENTO DOS POLISSACARÍDEOS OBTIDOS DA ALGA <i>Halymenia floridana</i> .....	19
TABELA 1 - RENDIMENTO E ANÁLISES QUÍMICAS DAS FRAÇÕES NATIVAS OBTIDAS DA ALGA <i>H. floridana</i> .....	20
TABELA 2 - ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES NATIVAS OBTIDAS DE <i>H. floridana</i> .....	22
TABELA 3 - RENDIMENTO E ANÁLISES QUÍMICAS DAS FRAÇÕES SOLÚVEIS EM KCl 2M OBTIDAS DA ALGA <i>H. floridana</i> .....	24
TABELA 4 - ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES SOLÚVEIS EM KCl 2M OBTIDAS DE <i>H. floridana</i> .....	27
TABELA 5 - ANÁLISE ENANTIOMÉRICA DAS FRAÇÕES HS-1 E HS-2.....	28
TABELA 6 - PORCENTAGEM DE DESSULFATAÇÃO E RENDIMENTO DAS FRAÇÕES DESSULFATADAS HS-1D, HPS-D E HS-2D .....	31
TABELA 7 - COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES DESSULFATADAS HS-1D, HPS-D E HS-2D.....	32
TABELA 8 - RESULTADOS DAS ANÁLISES DE METILAÇÃO DAS FRAÇÕES HS-1, HPS E HS-2.....	34
TABELA 9 - ANÁLISE DE RMN DE <sup>13</sup> C E <sup>1</sup> H: DÍADES PRESENTES NAS FRAÇÕES NATIVA HS-1 E DESSULFATADA HS-1D.....	46
TABELA 10 - ANÁLISE DE RMN DE <sup>13</sup> C E <sup>1</sup> H: DÍADES PRESENTES NA FRAÇÃO DESSULFATADA HPS-D.....	53
TABELA 11- ANÁLISE DE RMN DE <sup>13</sup> C E <sup>1</sup> H: DÍADES PRESENTES NAS FRAÇÕES NATIVA HS-2 E DESSULFATADA HS-2D.....	60

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**H-1; H-2** - frações nativas obtidas da alga *Halymenia floridana* após primeira e segunda extrações em solução tampão a 80°C

**HS-1; HPS; HS-2** - frações solúveis em KCl 2M obtidas após tratamento com íons potássio

**HS-1D; HPS-D; HS-2D** - frações solúveis em KCl 2M após dessulfatação solvolítica

**[ $\alpha$ ]<sub>D</sub>** - rotação ótica específica (a 20°C)

**C-1; C-2; C-3; C-4; C-5 e C-6** - carbonos 1, 2, 3, 4, 5 e 6, respectivamente

**<sup>13</sup>C** - carbono 13

**<sup>1</sup>H** - próton

**CG-EM** - cromatografia líquido-gasosa acoplada a espectrometria de massa

**D<sub>2</sub>O** - água deuterada

**DMSO** - dimetilsulfóxido

**HCl** - ácido clorídrico

**HPLC** - cromatografia líquida de alta performance

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

**Hz** - Hertz

**KCl** - cloreto de potássio

**MHz** - mega Hertz

**NaCl** - cloreto de sódio

**NaN<sub>3</sub>** - azida de sódio

**NaNO<sub>3</sub>** - nitrato de sódio

**NaSO<sub>3</sub>** - sulfato de sódio

**NaOH** - hidróxido de sódio

**p/v** - peso/volume

**v/v** - volume/volume

**ppm** - partes por milhão

**RMN** - ressonância magnética nuclear

**TFA** - ácido trifluoracético

**Gal** - galactose

**AG** - 3,6-anidrogactose

**2AG** - 3,6-anidro-2-O-metilgalactose

**2Gal** - 2-O-metilgalactose

**6Gal** - 6-O-metilgalactose

**3/4Gal** - 3 e/ou 4-O-metilgalactose

**Xil** - xilose

**Glu** - glucose

**G2S→D2,6S** - β-D-galactose 2-sulfato ligada a α-D-galactose 2,6-sulfato

**G2S(P)→D(6S)** - β-D-galactose 2-sulfato piruvatada ligada a α-D-galactose 6-sulfato, sendo que os parênteses significam que P e 6S são facultativos

**G→AG** - β-D-galactose ligada a 3,6-anidro-α-galactose

**G4,6S→DA2S** - β-D-galactose 4,6-sulfato ligada a 3,6-anidro-α-D-galactose 2-sulfato

**GP→D** - β-D-galactose piruvatada ligada a α-D-galactose

**G→D** - β-D-galactose ligada a α-D-galactose

**G→L** - β-D-galactose ligada a α-L-galactose

**G→DA** - β-D-galactose ligada a 3,6-anidro-α-D-galactose

**G(P)→LA** - β-D-galactose piruvatada ou não ligada a 3,6-anidro-α-L-galactose

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	v
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	vi
<b>LISTA DE ESQUEMAS E TABELAS</b> .....	vii
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS</b> .....	viii
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
1.1 ALGAS VERMELHAS.....	1
1.2 GALACTANAS SULFATADAS.....	2
1.3 ORDEM HALYMENIALES.....	5
1.4 GALACTANAS DO TIPO DL-HÍBRIDAS.....	6
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>9</b>
2.1 OBJETIVO GERAL.....	9
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	9
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>10</b>
3.1 MATERIAL BIOLÓGICO.....	10
3.2 EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS.....	10
3.3 TRATAMENTO DOS POLISSACARÍDEOS.....	11
3.4 MÉTODOS ANALÍTICOS GERAIS.....	11
3.5 HIDRÓLISE ÁCIDA TOTAL DO TIPO HIDRÓLISE REDUTIVA.....	13
3.6 DETERMINAÇÃO DA CONFIGURAÇÃO ENANTIOMÉRICA.....	13
3.7 DESSULFATAÇÃO POR TRATAMENTO SOLVOLÍTICO.....	14
3.7.1 PREPARO DO SAL DE PIRIDÔNIO.....	14
3.7.2 SOLVÓLISE.....	14
3.8 METILAÇÃO.....	15
3.8.1 PREPARO DO SAL DE TRIETILAMÔNIO.....	15
3.8.2 METILAÇÃO.....	15
3.9 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS.....	16
3.9.1 CROMATOGRAFIA LÍQUIDO-GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSA (CG-EM).....	16
3.9.2 CROMATOGRAFIA DE GEL PERMEAÇÃO (HPSEC-MALLS) E ANÁLISE DE HOMOGENEIDADE.....	16

3.9.3 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN) .....	17
3.9.3.1 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE CARBONO -13 (RMN de $^{13}\text{C}$ ) .....	17
3.9.3.2 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE PRÓTON (RMN de $^1\text{H}$ ) .....	17
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>18</b>
4.1 OBTENÇÃO E ANÁLISE DAS FRAÇÕES NATIVAS DE <i>Halymenia floridana</i> .....	18
4.1.1 EXTRAÇÃO E ANÁLISE QUÍMICA .....	18
4.1.2 COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA .....	21
4.2 PURIFICAÇÃO E FRACIONAMENTO DAS FRAÇÕES NATIVAS DE <i>H. floridana</i> .....	23
4.2.1 OBTENÇÃO E ANÁLISE QUÍMICA .....	23
4.2.2 COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA .....	26
4.2.3 DETERMINAÇÃO DA CONFIGURAÇÃO ENANTIOMÉRICA .....	27
4.3 ANÁLISES DE HOMOGENEIDADE DAS FRAÇÕES SOLÚVEIS EM KCl 2M .....	29
4.4 DESSULFATAÇÃO SOLVOLÍTICA DAS FRAÇÕES HS-1, HPS E HS-2 .....	30
4.5 ANÁLISES DE METILAÇÃO .....	33
4.5.1 ANÁLISES DE METILAÇÃO DA GALACTANA HS-1 .....	33
4.5.2 ANÁLISES DE METILAÇÃO DA GALACTANA HPS .....	36
4.5.3 ANÁLISES DE METILAÇÃO DA GALACTANA HS-2 .....	37
4.6 ESPECTROSCOPIA DE RMN DE $^{13}\text{C}$ E $^1\text{H}$ DAS FRAÇÕES HS-1 E HS-1D .....	38
4.7 ESPECTROSCOPIA DE RMN DE $^{13}\text{C}$ E $^1\text{H}$ DAS FRAÇÕES HPS E HPS-D .....	47
4.8 ESPECTROSCOPIA DE RMN DE $^{13}\text{C}$ E $^1\text{H}$ DAS FRAÇÕES HS-1 E HS-1D .....	54
<b>5 CONCLUSÕES</b> .....	<b>65</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>66</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 ALGAS VERMELHAS

As algas vermelhas (Rhodophyta) participam da mais antiga divisão das macrófitas marinhas (USOV, 1998), constituindo o principal grupo de macroalgas marinhas (PAINTER, 1983; USOV, 1992). Encontram-se amplamente distribuídas ao longo da costa brasileira e são utilizadas pelo homem há muitos anos em uma ampla variedade de produtos alimentícios, farmacológicos e industriais, bem como para fins biotecnológicos (LOBBAN; HARRISON, 1994).

A composição polissacarídica das algas vermelhas é muito diferente das de outras plantas, por apresentar galactanas sulfatadas como o principal constituinte estrutural da parede celular na matriz intercelular (PAINTER, 1983). A adaptação das algas ao meio marinho é garantida pela regulação osmótica ou iônica realizada por estes polissacarídeos (KLOAREG; QUATRANO, 1988).

Algumas galactanas sulfatadas apresentam propriedades geleificantes e estabilizantes, portanto são muito exploradas comercialmente devido a sua larga aplicação industrial. Vários outros biopolímeros não têm propriedades de interesse industrial, mas são promissores compostos biologicamente ativos, apresentando, dentre outras, atividades antiviral (CARLUCCI et al., 1999; DUARTE et al., 2001, 2004; TALARICO et al., 2004), antitumoral (FERNÁNDEZ, et al., 1989) e antitrombótica (SEN et al., 2002).

Deste modo, o estudo da estrutura destes polímeros naturais é muito importante, tanto para a correta aplicação nos diferentes setores da indústria, como para o estudo das atividades biológicas. Posto que a determinação da estrutura química fina de tais biomoléculas permite correlacionar detalhes estruturais com propriedades físico-químicas e biológicas (USOV, 1998).

## 1.2 GALACTANAS SULFATADAS

Galactanas de algas vermelhas são polissacarídeos sulfatados de estrutura repetitiva e similar, em vários aspectos, aos mucopolissacarídeos do tecido conjuntivo dos animais (USOV, 1998).

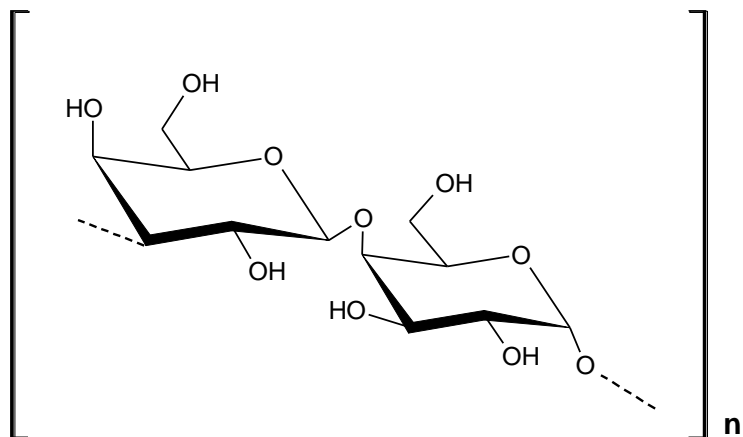
A estrutura das galactanas consiste em cadeias lineares de unidades de  $\beta$ -D-galactopiranosose ligadas glicosídicamente através da posição 3 (unidade A) e  $\alpha$ -galactopiranosose ligadas glicosídicamente através da posição 4 (unidade B) (PERCIVAL; McDOWELL, 1967). Assim formam um arranjo alternado de unidades A e B  $(AB)_n$  (Figura-1), as quais são denominadas díades. As unidades A podem apresentar substituições por grupamentos éster de sulfato e/ou metil em C-2, C-4 ou C-6, além de acetal de ácido pirúvico e algumas vezes outros monossacarídeos (glicosilação), sendo que as unidades B podem estar ciclizadas formando a 3,6-anidrogactose ou substituídas em C-2, C-3 e C-6 por grupos sulfato e/ou metil (USOV, 1998).

Portanto, apesar da estrutura básica repetitiva, as galactanas apresentam grande diversidade estrutural, devido aos diferentes tipos de substituintes na cadeia principal (PAINTER, 1983), o que origina moléculas complexas.

A variedade estrutural das galactanas, dependendo da espécie, é considerada como um importante indicador taxonômico da filogenia das rodófitas. Desta forma, algumas revisões (MILLER, 1997; CHOPIN et al., 1999; STORTZ; CEREZO, 2000) têm apontado a grande importância quimiotaxonômica dos polissacarídeos isolados das algas vermelhas, bem como a necessidade de estudos estruturais mais detalhados.

Estes biopolímeros podem ser divididos em grupos conforme a configuração enantiomérica das unidades B ( $\alpha$ -galactose). Estas unidades podem ser pertencentes às séries estereoquímicas L-, D- ou L- e D- na mesma molécula, caracterizando o grupo das agaranas, carragenanas e galactanas do tipo DL-híbridas, respectivamente. As estruturas básicas das agaranas, carragenanas e DL-híbridas podem ser observadas nas Figuras-2, 3 e 4, respectivamente.

FIGURA 1 – ESTRUTURA BÁSICA REPETITIVA DAS GALACTANAS



As agaranas podem ser diferenciadas em três estruturas típicas, de acordo com a presença de substituições por acetal de ácido pirúvico e grupos sulfato, além de ciclizações:

- agarose neutra possui estrutura linear e regular de unidades A não substituídas e unidades B em forma de 3,6-anidro- $\alpha$ -L-galactose;
- agarose piruvatada possui unidades A substituídas por acetal de ácido pirúvico e baixo grau de substituições por grupos sulfato;
- agarose sulfatada possui maior grau de sulfatação das unidades B e baixa porcentagem de 3,6-anidrogalactose e de acetal de ácido pirúvico (DUCKWORTH; YAPHE, 1971).

FIGURA 2 – ESTRUTURA BÁSICA REPETITIVA DE UMA AGARANA

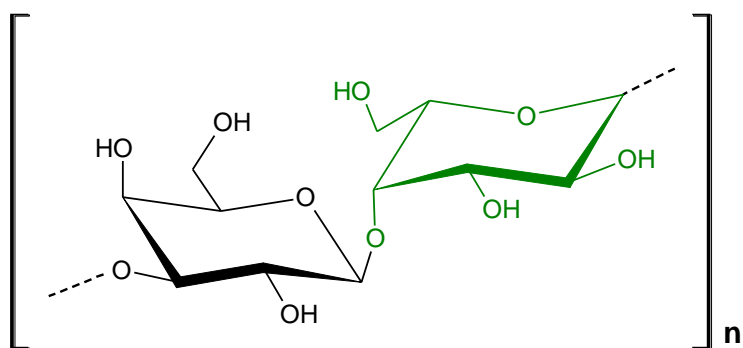


FIGURA 3 – ESTRUTURA BÁSICA REPETITIVA DE UMA CARRAGENANA

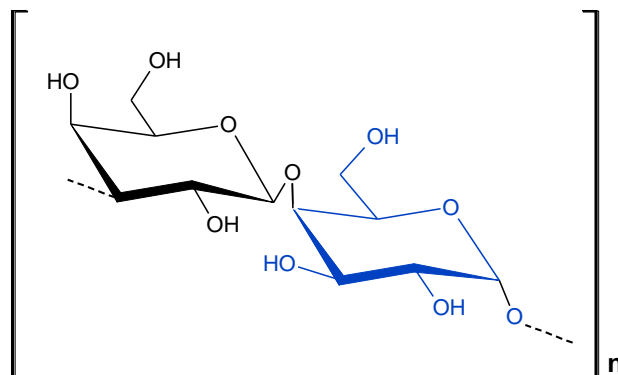
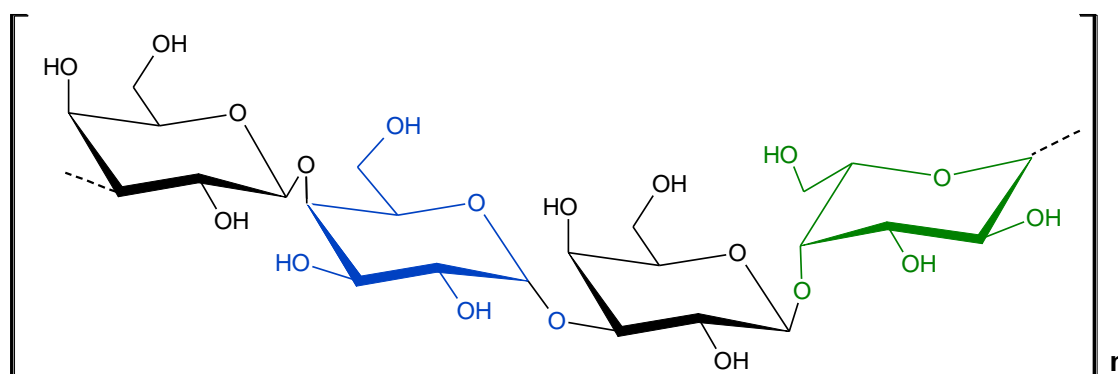


FIGURA 4 – ESTRUTURA BÁSICA REPETITIVA DE UMA GALACTANA DL-HÍBRIDA



As carragenanas podem ser classificadas de acordo com a posição das substituições por grupamentos sulfato nas unidades A e B, além da ciclização das unidades B. Desta forma existem quatro famílias de carragenanas:

- família *kappa*: carragenanas que possuem as unidades de  $\beta$ -D-galactopiranosose ligadas em C-3 (unidades A), substituídas por sulfato em C-4. As unidades B desta

família, que pertencem à série enantiomérica D-, podem estar ou não ciclizadas em forma de 3,6-anidrogactose e/ou podem apresentar-se substituídas por grupos sulfato em C-2 e C-6. Inclui as carragenanas do tipo *kappa*, *iota*, *mu* e *nu*;

- família *lambda*: carragenanas que possuem as unidades A substituídas por grupamentos sulfato em C-2 e as unidades B podem apresentar ciclização formando unidades de 3,6-anidrogactose e substituição por grupos sulfato em C-2 e C-6, além de ácido pirúvico na forma de um acetal 4,6-O-(1-carboxietilideno). Inclui as carragenanas do tipo *lambda*, *xi*, *pi* e *theta*;

- família *omega*: carragenanas 6-sulfatadas nas unidades A, em que as unidades B podem se apresentar como 3,6-anidrogactose ou substituídas em C-6 por grupamentos sulfato. Inclui as carragenanas do tipo *omega* e *psi*;

- família *beta*: carragenanas não sulfatadas na unidade A e que apresentam unidades B substituídas por grupos sulfato em C-2 e C-6, ou ciclizadas na forma de 3,6-anidrogactose. Inclui as carragenanas do tipo *beta*, *alpha*, *gamma* e *delta* (ZIBETTI, 2001).

### 1.3 ORDEM HALYMENIALES

A antiga ordem Cryptonemiales sensu KYLIN (1956) juntamente com a ordem Gigartinales compreendiam 60% das famílias da divisão Rhodophyta, sendo difícil, em alguns casos, a diferenciação de espécimes dentre estas duas ordens.

Saunders e Kraft em 1996, sequenciaram o gene 18S do rRNA de representantes das famílias de Dumontiaceae, Endocladaceae, Halymeniaceae, e Kallymeniaceae (ordem Cryptonemiales sensu KYLIN, 1956), e das famílias de Mychodeaceae, Phylloporaceae, Schizymeniaceae, e Sebdeniaceae (ordem Gigartinales). Os autores usaram os dados moleculares para validar a junção taxonômica da ordem Cryptonemiales à ordem Gigartinales, como proposta por KRAFT e ROBINS (1985), com exceção das famílias Halymeniaceae e Sebdeniaceae, as quais passaram a formar a nova ordem Halymeniales.

A ordem Halymeniales, que engloba algas, atualmente, reconhecidas como potenciais produtoras de galactanas do tipo DL-híbridas, possui 242 espécies. É representada apenas pela família Halymeniaceae, na qual se destacam os gêneros *Cryptonemia*, *Grateloupia* e *Halymenia*, que correspondem a 66% das espécies.

As algas pertencentes a família Halymeniaceae, biossintetizam galactanas semelhantes a carragenanas, porém com L-galactose em baixas porcentagens, variáveis graus de metoxilação e padrões incomuns de sulfatação (STORTZ; CERZO, 2000). Posto isso se tem observado uma grande heterogeneidade química nestas galactanas.

#### 1.4 GALACTANAS DO TIPO DL-HÍBRIDAS

As galactanas DL-híbridas, ou seja, que apresentam unidades B pertencentes a diferentes configurações enantioméricas, na mesma molécula, permanecem sendo estudadas. Até o momento não houve isolamento de qualquer oligossacarídeo que contenha unidades B com estruturas de agarana e carragenana, pois as hidrólises parciais a que estas moléculas foram submetidas resultaram apenas em fragmentos de agaranas ou carragenanas. Portanto, supõe-se que estas moléculas apresentem-se em blocos, onde um bloco de díades com unidades B na configuração L-, liga-se com outro de configuração D-, formando zonas de junção na molécula. Desta forma, estas zonas irregulares apresentam-se mais suscetíveis à quebra hidrolítica, o que acaba por render baixíssimas quantidades de oligossacarídeos DL-híbridos (ESTEVEZ et al., 2001).

O fracionamento de galactanas DL-híbridas em agaranas e carragenanas ainda não é possível devido à falta de métodos para separação de polímeros diastereoisômeros. A única metodologia conhecida baseia-se nas propriedades de formação de géis em cadeias regulares de estruturas de *kappa/iota*-carragenanas, na dependência de interações específicas com o íon potássio. Neste caso, sistemas de galactanas DL-híbridas que contenham cadeias de *kappa/iota*-carragenanas (*kappa/iota* DL-híbridas) irão precipitar, enquanto cadeias de *mu/nu*-carragenanas permanecerão solúveis, juntamente com agaranas e cadeias DL-híbridas com estruturas

predominantes de agaranas (agaranas DL-híbridas), na fração solúvel em KCl 2M (ESTEVEZ et al., 2001).

Por estes motivos, as análises de enantiomeridade correspondem ao principal método de confirmação do caráter híbrido destes polímeros, além da determinação da configuração predominante no polissacarídeo, caracterizando-o como galactana DL-híbrida com predomínio de agarana ou carragenana.

Em 2002, SEN *et al.* (2002) caracterizaram uma galactana do tipo DL-híbrida, na espécie *Grateloupia indica*, através da análise do produto da metanólise parcial do polissacarídeo nativo onde encontraram uma proporção de carrabiose:agarobiose de 1:0,21, e também por determinação de D- e L-galactose no polímero dessulfatado e metilado (D : L = 1 : 0,48), consistente com uma galactana constituída por ambas estruturas de agarana e carragenana. Este polímero ainda apresentou uma potente atividade anticoagulante (SEN *et al.*, 1994). É importante ressaltar que anteriormente o polissacarídeo biossintetizado pela mesma espécie *G. indica* foi classificado como uma galactana do tipo *lambda*-carragenana (PAREKH *et al.*, 1989), no entanto neste estudo o polímero foi analisado apenas por espectroscopia de infravermelho e dosagem colorimétrica do teor de 3,6-anidrogactose e sulfato.

Saito e Oliveira (1990), preocupados com a produção de carragenanas no Brasil, uma vez que o país importa 200 toneladas de carragenanas por ano, realizaram um *screening* das algas encontradas na costa brasileira. Neste trabalho, a alga *Cryptonemia crenulata*, também pertencente à família Halymeniaceae, foi classificada como produtora de *iota*-carragenana. No entanto, Zibetti et al. (2005) estudaram os polissacarídeos de *C. crenulata* por métodos químicos e espectroscópicos, demonstrando que esta alga sintetiza galactanas DL-híbridas, altamente sulfatadas em C-2, tanto nas unidades A ( $\beta$ -galactose 2-sulfato) quanto nas unidades B (3,6-anidro- $\alpha$ -L-galactose 2-sulfato). Neste estudo foram obtidas duas galactanas homogêneas majoritárias substituídas também por acetal de ácido pirúvico em carbonos 4 e 6. A galactana com maior grau de sulfatação apresentou 55% da sua estrutura com característica de agarana e 45% com característica de carragenana.

Outra espécie do gênero *Cryptonemia* (*C. seminervis*), pertencente à família Halymeniales, sintetiza galactanas do tipo DL-híbridas sulfatadas em C-2 ( $\beta$ -galactose

2-sulfato) e piruvatadas, com 70% da sua estrutura com característica de agarana e 30% com característica de carragenana (ZIBETTI, 2005).

Este novo tipo de galactana sulfatada apresenta uma estrutura mais complexa do que agaranas e carragenanas. Análises espectroscópicas de RMN de  $^{13}\text{C}$  são úteis na complementação dos estudos estruturais destas moléculas, porém a baixa sensibilidade do método aliada com a baixa solubilidade das moléculas e alta complexidade apresentada nos espectros, muitas vezes, não permite que as diferentes estruturas diastereoisômeras de unidades de 3,6-anidrogactopiranosose sejam detectadas. Assim, análises de metilação juntamente com a determinação da enantiomericidade são as principais ferramentas utilizadas no estudo detalhado das galactanas DL-híbridas (ESTEVEZ *et al.* 2001). Porém, espectroscopias de RMN de  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$  consistem num instrumento importante para o acompanhamento e delineamento dos processos de estudo.

Segundo Estevez *et al.* (2004) as algas das famílias Gigartineaceae e Phylloporaceae, da ordem Gigartinales, descritas como carragenófitas, produzem baixas quantidades de galactanas DL-híbridas. Enquanto que a alga *Kappaphycus alvarezii* (Gigartinales), cultivada para a produção comercial de *kappa*-carragenana, sintetiza também valores significativos de galactanas sulfatadas do tipo DL-híbridas.

Na ordem Ceramiales, conhecida por englobar algas agarófitas, duas espécies (*Rhodomela larix* e *Digenea simplex*) são relatadas como produtoras de galactanas do tipo DL-híbrida (TAKANO *et al.*, 1999 e 2003).

Deste modo, galactanas do tipo DL-híbrida estão presentes tanto em algas tipicamente produtoras de carragenanas (Gigartinales) como de agaranas (Ceramiales), além das algas que as produzem como galactanas majoritárias, como é o caso de *C. crenulata* (ZIBETTI *et al.*, 2005).

Pesquisas estruturais de galactanas, com fracionamentos minuciosos, e determinação das unidades enantioméricas, podem levar ao reconhecimento de outras estruturas de galactanas do tipo DL-híbridas, ou mesmo de algas carragenófitas ou agarófitas que produzam mesmo que em baixa porcentagem galactanas DL-híbridas. (STORTZ e CEREZO, 2000).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

- Estudo da estrutura química fina dos polissacarídeos solúveis em água produzidos pela alga *Halymenia floridana* J. Agardh (Halymeniales).

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Extração, purificação e caracterização químicas dos polissacarídeos da alga *Halymenia floridana*.
- Determinação da estrutura química fina dos principais polissacarídeos utilizando-se métodos químicos e espectroscópicos.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 MATERIAL BIOLÓGICO

O material biológico estudado foi a alga *Halymenia floridana* (Figura-5), pertencente à divisão Rhodophyta, classe Rhodophyceae, ordem Halymeniales, família Halymeniaceae, gênero *Halymenia* e espécie *Halymenia floridana* J. Agardh.

FIGURA 5 – ALGA *Halymenia floridana* J. Agardh.



A alga foi coletada na ilha do Farol na praia de Caiobá - PR, de junho a novembro de 2004, e identificada com o auxílio da Dra Sílvia Maria Pita de Beuclair Guimarães do Instituto de Botânica/SP.

Os exemplares da alga foram lavados com água doce, secos à sombra, moídos em moinho de faca (WILEY MILL) e depois submetidos aos processos de extração.

#### 3.2 EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS

A alga seca e moída (4,5g) foi submetida a duas extrações com tampão fosfato 0,025 M, pH 6,5 (1,5% p/v) sob agitação mecânica, à 80°C, por 6 horas. Após centrifugação (10000xg por 10 minutos), ao sobrenadante foi adicionado etanol (3

volumes) e acetato de potássio. Os precipitados etanólicos foram resolubilizados em água, dialisados seqüencialmente contra água destilada, NaCl 1M, água destilada e liofilizados. As frações polissacarídicas obtidas de *H. floridana* foram denominadas H-1 e H-2, obtidas da primeira e segunda extrações, respectivamente.

### 3.3 TRATAMENTO DOS POLISSACARÍDEOS

A fração H-1 foi solubilizada em água (0,25% p/v), e tratada com KCl sólido 2M, os extratos polissacarídicos foram centrifugados, e os respectivos sobrenadantes e precipitados dialisados contra água destilada e liofilizados. Deste processo obtiveram-se as frações HS-1 (solúvel em KCl 2M) e HP-1 (insolúvel em KCl 2M). As frações H-2 e HP-1 foram solubilizadas em água (0,25% p/v) e sofreram adição de KCl sólido em concentrações crescentes (0 - 2M), com adição de 0,1 em 0,1M. Após cada adição as amostras permaneciam em repouso de 6 horas à 2°C, como no tratamento de H-1. O extrato centrifugado, dialisado e liofilizado do fracionamento de HP-1 rendeu as frações HP0,1M-1 (insolúvel em KCl 0,1M), HPP (insolúvel em KCl 2M) e HPS (solúvel em KCl 2M). O fracionamento de H-2 deu origem às frações HP0,1M-2 (insolúvel em KCl 0,1M), HP-2 (insolúvel em KCl 2M) e HS-2 (solúvel em KCl 2M) (Esquema-1).

### 3.4 MÉTODOS ANALÍTICOS GERAIS

3.4.1. As dosagens de açúcar total (carboidrato) foram realizadas pelo método do fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS *et al.*, 1956), com sensibilidade entre 10-100µg, utilizando-se como padrão galactose na concentração de 70µg/mL e leitura no comprimento de onda de 490nm, em espectrofotômetro.

3.4.2. As dosagens de proteínas foram realizadas pelo método de Lowry *et al.* (1951) (sensibilidade de 5-100µg) utilizando-se o reativo de Folin-Ciocalteu e solução

de soro-albumina bovina cristalina como padrão na concentração de 40mg% e leitura no comprimento de onda de 660nm.

3.4.3. Os teores de sulfato foram determinados pelo método de Dodgson (1961), após hidrólise das amostras com HCl 1M, por 5 horas, à 105°C. Às amostras, foi adicionado o reativo gelatina-bário (neste reativo o cloreto de bário é solubilizado na gelatina), que forma sulfato de bário, o qual fica suspenso neste fluido. O padrão de solução de sulfato de sódio utilizado tem concentração de 1mg/mL diluído em HCl 1M. A leitura foi realizada no comprimento de onda de 360nm. A sensibilidade do método está na faixa de 20-200µg de sulfato.

3.4.4. A determinação do teor de piruvato, após liberação deste por hidrólise com ácido oxálico 0,02M, por 1 hora, 120°C, foi realizada de acordo com o método da 2,4-dinitrofenilhidrazina (KOEPEL; SHARPE, 1952), tendo como padrão ácido pirúvico 0,25µM. A leitura foi realizada no comprimento de onda de 380nm. Sendo os valores obtidos nesta determinação, corrigidos de acordo com Duckworth e Yaphe (1970), devido à interferência de unidades de 3,6-anidrogactose (AG), utilizando-se a seguinte fórmula:  $\% \text{ ácido pirúvico}_{\text{corrigido}} = \% \text{ ácido pirúvico}_{\text{dosado}} \cdot [(\% \text{ ácido pirúvico}_{\text{agarose}} \times \text{AG}_{\text{amostra dosada}}) / \% \text{ AG}_{\text{agarose}}]$ .

A agarose comercial (Sigma) foi utilizada como padrão para o cálculo da correção, esta agarose apresenta 47,3 mol% de 3,6-anidrogactose e apresentou 7,5 mol% de ácido pirúvico, decorrente da interferência da 3,6-anidrogactose.

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

### 3.5 HIDRÓLISE ÁCIDA TOTAL DO TIPO HIDRÓLISE REDUTIVA

As composições monossacarídicas foram determinadas com 1-2mg de polissacarídeo, de acordo com os métodos de Falshaw e Furneaux (1994) e Jol *et al.* (1999), modificações do método original descrito por Stevenson e Furneaux (1991), que se processam pela chamada hidrólise ácida total do tipo hidrólise reductiva, em duas etapas:

- utiliza-se ácido trifluoracético (TFA), e um agente redutor, complexo 4-metil-morfolina borano, estável em meio reacional ácido, à temperatura de 80°C por 30 minutos. Nesta primeira etapa ocorre a quebra das ligações 3,6-anidrogalactosídicas e sua seqüencial redução, o que as protege da degradação em meio ácido.

- a concentração do TFA é ajustada pela adição da solução do complexo 4-metil-morfolina borano, à temperatura de 120°C por 90 minutos. Nesta condição há hidrólise das ligações glicosídicas envolvendo as demais unidades constituintes do polissacarídeo, as quais por sua vez serão também reduzidas.

Os correspondentes alditóis foram acetilados (anidrido acético/TFA concentrado na proporção de 2:1) e analisados na forma de acetatos de alditóis por cromatografia líquido-gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-EM).

### 3.6 DETERMINAÇÃO DA CONFIGURAÇÃO ENANTIOMÉRICA

As determinações das configurações enantioméricas e as quantificações das unidades pertencentes às séries D- e L- foram realizadas pelo método descrito por Navarro e Stortz (2003). Nesta metodologia os polissacarídeos sofrem uma aminação reductiva (agente redutor cianoborohidreto de sódio), na presença do álcool quiral (S)-1-amino-2-propanol e acetilação, formando assim seus derivados 1-deoxi-(2-hidroxi-propilamina) alditóis, que são separados e quantificados por CG-EM. Para verificação da enantiomericidade da galactose e dos derivados naturalmente metilados 6-O-, 4-O- e 3-O-metilgalactose é utilizado o álcool quiral (S)-1-amino-2-propanol, enquanto que a substituição deste álcool por (S)- $\alpha$ -metilbenzilamina permite a

separação e quantificação dos derivados 2-O-metilgalactose, 3,6-anidrogactose e 2-O-metil-3,6-anidrogactose.

### 3.7 DESSULFATAÇÃO POR TRATAMENTO SOLVOLÍTICO

#### 3.7.1 PREPARO DO SAL DE PIRIDÔNIO

O processo de solvólise foi conduzido com os polissacarídeos na forma de sal de piridônio. Este sal foi formado através da solubilização dos polissacarídeos em água e adição da resina catiônica DOWEX 50x8 na forma H<sup>+</sup> (ácida), sob agitação magnética à temperatura ambiente por 30 minutos. O filtrado foi neutralizado com piridina, até pH 7,0 e liofilizado (NAGASAWA *et al.*, 1979).

#### 3.7.2 SOLVÓLISE

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

A solução resultante foi mantida à 100°C durante 4 horas. Após o resfriamento, os polissacarídeos solvolisados foram submetidos à diálise contra água corrente, água destilada e então liofilizados. Os polissacarídeos dessulfatados foram analisados quanto a sua composição monossacarídica e teor de sulfato.

## 3.8 METILAÇÃO

### 3.8.1 PREPARO DO SAL DE TRIETILAMÔNIO

Os polissacarídeos devem apresentar-se na forma de sal de trietilamônio para que possam permanecer solúveis no meio reativo do processo de metilação (STEVENSON; FURNEAUX, 1991). Desta forma, aproximadamente, 15mg das frações HS-1, HPS e HS-2 foram solubilizadas no menor volume de água possível e colocadas em diálise contra solução de trietilamina 1g% (p/v) durante 24h. Depois de 5h em diálise contra água destilada com três trocas da água de diálise, os polissacarídeos foram liofilizados.

### 3.8.2 METILAÇÃO

O processo de metilação dos polissacarídeos na forma de sal de trietilamônio foi conduzido de acordo com o método de Ciucanu e Kerek (1984).

Após solubilização em DMSO (1mL para cada 15mg de polissacarídeo) adicionou-se NaOH pulverizado e após agitação mecânica vigorosa (30 minutos), foi adicionado iodometano (0,1 mL) sob agitação mecânica vigorosa (30 minutos). Este processo (adição de NaOH e iodometano) foi repetido por mais 2 vezes completando-se assim uma etapa de metilação. A cada etapa as frações foram neutralizadas (ácido acético 50% v/v), dialisadas e liofilizadas, para então serem novamente metiladas. Após cada etapa de metilação as frações polissacarídicas foram hidrolisadas de acordo com o método de Jol *et al.* (1999), acetiladas (anidrido acético/TFA concentrado, a 50°C por 30 minutos) e analisadas por CG-EM, na forma de acetatos de alditóis parcialmente metilados. Para as frações nativas HS-1, HPS e HS-2 foram realizadas duas etapas de metilação.

### 3.9 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

#### 3.9.1 CROMATOGRAFIA LÍQUIDO-GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSA (CG-EM)

Análises realizadas em cromatógrafo a gás, acoplado a um espectrômetro de massa, equipado com coluna capilar de sílica fundida (30m X 0,25 d.i.) DB-225. Nas injeções nas colunas mantém-se a temperatura inicial em 50°C/min, seguido de aumento de acordo com um gradiente programado de 40°C/min, até 230°C, constante a partir deste valor. Gás hélio como gás de arraste (fluxo de 1mL.min<sup>-1</sup>). Áreas dos picos de interesse determinadas por integração em software. Espectros de massa obtidos por impacto de elétrons a 70eV, repetidamente a cada 1/8 de segundo, de m/e (relação carga/massa) 80 a 220. Método utilizado para quantificação de acetatos de alditóis (SLONEKER, 1972), sendo identificados por meio de seus tempos de retenção e perfis característicos de fragmentação por impacto de elétrons, comparado com padrões.

#### 3.9.2 CROMATOGRAFIA DE GEL PERMEAÇÃO (HPSEC-MALLS) E ANÁLISE DE HOMOGENEIDADE

Para as análises de homogeneidade foram preparadas soluções de 2mg das amostras em 1mL de nitrito de sódio (NaNO<sub>3</sub> 0,1M) e azida de sódio (NaN<sub>3</sub> 200ppm) dissolvidas em água MilliQ, previamente filtradas em membranas Millipore (acetato de celulose) de 0,45 e 0,22µm. A análise foi realizada utilizando-se injeções de 500µl de solução em HPLC acoplado a detector de espalhamento de luz, com fluxo de 0,6 mL.min<sup>-1</sup>. As análises de homogeneidade foram realizadas em cromatógrafo de exclusão estérica de alta pressão (HPSEC) WATERS, equipado com um detector de índice de refração diferencial WATERS modelo 2410 e com detector de espalhamento de luz em multiângulos (MALLS) WYATT TECHNOLOGY modelo DAWN DSP com 18 detectores dispostos ao redor da fotocélula em diferentes ângulos. Foram utilizadas 4

colunas de gel permeação WATERS, com limites de exclusão de  $1.10^6$ ,  $4.10^5$ ,  $8.10^4$  e  $5.10^3$ , em série. O eluente utilizado foi uma solução de ( $\text{NaNO}_3$  0,1M) contendo  $\text{NaN}_3$  (200ppm), pressão de 920 psi a  $20^\circ\text{C}$ .

### 3.9.3 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)

As análises de ressonância magnética nuclear (RMN) monodimensionais e bidimensionais foram realizadas em espectroscópio da marca BRUKER, modelo DRX 400, série Avance, em probe de diâmetro externo de 5 mm, com as amostras dissolvidas em água deuterada ( $\text{D}_2\text{O}$ ), a temperatura de  $70^\circ\text{C}$ . Os deslocamentos químicos, expressos em  $\delta$  (ppm), foram determinados utilizando acetona como padrão interno tanto para as análises de  $^{13}\text{C}$  ( $\delta = 30,2$  ppm) como para  $^1\text{H}$  ( $\delta = 2,224$  ppm).

#### 3.9.3.1 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE CARBONO-13 (RMN de $^{13}\text{C}$ )

Os espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  foram obtidos na frequência base de 100,61 MHz, com intervalo de aquisição de sinal de 0,6 segundos, sendo feitas de 4.000 – 100.000 aquisições, utilizando-se um intervalo de 0,1 segundo entre os pulsos.

#### 3.9.3.2 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE PRÓTON (RMN de $^1\text{H}$ )

Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  foram obtidos na frequência base de 400,13 MHz, sendo necessário promover a troca dos hidrogênios das hidroxilas por deutério e a remoção completa das moléculas de água presentes, através da dissolução das frações em  $\text{D}_2\text{O}$ , congelamento e liofilização (este processo foi ser repetido no mínimo por 3 vezes), com a finalidade de diminuir a intensidade do sinal relativo ao OH, o qual prejudica a qualidade do espectro obtido.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 OBTENÇÃO E ANÁLISE DAS FRAÇÕES NATIVAS DE *Halymenia floridana*

#### 4.1.1 EXTRAÇÃO E ANÁLISE QUÍMICA

As extrações da alga *H. floridana*, em temperatura, foram realizadas em soluções tampão, para impedir possíveis variações no pH e conseqüente autohidrólise, como indicado por Miller et al. (1995). Polissacarídeos ácidos, que contêm ácidos urônicos, grupos sulfato ou fosfato, apresentam pH entre 1,5 e 3,0 em solução aquosa. A ocorrência de autohidrólise deve-se ao fato do polissacarídeo apresentar uma ligação glicosídica lábil entre outras mais estáveis. Estas premissas são encontradas nas galactanas, as quais apresentam alto grau de substituição por grupos sulfato e presença de ligações 3,6-anidrogalactosídicas (lábeis em meio ácido), além das ligações galactosídicas estáveis em meio ácido (NOSEDA, 1994).

Portanto, a alga *H. floridana* coletada em Caiobá-PR, foi submetida a duas extrações (1,5 g%) a 80° C, utilizando como solvente tampão fosfato 0,025M, pH 6,5 (Esquema-1).

Os extratos obtidos a 80° C foram centrifugados, concentrados parcialmente à pressão reduzida, e tratados com etanol (3 volumes). Os precipitados etanólicos foram denominados H-1 (24,4% de rendimento, 58,0% de carboidrato; 26,0% de sulfato) e H-2 (11,8% de rendimento, 38,0% de carboidrato e 19,5% de sulfato) (Tabela-1).

O rendimento total em polissacarídeos solúveis em meio aquoso, expressos em termos de alga seca submetida à extração, é de 36,2%, valor maior que a média dos obtidos em outras algas da mesma família. As algas *Cryptonemia crenulata* e *C. seminervis*, renderam aproximadamente 10% em polissacarídeos solúveis, em extrações aquosas à temperatura ambiente e à 80° C, em solução tampão (ZIBETTI, 2005). Portanto pode-se considerar que *H. floridana* apresenta ótimo rendimento em polissacarídeos solúveis em meio aquoso.

ESQUEMA1 - EXTRAÇÃO E FRACIONAMENTO DOS POLISSACARÍDEOS OBTIDOS DA ALGA *Halymenia floridana*

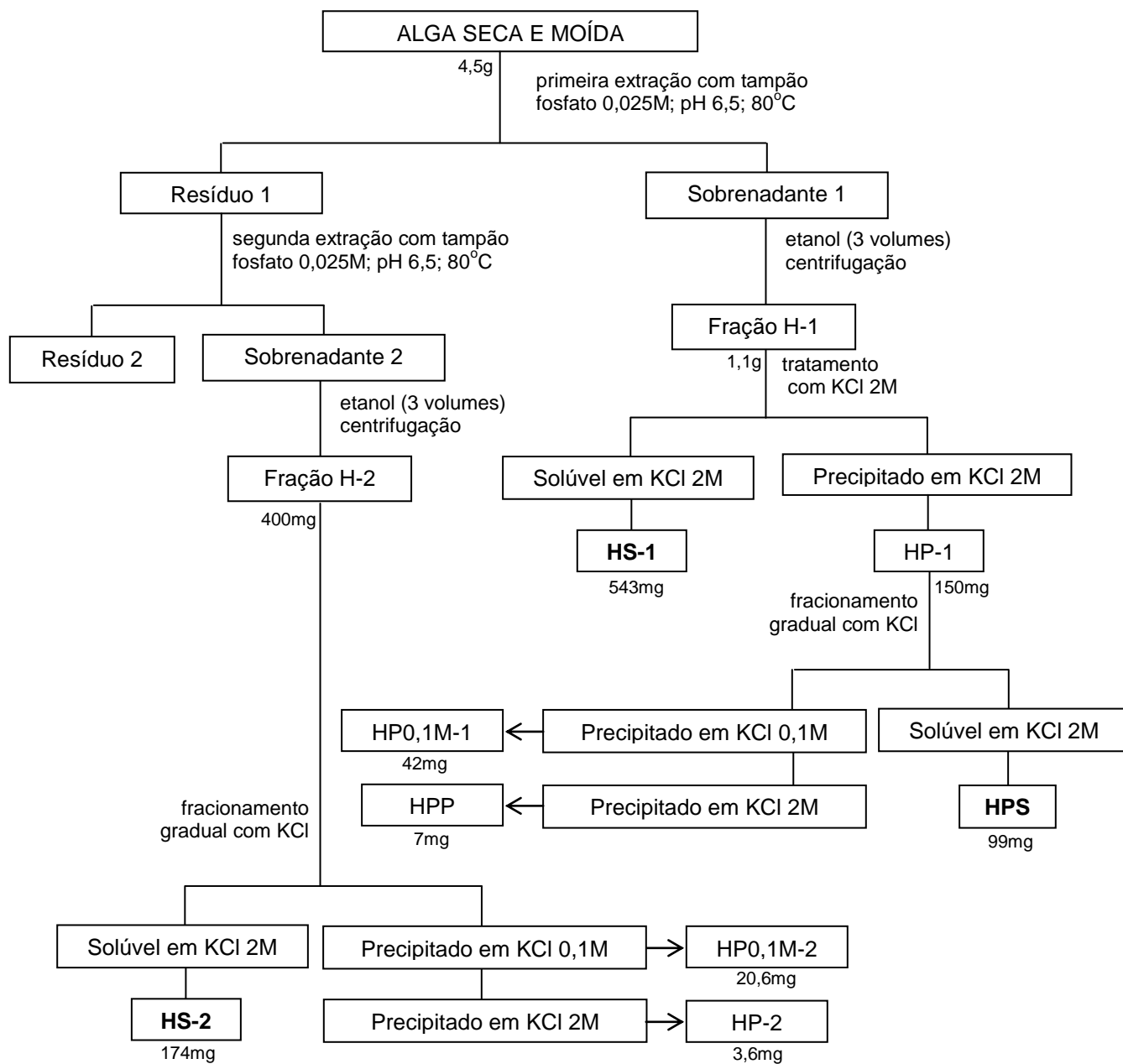


TABELA 1 - RENDIMENTO E ANÁLISES QUÍMICAS DAS FRAÇÕES NATIVAS OBTIDAS DA ALGA *H. floridana*

Fração	Rendimento (%)	Carboidrato <sup>a</sup> (%)	Sulfato <sup>b</sup> (%)	$[\alpha]_D^c$ (°)	Proteína <sup>d</sup> (%)	Ácido Pirúvico <sup>e</sup> (%)
H-1	24,4	58,0	26,0	n.d.	8,3	n.d.
H-2	11,8	38,0	19,5	(+) 21,5	8,8	n.d.

<sup>a,b</sup> Determinado pelos métodos: fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS et al., 1956) e Dodgson (1961), respectivamente.

<sup>c</sup> Rotação óptica específica das frações polissacarídicas na concentração de 0,2 g% em água, à temperatura de 20°C.

<sup>d</sup> Determinado pelo método de dosagem de proteína de Lowry et al., 1951.

<sup>e</sup> Determinado pelo método de dosagem de ácido pirúvico de Koepsell e Sharpe, 1952.

<sup>n.d.</sup> Valores não determinados.

O valor de carboidrato da fração nativa obtida da primeira extração a quente (H-1) apresenta-se de acordo com os valores encontrados para algas da mesma família, em torno de 50-70% (ZIBETTI, 2005). Enquanto que o teor de carboidratos totais na fração H-2, proveniente da segunda extração a quente, constitui-se num valor abaixo da média para extrações com temperatura. Valores em torno de 40% puderam ser observados em extrações aquosas em temperatura ambiente para algas da família Halymeniaceae (ZIBETTI, 2001).

Os teores de sulfato destas frações nativas estão de acordo com os valores de outras galactanas da ordem Halymeniales, as quais possuem cerca de 25% de substituições por grupos sulfato (CHOPIN et al., 1994).

Análises de rotação óptica permitem inferir sobre a enantiomericidade das moléculas. Galactanas do tipo carragenana apresentam rotações óticas positivas com valores absolutos elevados (em torno de +70,0°). Enquanto que galactanas do tipo agarana mostram-se com rotações negativas com valores absolutos também elevados. Desta forma, galactanas do tipo DL-híbridas, que são constituídas por unidades A sempre pertencentes à série estereoquímica D- e unidades B que podem pertencer tanto à série D- quanto L-, resultam em rotações óticas com valores intermediários, indicando a estrutura alternante de unidades B com diferentes enantiomericidades (ESTEVEZ et al., 2001).

Desta forma, o valor em  $+21,5^\circ$  de rotação ótica para a fração nativa H-2 permite inferir sobre seu caráter híbrido, devido ao valor absoluto de leitura ser baixo. Galactanas híbridas extraídas de algas das ordens Halymeniales e Gigartinales também apresentam valores absolutos baixos e positivos (ZIBETTI, 2005; ESTEVEZ et al., 2001).

Ambas as frações nativas (H-1 e H-2) não apresentam teor de proteína significativo. Estes valores estão de acordo com os encontrados para galactanas obtidas em extrações aquosas a  $90^\circ\text{C}$  da alga *G. tortulosus* (ESTEVEZ et al., 2001).

A quantificação de ácido pirúvico, através do método colorimétrico de Koepsell e Sharpe (1952), não foi realizada para as frações nativas. Porém, galactanas extraídas da alga *C. crenulata*, nas mesmas condições de extração dos polissacarídeos da alga em estudo, apresentam entre 2 a 3 mol% deste constituinte (ZIBETTI et al., 2005).

#### 4.1.2 COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA

A composição monossacarídica das galactanas nativas obtidas de *H. floridana* foram realizadas pelo processo de hidrólise redutiva (JOL et al., 1999) e são apresentadas na Tabela-2.

Ambas as frações são constituídas principalmente por galactose (71,4 e 78,5 mol%). A fração HS-2 apresentou unidades de 3,6-anidrogactose em maior proporção do que HS-1, enquanto esta apresentou maior porcentagem das unidades anidrogactosídicas substituídas em C-2 por grupos metil. Poucas unidades de galactose são naturalmente metiladas em C-2 em ambas as frações. Já H-1 apresenta 20,1 mol% de unidades de 6-O-metilgalactose, contra 2,5 mol% destas unidades para a fração H2.

A quantidade de unidades de 3,6-anidrogactose em galactanas de algas vermelhas pode chegar ao máximo em 50 mol%, como é observado na agarose. Porém as galactanas sulfatadas apresentam diversos substituintes, o que causa a diminuição desta porcentagem, sendo que a redução completa das unidades anidrogactosídicas pode ser inibida por unidades substituintes, como grupos sulfato. Isto pode ter ocorrido

nas frações H-1 e H-2, que apresentam baixa porcentagem destas unidades monossacarídicas, portanto a quantidade destes monossacarídeos deve estar subestimada. Por isso, algumas vezes, em frações dessulfatadas observa-se o aumento da porcentagem de unidades de 3,6-anidrogactose.

Em resumo, os monossacarídeos constituintes das frações nativas de *H. floridana* são semelhantes, porém H-2 apresentou 2,3 mol% de xilose e baixo teor de contaminação por “amido das florídeas” (5,2 mol% de glucose), enquanto que em H-1 estes monossacarídeos não foram quantificados.

Amido das florídeas é a denominação dada ao polissacarídeo de reserva das algas vermelhas, constituído por  $\alpha$ -D-glucose com ligações glicosídicas do tipo  $\alpha$ -(1→4) e  $\alpha$ -(1→6), similar a amilopectina (PAINTER, 1983) e pode ser considerado como contaminante pelo fato de não participar na constituição estrutural das galactanas.

TABELA 2 - ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES NATIVAS OBTIDAS DE *H. floridana*

Fração	Composição monossacarídica (mol%)							
	Gal <sup>a</sup>	AG	2AG	2Gal	6Gal	3/4Gal	Xil	Glu
H-1	71,4	2,7	5,8	-	20,1	-	-	-
H-2	78,5	6,6	3,0	1,9	2,5	-	2,3	5,2

<sup>a</sup> Abreviatura dos monossacarídeos (Gal = galactose; AG = 3,6-anidrogactose; 2AG = 3,6-anidro-2-O-metilgalactose; 2Gal = 2-O-metilgalactose; 6Gal = 6-O-metilgalactose; 3/4Gal= 3 e/ou 4-O-metilgalactose; Xil = Xilose e Glu= glucose).

## 4.2 PURIFICAÇÃO E FRACIONAMENTO DAS FRAÇÕES NATIVAS DE *H. floridana*

### 4.2.1 OBTENÇÃO E ANÁLISE QUÍMICA

Para a purificação das frações H-1 e H-2, foram realizados tratamentos com solução de cloreto de potássio.

Íons potássio interagem com regiões negativas de carragenanas com estruturas repetitivas, neutralizando a repulsão e permitindo a formação de duplas-hélices e consequentemente ocasionando a geleificação. Diferentes galactanas, de acordo com o grau de sulfatação, geleificam em diferentes concentrações de KCl (CEREZO, 1967; NOSEDA, 1994). Este método foi descrito para fracionar os diferentes tipos de carragenanas, porém seu uso revelou-se numa ferramenta de purificação, pois também permite a precipitação de elementos pigmentados e proteínas, considerados contaminantes das frações polissacarídicas.

O tratamento com KCl também permite o fracionamento de polissacarídeos sulfatados que contenham manose e xilose. Cardoso et al. (2007), ao utilizarem este tratamento com algas da ordem Ceramiales, isolaram xilomananas sulfatadas que precipitaram com KCl 2M, enquanto na fração solúvel permaneceram, predominantemente, galactanas com estruturas de agarana.

Contanto esta purificação não permite a separação das galactanas e da glucose proveniente do material de reserva das algas, pois, apesar do amido das florídeas ser solúvel em água, este polímero pode ser co-precipitado com galactanas do tipo carragenana em processos de extração e precipitação (VAN DE VELDE et al., 2002).

Desta forma, as frações H-1, HP-1 e H-2 foram solubilizadas em água destilada, na concentração de 0,25g% p/v, e tratadas com KCl. À H-1 foi adicionado KCl 2M diretamente, resultando nas frações HS-1 e HP-1. As frações HP-1 e H-2 foram tratadas com um aumento gradual do sal, até a concentração de 2M (Esquema-1) (CEREZO, 1967), resultando nas frações HPS, HP0,1M-1 e HPP do tratamento da fração HP-1 ressolubilizada e HS-2, HP0,1M-2 e HP-2 do tratamento da fração H-2. A porcentagem da fração polissacarídica H-1 que permaneceu solúvel em KCl 2M foi de 78,0% (HS-1), o rendimento de HPS foi de 66,0% e de HS-2 87,0%. Na Tabela-3

podem ser observados os rendimentos, calculados com relação ao extrato bruto e análises químicas das frações solúveis em KCl 2M obtidas das extrações da alga *H. floridana*.

As frações precipitadas não foram analisadas no presente trabalho.

TABELA 3 - RENDIMENTO E ANÁLISES QUÍMICAS DAS FRAÇÕES SOLÚVEIS EM KCl 2M OBTIDAS DA ALGA *H. floridana*

Fração	Rendimento (%)	Carboidrato <sup>a</sup> (%)	Sulfato <sup>b</sup> (%)	$[\alpha]_D^c$ (°)	Proteína <sup>d</sup> (%)	Ácido Pirúvico <sup>e</sup> (%)
HS-1	78,0	62,0	22,8	(+) 12,0	3,3	4,5
HPS	66,0	56,6	32,0	(+) 36,5	2,5	n.d.
HS-2	87,0	66,7	26,3	(+) 8,5	2,7	n.d.

<sup>a, b</sup> Determinado pelos métodos: fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS et al., 1956) e DODGSON (1961), respectivamente.

<sup>c</sup> Rotação óptica específica das frações polissacarídicas na concentração de 0,2 g% em água, à temperatura de 20°C.

<sup>d</sup> Determinado pelo método de dosagem de proteína de LOWRY et al., 1951.

<sup>e</sup> Determinado pelo método de dosagem de ácido pirúvico de KOEPSSELL & SHARPE, 1952.

n.d. Valores não determinados.

As frações HS-1, HPS e HS-2 apresentaram rendimentos elevados em comparação a galactana solúvel em KCl 2M obtida da extração à quente da alga *G. tortulosus* (ESTEVEZ et al., 2001), enquanto que as galactanas extraídas das algas *C. crenulata* e *C. seminervis* apresentaram rendimentos de aproximadamente 96,0 e 85,0% em solução de KCl 2M (ZIBETTI, 2005).

Os teores de carboidratos das frações solúveis em KCl 2M condizem com os valores encontrados para a alga *C. crenulata*, pertencente à mesma família de *H. floridana*. Estes valores variam em torno de 60% (ZIBETTI, 2001) sendo que as porcentagens de carboidrato são equivalentes para as três frações (62,0; 56,6 e 66,7% para HS-1, HPS e HS-2, respectivamente).

Os altos teores de sulfato presentes nas frações solúveis em KCl 2M, as caracterizam como galactanas sulfatadas (22,8; 32,0 e 26,3% para HS-1, HPS e HS-2, respectivamente), sendo que a fração HPS possui o maior valor, aproximadamente 28% a mais que a média descrita para a ordem. Estes valores apresentam-se mais elevados quando comparados à galactana híbrida solúvel em KCl 2M obtida da extração da alga *G. tortulosus* (Gigartinales) (ESTEVEZ et al., 2001) e semelhantes aos valores obtidos para galactanas das algas *C. crenulata* e *C. seminervis*, pertencentes à ordem Halymeniales (ZIBETTI, 2005).

Grupos sulfato dispostos em diferentes posições, ou a presença de unidades anidrogactosídicas ao invés de unidades de  $\alpha$ -galactose 6-sulfato, podem reduzir as propriedades geleificantes das galactanas de algas marinhas (USOV, IVANOVA; SHASHKOV, 1983). No entanto, grupos sulfato em C-6 de unidades de  $\beta$ -D-galactose não afetam esta propriedade físico-química (USOV; IVANOVA, 1987).

Porém, a presença de grupos sulfato é essencial em atividades biológicas. Como exemplo cita-se o caso da atividade contra o vírus que causa a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA), em que pelo menos dois grupos sulfato, por unidade monossacarídica, são necessários para atividade anti-HIV. O mecanismo provável desta atividade antiviral realizada por polissacarídeos sulfatados deve-se à interação direta do polímero com glicoproteínas virais impedindo assim a interação do vírus com a célula alvo (WITVROUW; DE CLERCQ, 1997).

Quanto às análises de rotação ótica, as frações de *H. floridana* obtidas no tratamento com KCl: HS-1, HPS e HS-2 apresentaram rotações óticas ( $[\alpha]_D$ ) de +12,0; +36,5 e +8,5, respectivamente, características de galactanas DL-híbridas, pois são valores intermediários entre agaranas e carragenanas.

Ainda é possível observar que as proporções de proteínas nas frações nativas e tratadas com KCl são diferenciadas. A redução do teor de proteínas nas frações solúveis em KCl 2M deve-se ao fato da co-precipitação destas juntamente com os géis formados entre as carragenanas que precipitaram.

A substituição por acetal de ácido pirúvico, em polímeros de algas, foi descrita até o momento apenas para os carbonos 4 e 6, formando a unidade 4,6-O-(1'-

carboxietilideno)- $\beta$ -D-galactopiranoose, portanto só ocorre em unidades A de galactanas do tipo agarana (CHOPIN et al., 1994) e carragenana (MILLER et al., 1995).

#### 4.2.2 COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA

A composição monossacarídica das frações solúveis em KCl 2M apresentou-se semelhante à obtida para as frações nativas, porém com porcentagens de alguns monossacarídeos diferenciadas (Tabela-4).

As proporções de galactose não sofreram alteração significativa com relação às frações nativas, porém é visível o aumento do teor de 3,6-anidrogactose nas frações HS-1, HPS e HS-2. Isto condiz com o tratamento em solução de KCl. Pois, agaranas geleificam por conterem altos teores de unidades anidrogactosídicas e baixos teores de sulfato, enquanto que carragenanas formam géis apenas na presença de contra-íons e unidades anidrogactosídicas da série D- (USOV, 1998). Desta forma, estas galactanas extraídas de *H. floridana* permaneceram solúveis em KCl 2M devido a suas estruturas híbridas e porcentagens consideráveis de unidades anidrogactosídicas da série estereoquímica L-, que são de comum ocorrência em algas da ordem Halymeniales (ZIBETTI, 2005).

Contra-pondo-se ao aumento das unidades de 3,6-anidrogactose, as frações solúveis apresentaram redução na quantidade de 2-O-metil-3,6-anidrogactose. Outros tipos de monossacarídeos naturalmente metilados também são observados em baixas porcentagens, como é descrito para galactanas de algas da ordem Halymeniales (ZIBETTI, 2005).

Ainda pode-se notar que a quantidade de glucose também se apresenta reduzida nestas frações, indicando a co-precipitação deste polissacarídeo de reserva.

TABELA 4 - ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES SOLÚVEIS EM KCl 2M OBTIDAS DE *H. floridana*

Fração	Composição monossacarídica (mol%)							
	Gal <sup>a</sup>	AG	2AG	2Gal	6Gal	3/4Gal	Xil	Glu
HS-1	75,0	7,8	1,6	2,2	7,7	1,9	2,1	1,7
HPS	80,5	9,6	1,1	1,0	2,7	1,0	1,1	2,1
HS-2	80,7	8,3	0,9	2,1	2,6	0,8	2,0	2,0

<sup>a</sup> Abreviatura dos monossacarídeos (Gal = galactose; AG = 3,6-anidrogactose; 2AG = 3,6-anidro-2-*O*-metilgalactose; 2Gal = 2-*O*-metilgalactose; 6Gal = 6-*O*-metilgalactose; 3/4Gal= 3 e/ou 4-*O*-metilgalactose; Xil = Xilose e Glu= glucose).

#### 4.2.3 DETERMINAÇÃO DA CONFIGURAÇÃO ENANTIOMÉRICA

A determinação da configuração enantiomérica das unidades monossacarídicas de galactanas é essencial na determinação de suas propriedades.

Assim, as frações solúveis em KCl 2M, HS-1 e HS-2 foram submetidas a derivatização com reagentes quirais para determinação enantiomérica de seus monossacarídeos constituintes. As porcentagens de D- e L-galactose e seus derivados 3-*O*-, 4-*O*- e 6-*O*-metilgalactose foram determinadas utilizando-se o composto quiral (S)-1-amino-2-propanol enquanto que as de 3,6-anidrogactose, seu derivado 2-*O*-metil-3,6-anidrogactose e o derivado 2-*O*-metil-galactose foram determinadas utilizando-se (S)- $\alpha$ -metilbenzilamina (NAVARRO; STORTZ, 2003) como reagente quiral. Os resultados destas análises são apresentados na Tabela-5.

TABELA 5 - ANÁLISE ENANTIOMÉRICA DAS FRAÇÕES HS-1 E HS-2

Fração	Composição monossacarídica (mol%)							
	Gal <sup>a,b</sup>		AG <sup>c</sup>		2Gal <sup>c</sup>			
	D	L	D	L	D	L		
HS-1	54,6	21,7		7,8		2,2		
HS-2	64,0	16,7	0,2	8,1	1,0		1,1	

<sup>a</sup> Abreviatura dos monossacarídeos (Gal = galactose; AG = 3,6-anidrogactose; 2Gal = 2-O-metilgalactose).

<sup>b,c</sup> Análises enantioméricas realizadas pelo método de NAVARRO; STORTZ (2003), para o qual são utilizados diferentes derivados quirais de acordo com as unidades monossacarídicas a serem analisadas (<sup>b</sup>(S)-1-amino-2-propanol e <sup>c</sup>(S)- $\alpha$ -metilbenzilamina).

Unidades de D-galactose são predominantes em ambas as frações (D : L = 54,6:21,7 para HS-1 e 64,0 : 16,7 para HS-2). HS-2 apresenta predomínio de unidades de 3,6-anidro- $\alpha$ -L-galactose (D : L = 0,2 : 8,1), enquanto que unidades de 2-O-metilgalactose estão presentes em quantidades similares neste polissacarídeo (D : L = 1,0 : 1,1). A fração HS-2 apresenta a proporção de unidades D- : L- diferente de 1 : 1, portanto não é agarana e nem carragenana, pois neste último caso há apenas unidades da série D-. Portanto esta galactana é do tipo DL-híbrida, sendo que 55% dela apresenta característica de agarana e 45% de carragenana, o que condiz com o tratamento realizado com íons potássio e com a rotação ótica de + 8,5° desta fração.

Este processo de determinação da enantiomeridade permite confirmar o caráter híbrido destas galactanas fornecendo dados adicionais para a estrutura química fina destes biopolímeros.

### 4.3 ANÁLISES DE HOMOGENEIDADE DAS FRAÇÕES SOLÚVEIS EM KCl 2M

Com a finalidade de se determinar o grau de homogeneidade, as frações HS-1, HPS e HS-2 foram submetidas a cromatografia de exclusão estérica, acoplada a detectores de espalhamento de luz e de índice de refração em HPSEC-MALLS. Os cromatogramas podem ser visualizados nas Figuras-6, 7 e 8, respectivamente.

As frações HS-1 e HPS apresentaram perfis simétricos enquanto HS-2 apresentou ombros, resultado da heterogeneidade e/ou agregação do polímero.

FIGURA 6 - ANÁLISE DE HOMOGENEIDADE DA FRAÇÃO HS-1

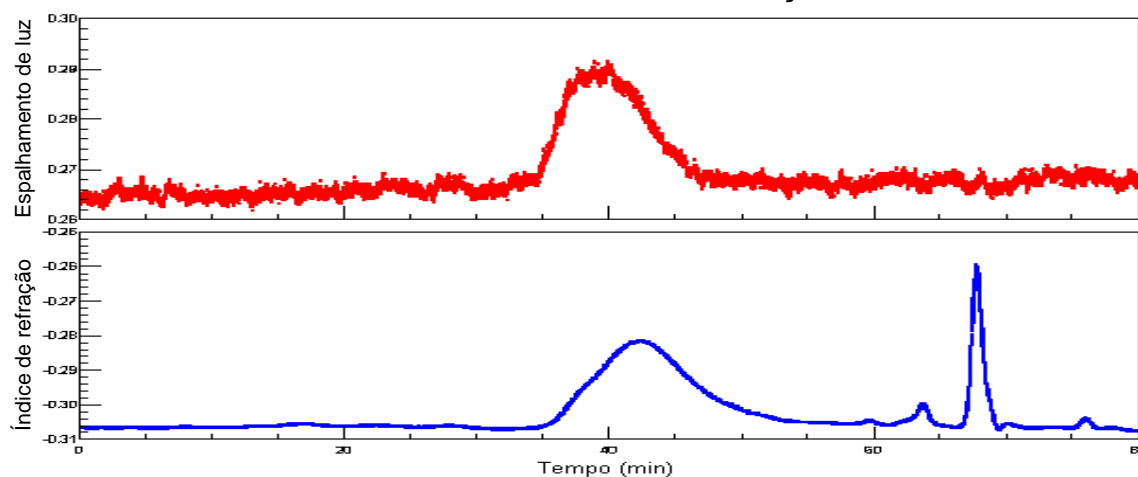


FIGURA 7 - ANÁLISE DE HOMOGENEIDADE DA FRAÇÃO HPS

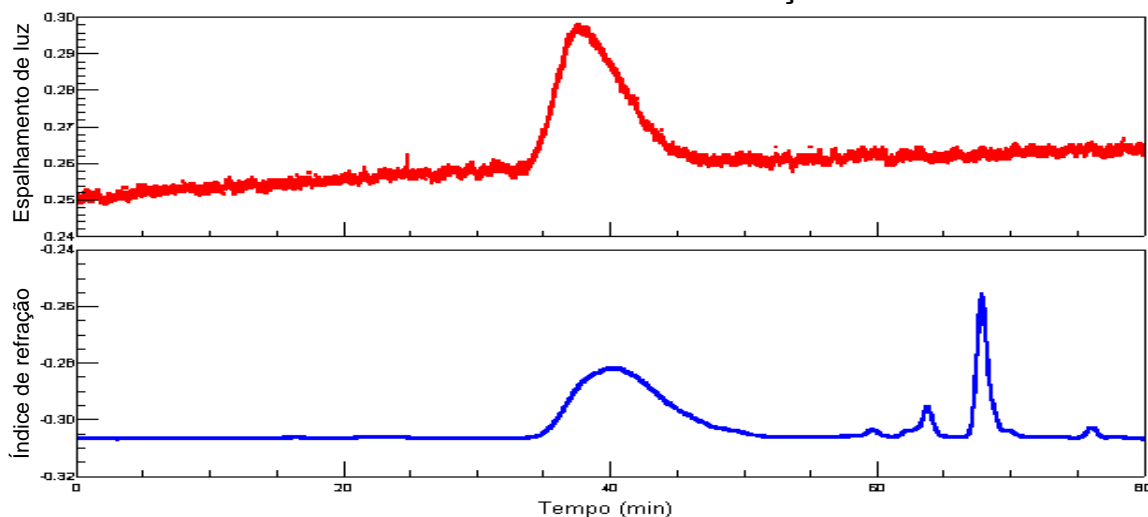
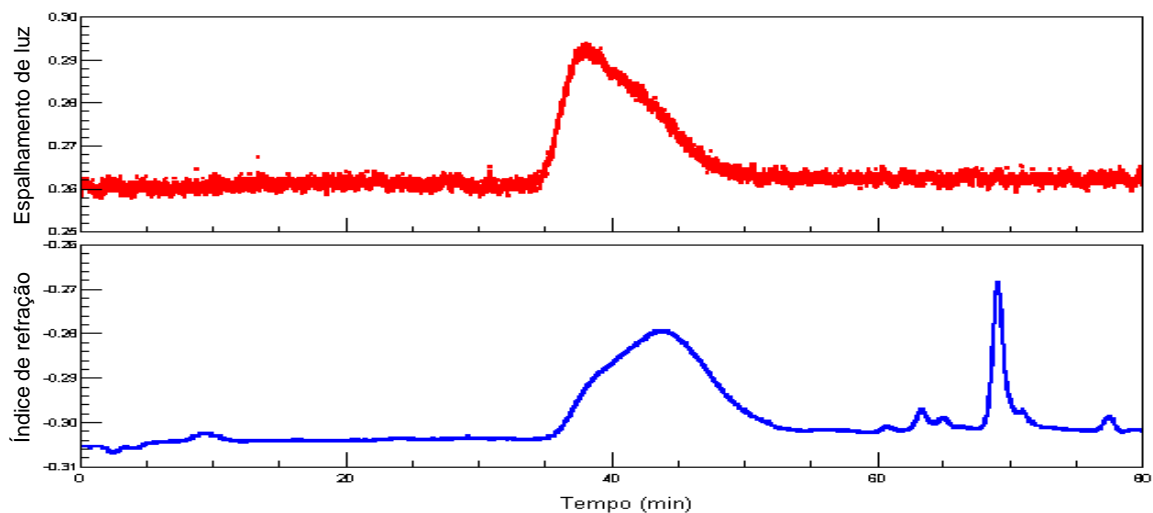


FIGURA 8 - ANÁLISE DE HOMOGENEIDADE DA FRAÇÃO HS-2



#### 4.4 DESSULFATAÇÃO SOLVOLÍTICA DAS FRAÇÕES HS-1, HPS E HS-2

O processo de dessulfatação de galactanas de algas vermelhas é essencial na confirmação da posição dos grupos sulfato substituintes das frações nativas (originais). Para tanto, comparam-se as análises de metilação das frações nativas e dessulfatadas.

Este processo solvolítico também permite a simplificação dos espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$ , posto que espectros de galactanas sulfatadas apresentam-se complexos e de difícil interpretação devido a sobreposição de sinais por causa do elevado teor de sulfato.

Desta forma, os polissacarídeos são transformados em sal de piridônio para então seguir-se a solvólise numa mistura reativa (DMSO:metanol:piridina) aquecida a  $100^{\circ}\text{C}$  por quatro horas (NAGASAWA et al., 1979).

TABELA 6 – PORCENTAGEM DE DESSULFATAÇÃO<sup>a</sup> E RENDIMENTO DAS FRAÇÕES DESSULFATADAS HS-1D, HPS-D E HS-2D

Frações	Sulfato (%)		Dessulfatação (%)	Rendimento (%)	Rendimento corrigido <sup>b</sup> (%)
	Nativa	Dessulfatada			
HS-1	22,8	0,85	96,3	59,1	81,1
HPS	32,0	1,63	94,9	60,3	90,7
HS-2	26,3	3,36	87,2	66,7	89,6

<sup>a</sup> Dessulfatação solvolítica realizada pelo método de NAGASAWA et al., 1979.

<sup>b</sup> Rendimento reconsiderando-se a porcentagem de sulfato perdido durante o processo solvolítico.

As frações HS-1 (22,8% de NaSO<sub>3</sub>), HPS (32,0% de NaSO<sub>3</sub>) e HS-2 (26,3% de NaSO<sub>3</sub>) após dessulfatação solvolítica foram denominadas HS-1D (rendimento de 81,1%), HPS-D (rendimento de 90,7%) e HS-2D (rendimento de 89,6%), respectivamente. A determinação dos teores de sulfato (DODGSON, 1961) das frações dessulfatadas permite indicar diferentes graus de dessulfatação 96,3; 94,9 e 87,2%, respectivamente para cada fração.

Este processo de remoção de grupos sulfato pode causar a degradação do polímero em maior ou menor grau, principalmente em ligações mais lábeis como as anidrogalactosídicas. Desta forma, na Tabela-6 são apresentados os resultados da composição monossacarídica após o processo solvolítico, comparadas com os valores para os polissacarídeos originais.

Desta tabela pode-se concluir que não houve degradação significativa dos polímeros durante o processo solvolítico, pois os valores são similares. Destaca-se que na fração HS-1D o teor de 3,6-anidrogalactose foi mais elevado (7,8 para 11,6 mol%), tal fato pode ser resultado da presença de grupos sulfato no polissacarídeo nativo (original), que dificultou o processo hidrolítico.

TABELA 7 - COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES DESSULFATADAS HS-1D, HPS-D E HS-2D

Fração	Composição monossacarídica (mol%)							
	Gal <sup>a</sup>	AG	2AG	2Gal	6Gal	3/4Gal	Xil	Glu
HS-1D	78,0	11,6	0,9	2,0	2,4	1,3	3,1	0,6
HS-1	75,0	7,8	1,6	2,2	7,7	1,9	2,1	1,7
HPS-D	84,1	9,5	0,5	1,0	1,6	0,2	1,6	1,4
HPS	80,5	9,6	1,1	1,0	2,7	1,0	1,1	2,1
HS-2D	78,9	6,8	3,4	2,9	2,8	1,5	2,6	1,1
HS-2	80,7	8,3	0,9	2,1	2,6	0,8	2,0	2,0

<sup>a</sup> Abreviatura dos monossacarídeos (Gal = galactose; AG = 3,6-anidrogactose; 2AG = 3,6-anidro-2-*O*-metilgalactose; 2Gal = 2-*O*-metilgalactose; 6Gal = 6-*O*-metilgalactose; 3/4Gal= 3 e/ou 4-*O*-metilgalactose; Xil = Xilose e Glu= glucose).

## 4.5 ANÁLISES DE METILAÇÃO

A metilação das frações polissacarídicas HS-1, HPS e HS-2 foi conduzida através do método de Ciucanu e Kerek (1984). Para tornar o polissacarídeo solúvel em DMSO, meio reativo da metilação, foi realizado o tratamento prévio dos polissacarídeos em solução de trietilamina (1g% p/v). Os polissacarídeos na forma de sal de trietilamônio foram submetidos a duas etapas de metilação. Os polissacarídeos metilados foram hidrolisados pelo método hidrólise reductiva total (JOL et al., 1999), acetilados (anidrido acético/TFA concentrado, a 50°C por 30 minutos) e analisados por CG-EM, na forma de acetatos de alditóis parcialmente metilados.

As análises de composição monossacarídica foram realizadas em cromatógrafo a gás, acoplado a um espectrômetro de massa, equipado com coluna capilar de sílica fundida (30m X 0,25 d.i.) DB-225. Esta coluna não permite a separação dos derivados metilados 4,6-MeGal e 3,6-anidrogactose (AG), portanto na quantificação destas unidades foi considerada a composição monossacarídica em termos de 3,6-anidrogactose (~8,0 mol% para HS-1 e 10,0 mol% para HS-2). Para a confirmação destes valores deve ser utilizada a coluna DB-223.

Na Tabela-8 são apresentados os derivados obtidos após metilação das frações HS-1, HPS e HS-2.

### 4.5.1 ANÁLISES DE METILAÇÃO DA GALACTANA HS-1

Como pode ser observado na Tabela-8, o principal derivado obtido entre os produtos de metilação da galactana HS-1 foi a galactose.

A presença de unidades piruvatadas e sulfatadas nesta galactana (análises de RMN de  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$ ) são condizentes com a detecção de galactose.

Esta galactana foi submetida a apenas duas etapas de metilação. Etapas subseqüentes são necessárias para se determinar se o teor de galactose permaneceu constante, validando os resultados presentes, ou se este teor diminuiu, o que demonstraria submetilação.

TABELA 8 - RESULTADOS DAS ANÁLISES DE METILAÇÃO DAS FRAÇÕES HS-1, HPS E HS-2

Derivado Metilado <sup>a</sup>	Unidade correspondente	HS-1	HPS	HS-2
<i>Unidade A</i>				
2,4,6-Gal	Gal	4,1	-	6,5
4,6-Gal	Gal 2-substituída	6,1	-	4,0
2,4-Gal	Gal 6-substituída	2,8	2,3	4,0
Gal	Gal 2,4,6-substituída	37,0	34,9	35,5
<i>Unidade B</i>				
2,3,6-Gal	Gal	1,5	-	4,2
3,6-Gal	Gal 2-substituída	2,5	10,4	5,4
2,6-Gal	Gal 3-substituída	3,7		2,1
2,3-Gal	Gal 6-substituída	-	-	0,9
6-Gal	Gal 2,3-substituída	4,0		3,9
3-Gal	Gal 2,6-substituída	4,6	13,2	9,1
2-Gal	Gal 3,6-substituída	2,3		4,0
2AG	AG	4,5	2,9	2,7
AG	AG 2-substituída	6,0	16,9	6,0
Gal	Gal 2,3,6-substituída	16,0		11,0
<i>Unidades A e/ou B</i>				
2,6-Gal	Gal 4/3-substituída <sup>b</sup>	-	10,6	-
6-Gal	Gal 2,4/2,3-substituída	-	6,5	-
2-Gal	Gal 4,6/3,6-substituída	-	2,3	-
<i>Unidades terminais</i>				
2,3,4-Xil	Terminal não redutor	3,0	-	0,7

<sup>a</sup> Mol% de monossacarídeo contendo grupos O-metil nas posições indicadas

<sup>b</sup> / significa e/ou

No entanto ressalta-se que o sinal correspondente ao grupo metil de acetal de ácido pirúvico (RMN de  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$ ) é de elevada intensidade, o que está de acordo com a elevada porcentagem atribuída a unidades de  $\beta$ -D-galactose piruvatada e sulfatada em C-2, C4 e C-6 (37,0 mol%).

Ainda em termos de galactose entre os produtos de metilação da galactana HS-1, 16 mol% foi atribuído a unidades de  $\alpha$ -galactose trissubstituídas. Este resultado está de acordo com o sinal em 98,3 ppm, presente no espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  desta galactana, o qual poderia indicar unidades de  $\alpha$ -L-galactose 2,3,6-sulfato. A análise de metilação deste polissacarídeo dessulfatado poderá vir a confirmar este resultado.

A presença do derivado 2,4-MeGal e 2,3,4-xilose em porcentagens similares (2,8 e 3,0 mol%, respectivamente) juntamente com o sinal em 103,0 ppm, visível no espectro de  $^{13}\text{C}$  desta fração, indica xiloglicosilação em C-6 das unidades de  $\beta$ -D-galactose.

Além de galactose trissubstituída, como comentado anteriormente, esta galactana apresenta um grande número de monossacarídeos mono (2-O-, 3-O-, 6-O-substituídos) e dissustituídos (2,3-O-, 2,6-O-, 3,6-O-substituídos). As unidades anidrogalactosídicas não substituídas em C-2 e substituídas neste carbono por grupos sulfato encontram-se em uma relação de 1:2 (~3,0 e 6 mol%, respectivamente). Ressalta-se ainda que, dos 4,5 mol% do derivado 2-MeAG, 1,6 mol% é correspondente a unidades anidrogalactosídicas naturalmente metiladas em C-2, de acordo com os dados obtidos na composição monossacarídica (Tabela-4).

A presença de grupos sulfato substituintes pode ser comprovada pelos sinais referentes às díades  $\beta\text{G2S}\rightarrow\text{D2,6S}$ ;  $\beta\text{G2S(P)}\rightarrow\text{D(6S)}$  e  $\beta\text{G4,6S}\rightarrow\text{DA2S}$  que puderam ser assinalados por espectroscopia de RMN de  $^{13}\text{C}$  da galactana HS-1.

Em resumo, as unidades de  $\beta$ -D-galactose 2-sulfato correspondem a, aproximadamente, 86,0% das unidades A, enquanto as unidades B apresentam grande heterogeneidade estrutural. Estas características estruturais são condizentes com galactanas de outras algas da ordem Halymeniales, como *C. crenulata* e *C. seminervis* (ZIBETTI, 2005).

#### 4.5.2 ANÁLISES DE METILAÇÃO DA GALACTANA HPS

A galactana HPS, que também passou por duas etapas de metilação, apresenta um perfil de derivados metilados bem diferenciado da galactana HS-1. De maneira que não foi possível prever a que unidade (A ou B) pertencem todos os derivados metilados, pois o espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  desta fração apresenta apenas dois sinais na região de C-1 (101,8 e 91,7 ppm) e fora da região anomérica, os sinais apresentam-se alargados e sobrepostos.

Devido ao caráter repetitivo destes biopolímeros, em que o somatório das unidades A e B devem resultar numa proporção de 1:1, pode-se atribuir a totalidade do derivado de galactose (34,9 mol%) às unidades A da galactana HPS (Tabela-10). A porcentagem do derivado galactose é similar aos três exemplares de galactanas, o que aliado aos espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$ , confirmam elevados teores de piruvato nas unidades A destas frações.

Na galactana HPS, ainda se destacam as porcentagens dos derivados 3,6-MeGal e 3-MeGal (10,4 e 13,2 mol%, respectivamente), que correspondem a unidades de  $\alpha$ -galactose 2-substituídas e 2,6-substituídas por sulfato, sendo esta última, precursora de unidades anidrogalactosídicas 2-sulfato. Contrapondo-se a isto, tem-se a ausência de unidades precursoras (2,3-MeGal) de 3,6-anidrogalactose.

A porcentagem considerável de unidades de 3,6-anidrogalactose 2-substituídas (16,9 mol%) e a similaridade estrutural da galactana HPS com a HS-1 observada nos espectros destas frações dessulfatadas, comprovam a elevada quantidade destas unidades substituídas por sulfato em C-2 na galactana HPS. De acordo com a composição monossacarídica, apenas 1,1 mol% destas unidades são substituídas por grupos metil, formando unidades de 2-O-metil-3,6-anidrogalactose. Desta forma, a galactana HPS totaliza 15,8 mol% de unidades de 3,6-anidrogalactose 2-sulfato, o equivalente a 31,6% de unidades anidrogalactosídicas sulfatadas em C-2.

Outros derivados metilados (2,6-MeGal, 6-MeGal e 2-MeGal) não puderam ser atribuídos às unidades A ou B, devido a supressão dos sinais anoméricos no espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da fração HPS nativa.

#### 4.5.3 ANÁLISES DE METILAÇÃO DA GALACTANA HS-2

De maneira similar a HS-1, a fração HS-2 apresenta-se constituída, majoritariamente, por  $\beta$ -D-galactose e  $\alpha$ -L-galactose trissubstituídas (35,5 e 11,0 mol%, respectivamente). Destaca-se também para esta galactana, o valor do derivado 3-MeGal (9,1 mol%), correspondente a unidades precursoras de 3,6-anidrogalactose 2-sulfato, em contraposição ao valor de 0,9 mol% correspondente a unidades que originam o monossacarídeo 3,6-anidrogalactose.

Os demais derivados metilados mono e disubstituídos obtidos de HS-2 apresentam poucas diferenças com relação aos derivados da galactana HS-1, o que aponta para a similaridade entre estas galactanas.

Desta forma, as galactanas de *H. floridana* são constituídas principalmente por unidades de  $\beta$ -D-galactose 2-sulfato piruvatadas (34,9 - 37,0 mol%).

As unidades B nestas galactanas são representadas por uma grande variedade de unidades galactosídicas e anidrogalactosídicas. Nas galactanas HS-1 e HS-2 estas estão majoritariamente representadas por unidades trissulfatadas (11,0 e 16,0 mol%), enquanto que a fração HPS contém principalmente unidades B 2-sulfatadas (anidrogalactosídicas e galactosídicas).

Ressalta-se, ainda, que nas três galactanas estudadas, a porcentagem de unidades precursoras de 3,6-anidrogalactose é nula ou menor que 1,0 mol%. No entanto unidades precursoras de 3,6-anidrogalactose 2-sulfato são mais elevadas, nas galactanas HPS e HS-2 (13,2 e 9,1 mol%, respectivamente) que na galactana HS-1 (4,6 mol%).

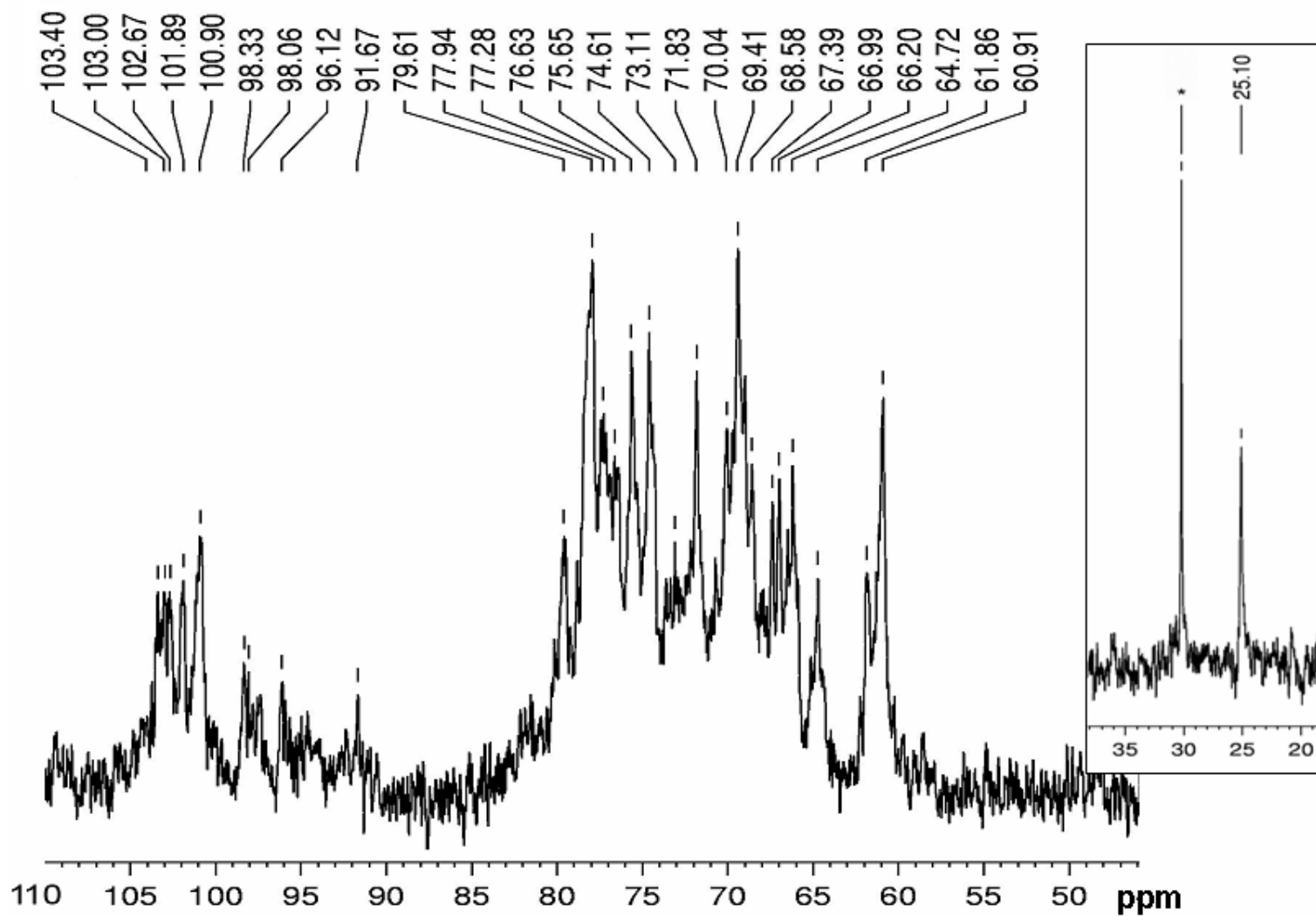
#### 4.6 ESPECTROSCOPIA DE RMN DE $^{13}\text{C}$ E $^1\text{H}$ DAS FRAÇÕES HS-1 E HS-1D

A galactana HS-1 foi submetida a análise de RMN de  $^{13}\text{C}$ , originando o espectro da Figura-9. O espectro de  $^{13}\text{C}$  desta fração revela sinais alargados na região anomérica, principalmente entre 100 – 103 ppm, indicando a sobreposição dos sinais nesta região. Na região entre 60 e 80 ppm, onde há sinais correspondentes aos carbonos 2 a 6, também se pode observar picos pouco definidos e sobrepostos. Isto se deve as estruturas complexas das galactanas sulfatadas (CHOPIN et al., 1999), que apresentam diversos substituintes, como os grupos sulfato, que causam variações nos deslocamentos químicos.

No entanto, no espectro de HS-1 é possível observar a presença de um sinal intenso em 100,9 ppm, que corresponde ao C-1 das unidades de  $\beta$ -D-galactose 2-sulfato, substituídas ou não por acetal de ácido pirúvico nos carbonos 4 e 6 [ $\beta\text{G}2\text{S}(\text{P})$ ]. Correlacionado a esta unidade 2-sulfatada, pode-se destacar o sinal em 78,0 ppm fora da região anomérica, correspondente ao C-2 substituído por sulfato (MILLER; BLUNT, 2000). A presença de  $\beta$ -D-galactose 2-sulfato piruvatada é comprovada pelo sinal em 25,1 ppm, referente ao carbono metílico deste substituinte. A presença de unidades A, na forma de  $\beta$ -D-galactose 2-sulfato piruvatada ou não, condiz com os resultados encontrados para algas do gênero *Cryptonemia*, família Halymeniaceae (ZIBETTI, 2005).

O sinal em 96,1 ppm corresponde ao C-1 de unidades de  $\alpha$ -D-galactose, sulfatadas em C-6 ou não substituídas neste carbono [ $\alpha\text{DG}(6\text{S})$ ]. Estas unidades estão ligadas a  $\beta\text{DG}2\text{S}(\text{P})$ , constituindo a díade  $\beta\text{DG}(\text{P})\rightarrow\alpha\text{-DG}(6\text{S})$ . De acordo com os dados de metilação (item 4.5), as unidades B desta díade não são sulfatadas em C-6 ou apresentam baixas porcentagens de substituição, pois o derivado 2,3-MeGal, que corresponde a unidades de  $\alpha$ -D-galactose 6-substituídas não foi obtido entre os produtos de metilação.

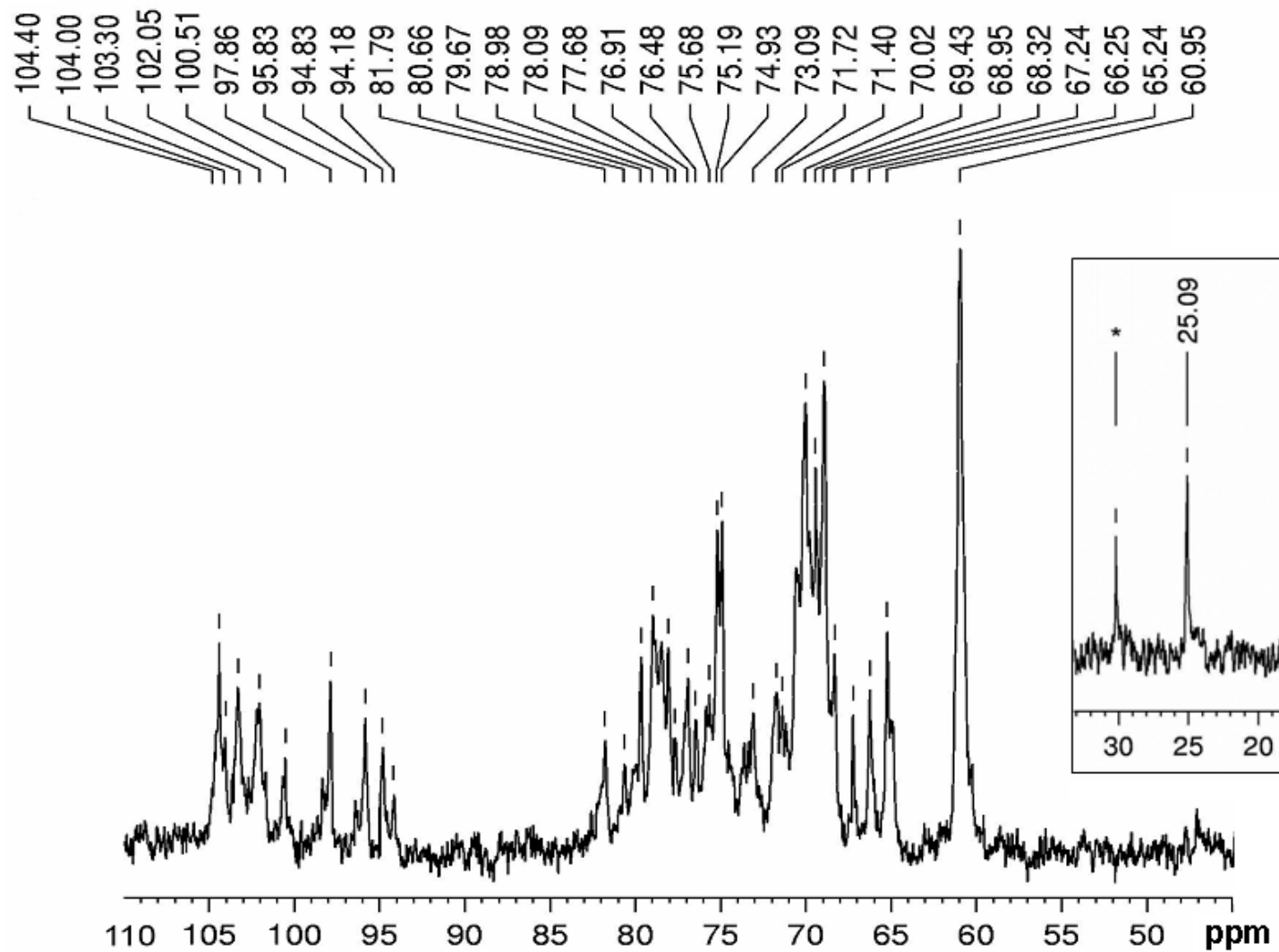
FIGURA 9 - ESPECTRO DE RMN DE  $^{13}\text{C}$  DA FRAÇÃO HS-1



Análise realizada à 70°C em  $\text{D}_2\text{O}$ , concentração das amostras 40mg/mL.

\* Padrão interno (acetona = 30,2 ppm)

FIGURA 10 - ESPECTRO DE RMN DE  $^{13}\text{C}$  DA FRAÇÃO HS-1D



Análise realizada à 70°C em  $\text{D}_2\text{O}$ , concentração das amostras 40mg/mL.

Ainda, na região anomérica do espectro da Figura-9, é possível identificar o sinal em 101,9 ppm correspondente ao C-1 de unidades  $\beta$ -D-galactose ( $\beta$ DG) ligadas a unidades anidrogalactosídicas. Correspondente a esta última unidade, observam-se os sinais em 98,1 e 98,3 ppm, os quais podem ser atribuídos ao carbono anomérico de unidades de 3,6-anidro- $\alpha$ -L-galactose em diferentes ambientes químicos ( $\alpha$ LAG). Estes sinais permitem assinalar a díade  $\beta$ DG $\rightarrow$  $\alpha$ LAG (DUARTE et al., 2002). Esta díade também foi descrita na caracterização estrutural das galactanas sulfatadas das algas *C. crenulata* e *C. seminervis*, onde as unidades anidrogalactosídicas apresentaram-se parcialmente substituídas em C-2 por grupos sulfato ou metil (ZIBETTI, 2005). A composição monossacarídica indicou a presença do monossacarídeo 3,6-anidro-2-O-metil- $\alpha$ -L-galactose em baixas proporções (~1,0 mol%) para as três galactanas.

Além disso, foi possível identificar que a galactana HS-1 contém unidades de  $\beta$ -D-galactose 2-sulfato ( $\beta$ DG2S) (C-1 em 103,4 ppm) ligadas a unidades de  $\alpha$ -D-galactose 2,6-sulfato ( $\alpha$ DG2,6S) (C-1 em 91,7 ppm). Estes assinalamentos estão de acordo com os obtidos por Falshaw e Furneaux (1994) na análise de RMN da  $\lambda$ -carragenana de *Gigartina decipiens*. Sobreposto ao sinal em 91,7 ppm, ainda pode estar o sinal referente ao C-1 de unidades anidrogalactosídicas pertencentes à série estereoquímica D- sulfatadas em C-2 (FALSHAW et al., 2003).

A absorção em 102,7 ppm foi assinalada como referente ao C-1 de unidades de  $\beta$ -D-galactose 4,6-sulfatada ( $\beta$ DG4,6S) ligadas a unidades de 3,6-anidro- $\alpha$ -D-galactose 2-sulfato ( $\alpha$ DAG2S) (C-1 em 91,7 ppm) (LIAO et al., 1996). Esta díade, incomum em algas da ordem Halymeniales, foi encontrada em *Phacelocarpus peperocarpos*, da ordem Gigartinales (Rhodophyta), a qual engloba algas conhecidas como típicas produtoras de carragenanas (LIAO et al., 1996).

Ainda na região anomérica, do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de HS-1, observa-se o sinal em 103,0 ppm que pode ser atribuído ao C-1 de unidades de xilose como terminal não redutor em C-6 das unidades de  $\beta$ -D-galactose, o que pode ser comprovado pela análise de metilação (item 4.8).

O espectro da fração HS-1 dessulfatada apresenta-se mais simplificado, devido a remoção dos grupamentos sulfato. Tanto a região anomérica quanto a região dos carbonos 2 a 6 apresentam sinais mais definidos. Algumas alterações, entre os

espectros da fração nativa e dessulfatada, permitem demonstrar a eficiência da dessulfatação, pois o intenso sinal em 100,9 ppm desaparece no espectro da fração dessulfatada HS-1D (Figura-10), enquanto que os sinais em 103,4 ppm ( $\beta$ DG2S) e 91,7 ppm ( $\alpha$ DG2,6S e  $\alpha$ DAG2S) também são reduzidos. Além disso, o sinal em 78,0 ppm referente ao C-2 sulfatado desaparece em detrimento de um novo sinal intenso em 70,0 ppm, referente ao C-2 não substituído. Estes deslocamentos em C-2 estão de acordo com o efeito  $\alpha$  (+8 ppm), em função da presença do grupo sulfato neste carbono. Após dessulfatação também foi observado o aumento do sinal em 60,9 ppm, atribuído ao C-6 livre, o que concorda com a presença de unidades 6-sulfatadas no polímero nativo.

Adicionado a isso, as análises do espectro da fração HS-1D confirmam o caráter híbrido desta galactana pela presença de díades características, onde as unidades B, anidrogalactosídicas e galactosídicas, pertencem a ambas as séries estereoquímicas. Neste contexto, destaca-se a presença do sinal em 102,0 ppm, o qual corresponde ao C-1 das unidades de  $\beta$ -D-galactose ligadas a unidades de 3,6-anidro- $\alpha$ -L-galactose, cujo sinal aparece em 97,9 ppm e 3,6-anidro- $\alpha$ -D-galactose (C-1 em 94,2 ppm) (DUARTE et al., 2002). A galactana HS-1, assim como a galactana sulfatada de *C. crenulata* (Halymeniales), apresenta unidades de 3,6-anidrogalactose pertencentes a série estereoquímica D- (ZIBETTI et al., 2005). Estes resultados foram comprovados por análises espectroscópicas de  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$ , bem como pelas análises de enantiomericidade (item 4.2.3).

Outros tipos de díades características de agaranas e carragenanas também foram identificadas nesta galactana. Os sinais em 103,3 e 104,4 ppm correspondem a unidades de  $\beta$ -D-galactose ( $\beta$ DG) ligadas a  $\alpha$ -L-galactose ( $\alpha$ LG) (C-1 em 100,5 ppm) (DUARTE et al., 2002) e  $\alpha$ -D-galactose ( $\alpha$ DG) (C-1 em 95,8 ppm) (USOV et al., 1980), respectivamente. Nesta última díade ( $\beta$ -D-galactose ligada a  $\alpha$ -D-galactose) as unidades A podem estar substituídas em C-4 e C-6 por acetal de ácido pirúvico. Por isso o sinal de C-1 da unidade A piruvatada é deslocado em -0,4 ppm, de acordo com a presença do sinal em 104,0 ppm, enquanto o sinal do carbono anomérico da unidade B nesta díade é deslocado em -1 ppm (C-1 em 94,8 ppm) (FALSHAW et al., 2003). O carbono acetálico do substituinte acetal de ácido pirúvico pode ser assinalado em 100,5 ppm,

juntamente com o C-1 das unidades de  $\alpha$ -L-galactose (DUARTE et al., 2002; GORIN et al., 1982).

Além do assinalamento destas díades, o espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da fração HS-1D permitiu apontar algumas informações adicionais fora da região anomérica (Tabela-7).

A presença do substituinte acetal de ácido pirúvico nas unidades de  $\beta$ -D-galactose pode ser comprovada pelos sinais dos carbonos 4, 5 e 6, assinalados em 67,2; 66,2 e 65,2 ppm, respectivamente (FALSHAW et al., 2003). O C-3 destas unidades substituídas corresponde ao sinal em 79,0 ppm (FALSHAW et al., 2003), enquanto as unidades não piruvatadas são assinaladas pela absorção em 81,8 ppm.

Os carbonos 4 e 5 das unidades de  $\beta$ -D-galactose não piruvatadas são observados em 65,2 e 74,9 ppm, respectivamente (USOV et al., 1980).

Unidades de  $\beta$ -D-galactose ligadas a 3,6-anidrogactose apresentam os sinais de C-4 e C-5 em 68,3 e 75,2 ppm, respectivamente. Caso unidades de 3,6-anidro- $\alpha$ -L-galactose estejam ligadas a  $\beta$ -D-galactose piruvatada, o sinal do C-4 em 75,2 ppm é deslocado para a região de 71,4 – 71,7 ppm (USOV; SHASHKOV, 1985; LAHAYE et al., 1989), como observado no espectro da Figura-10.

Foi possível assinalar também alguns carbonos das unidades ciclizadas em forma de 3,6-anidrogactose, sendo que o C-3 apresenta o mesmo sinal tanto para unidades da série estereoquímica D- quanto L- (C-3 em 79,7 ppm). Em 69,4 ppm pode-se observar o sinal referente ao C-2 das unidades de 3,6-anidro- $\alpha$ -L-galactose ligadas a  $\beta$ -D-galactose, enquanto que os valores em 76,9 e 68,9 ppm são atribuídos aos carbonos 4 e 6 desta unidade anidrogactosídica (LAHAYE et al., 1989; FALSHAW et al., 2003; USOV; SHASHKOV, 1985).

No entanto, unidades de 3,6-anidro- $\alpha$ -D-galactose ligadas a  $\beta$ -D-galactose apresentam sinais diferenciados, o que permite identificar díades que correspondem ao caráter híbrido desta galactana. Aos carbonos 4 e 6 das unidades de 3,6-anidro- $\alpha$ -D-galactose podem ser atribuídos os sinais em 78,1 e 68,9 ppm, respectivamente. A absorção referente ao C-5 aparece em 76,5 ppm, sendo que quando a unidade anidrogactosídica liga-se a uma unidade A piruvatada este valor sofre um

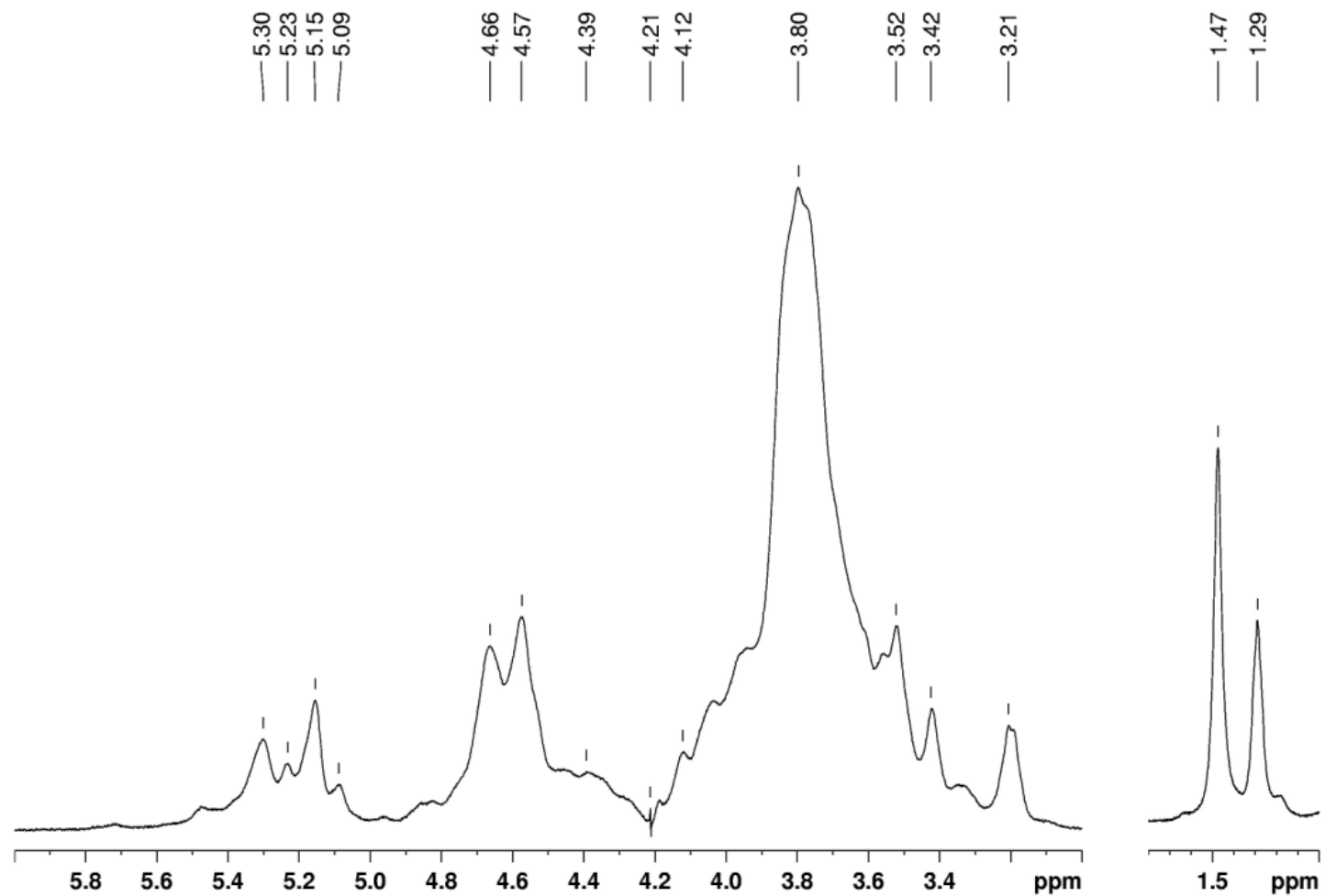
deslocamento de -1 ppm (75,5 ppm) (USOV; SHASHKOV, 1985; FALSHAW et al., 2003), como pode ser observado na Figura-10.

No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da fração dessulfatada HS-1D (Figura-11), o acetal de ácido pirúvico também pode ser detectado através do sinal em 1,47 ppm, referente aos prótons do carbono metílico deste substituinte. Este espectro ainda permite o assinalamento dos prótons das unidades de  $\alpha$ -D-galactose ligada a unidades de  $\beta$ -D-galactose piruvatada (H-1 em 5,30 ppm) e não piruvatada (H-1 em 5,15 ppm). Unidades anidrogalactosídicas pertencentes à série L-, também correspondem ao sinal em 5,15 ppm, enquanto as pertencentes à série D-, aparecem em 5,09 ppm (MURANO et al., 1993; USOV, 1984; MAZUMDER et al., 2002). Os sinais dos prótons dos grupamentos metil substituintes em C-6, podem ser observados em 3,42 ppm (MAZUMDER et al., 2002). Desta forma, o espectro de prótons, assim como o de  $^{13}\text{C}$ , comprovam o caráter híbrido da galactana HS-1.

A determinação da enantiomericidade desta galactana, a caracteriza como do tipo DL-híbrida. Destaca-se que as galactanas DL-híbridas isoladas de algas da ordem Halymeniales correspondem aos polissacarídeos majoritários que são solúveis em meio aquoso. Diferentemente, algumas algas carragenófitas ou agarófitas também produzem galactanas DL-híbridas, mas em baixas porcentagens (ESTEVEZ et al., 2001).

As características desta galactana majoritária DL-híbrida HS-1, condizem com o padrão estrutural genérico delineado para as galactanas sulfatadas, biossintetizadas por algas da ordem Halymeniales. Pois apresentam altas porcentagens de  $\beta$ -D-galactose 2-sulfato em suas unidades A, além da substituição destas por acetal de ácido pirúvico. A pequena proporção de unidades de galactose naturalmente metiladas em diferentes posições também é destacada, contrapondo-se aos altos teores de sulfato descritos para a ordem.

FIGURA 11 - ESPECTRO DE RMN DE  $^1\text{H}$  DA FRAÇÃO HS-1D



Análise realizada à 70°C em  $\text{D}_2\text{O}$ , concentração das amostras 40mg/mL.

TABELA 9 - ANÁLISE DE RMN DE  $^{13}\text{C}$  E  $^1\text{H}$ : DÍADES<sup>a</sup> PRESENTES NAS FRAÇÕES NATIVA HS-1 E DESSULFATADA HS-1D

Carbono	NATIVA				DESSULFATADA				
	G2S→D2,6S <sup>b</sup>	G2S(P)→D(6S) <sup>c</sup>	G→LA <sup>d</sup>	G4,6S→DA2S <sup>e</sup>	GP→D <sup>f</sup>	G→D <sup>g</sup>	G→L <sup>h</sup>	G→DA <sup>i</sup>	G(P)→LA <sup>j</sup>
Unidade A									
C-1	103,4	100,9	101,9	102,7	104,0	104,4	103,3	102,0	102,0
C-2									
C-3					75,7	79,0			
C-4					67,2	65,2		68,3	68,3 <sup>3</sup>
C-5					66,2	74,9		75,2	75,2
C-6					65,2				
Unidade B									
C-1	91,7	96,1	98,3 e 98,1	91,7	94,8	95,8	100,5 <sup>k</sup>	94,2	97,9
C-2									69,4
C-3								79,7	79,7
C-4								78,1	76,9
C-5								76,5	
C-6								68,9	68,9

<sup>a</sup> Abreviatura das díades constituintes consta na lista de abreviatura e siglas.

<sup>b</sup> FALSHAW e FURNEAUX, 1994.

<sup>c</sup> MILLER e BLUNT, 2000.

<sup>d</sup> DUARTE et al., 2002.

<sup>e</sup> LIAO et al., 1996.

<sup>f</sup> FALSHAW et al., 2003.

<sup>g</sup> FALSHAW et al., 2003; USOV et al., 1980.

<sup>h</sup> USOV et al., 1980.

<sup>i</sup> DUARTE et al., 2002; FALSHAW et al., 2003; USOV e SHASHKOV, 1985.

<sup>j</sup> DUARTE et al., 2002; LAHAYE et al., 1989; FALSHAW et al., 2003; USOV e SHASHKOV, 1985.

<sup>k</sup> O sinal em 100,5 ppm também corresponde ao carbono acetálico do acetal de ácido pirúvico (GORIN, 1982).

#### 4.7 ESPECTROSCOPIA DE RMN DE $^{13}\text{C}$ E $^1\text{H}$ DAS FRAÇÕES HPS E HPS-D

Assim como HS-1, a galactana HPS apresenta sinais de acetal de ácido pirúvico. No espectro da fração nativa HPS (Figura-12) pode ser observado o sinal do carbono metílico deste substituinte em 25,0 ppm. Diferentemente do espectro de HS-1, este espectro apresenta apenas dois sinais bem definidos na região anomérica em 101,8 e 91,7 ppm, entre outras absorções que se constituem em sinais de menor intensidade e nitidez entre as regiões de 102 – 105 ppm e 93 – 96 ppm. O intervalo que compreende a região de carbonos 2 a 6 também se apresenta com sinais alargados e sobrepostos.

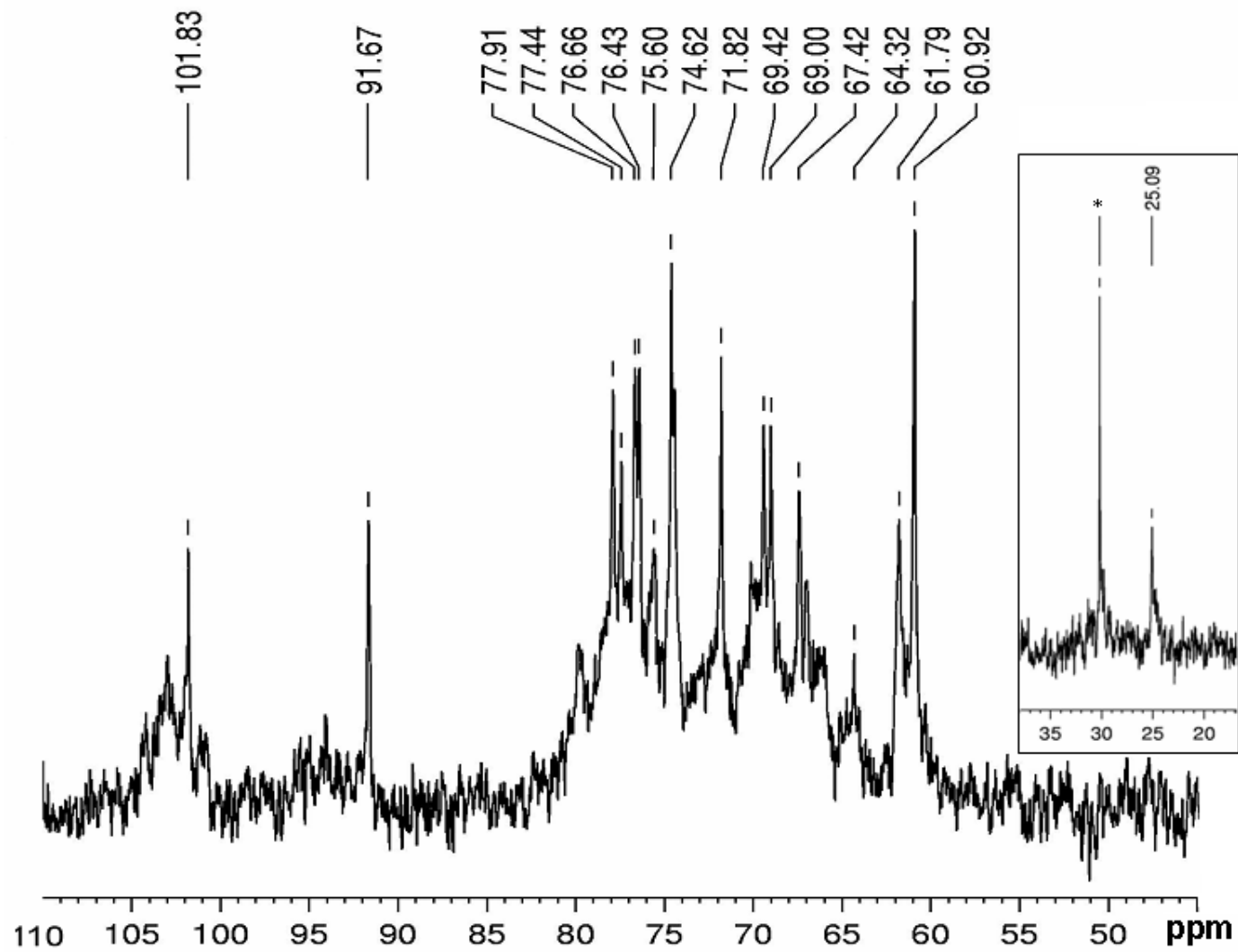
Os espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  de galactanas extraídas de algas da ordem Halymeniales, referidos na literatura, são complexos e de difícil interpretação, sendo que muitas vezes apenas o espectro da fração dessulfatada permite interpretação (SEN et al., 2002).

Isto pode ser observado na fração HPS, em que somente após o processo de dessulfatação, foi possível a simplificação do espectro de  $^{13}\text{C}$  e interpretação de algumas díades presentes na fração dessulfatada HPS-D (Figura-13).

A região anomérica do espectro de HPS-D permite assinalar díades equivalentes às encontradas para a fração dessulfatada HS-1D (Figura-9). Desta forma são assinaladas unidades de  $\beta$ -D-galactose ( $\beta$ DG) (C-1 em 102,2 ppm) ligadas a unidades de 3,6-anidro- $\alpha$ -D-galactose ( $\alpha$ DAG) (C-1 em 94,2 ppm) e 3,6-anidro- $\alpha$ -L-galactose ( $\alpha$ LAG) (C-1 em 97,92 ppm) (USOV; SHASHKOV, 1985). Esta galactana, da mesma forma que HS-1, apresenta também unidades anidrogalactosídicas pertencentes a série D-.

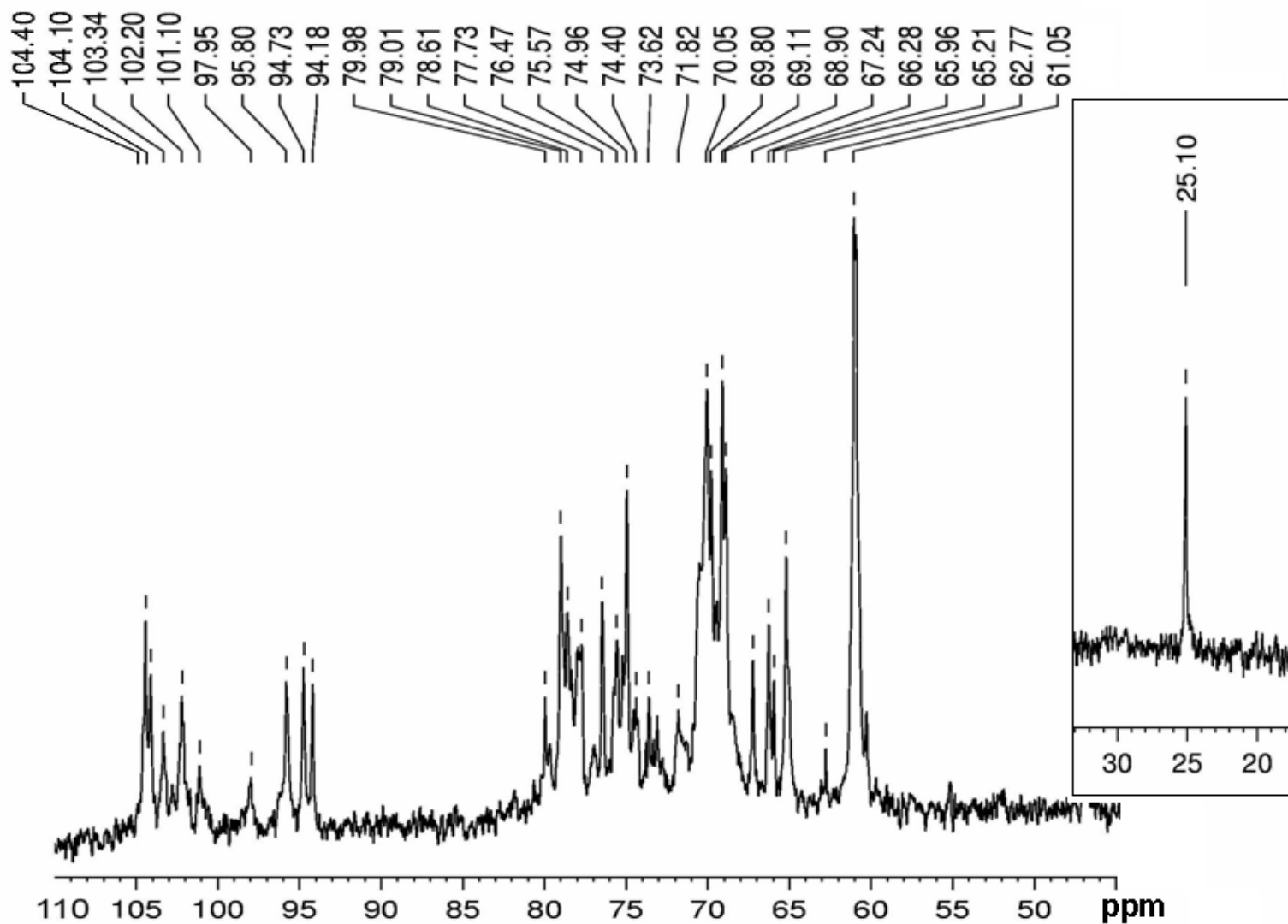
Unidades B pertencentes a diferentes séries enantioméricas são comprovadas pela especificidade de absorções das unidades A, como o sinal em 103,3 ppm referente a unidades de  $\beta$ -D-galactose ligadas a  $\alpha$ -L-galactose (C-1 em 101,1 ppm), que se distingue do sinal em 104,4 ppm, indicativo da presença de unidades de  $\beta$ -D-galactose ligadas a  $\alpha$ -D-galactose (C-1 em 95,8 ppm) (DUARTE et al., 2002).

FIGURA 12 - ESPECTRO DE RMN DE  $^{13}\text{C}$  DA FRAÇÃO HPS



Análise realizada à 70°C em  $\text{D}_2\text{O}$ , concentração das amostras 40mg/mL.

FIGURA 13 - ESPECTRO DE RMN DE  $^{13}\text{C}$  DA FRAÇÃO HPS-D



Análise realizada à 70°C em  $\text{D}_2\text{O}$ , concentração das amostras 40mg/mL.

As unidades de  $\beta$ -D-galactose ligadas a  $\alpha$ -D-galactose ainda podem apresentar-se piruvatadas, originando os sinais em 104,1 e 94,7 ppm referentes, respectivamente, ao C-1 da unidade A piruvatada e ao C-1 da unidade B ( $\alpha$ -DG) (FALSHAW et al., 2003; USOV et al., 1980). Neste caso o efeito  $\beta$  (-1 ppm) permite a distinção de unidades de  $\alpha$ -D-galactose ligadas a unidades A piruvatadas (C-1 em 94,7 ppm) ou não (C-1 em 95,8 ppm).

O espectro da fração dessulfatada HPS-D (Figura-13) também permite o assinalamento de alguns carbonos, fora da região anomérica (Tabela-8):

1.  $\beta$ -D-galactose (C-1, C-3 e C-4 em 104,4; 79,0 e 65,2 ppm, respectivamente) ligadas a  $\alpha$ -D-galactose (C-1 e C-4 em 95,8 e 78,6 ppm, respectivamente) (USOV et al., 1980).

2.  $\beta$ -D-galactose piruvatada (C-1, C-4, C-5 e C-6 em 104,1; 67,2; 66,3 e 65,2 ppm, respectivamente) ligada a unidades de  $\alpha$ -D-galactose (C-1 em 94,7 ppm) (MILLER; BLUNT, 2000; FALSHAW et al., 2003; USOV et al., 1980).

3.  $\beta$ -D-galactose (C-1, C-2 e C-5 em 102,2; 69,1 e 75,0 ppm, respectivamente) ligadas a 3,6-anidro- $\alpha$ -D-galactose (C-1, C-5 e C-6 em 94,2; 76,5 e 69,1 ppm, respectivamente) (USOV; SHASHKOV, 1985; LAHAYE et al., 1989).

4.  $\beta$ -D-galactose piruvatada ou não (C-1 e C-5 em 102,2 e 75,0 ppm, respectivamente) ligadas a 3,6-anidro- $\alpha$ -L-galactose (C-1, C-2, C-4, C-5 e C-6 em 97,9; 69,8; 77,7; 75,6 e 69,1 ppm, respectivamente) (USOV; SHASHKOV, 1985; LAHAYE et al., 1989).

Além destes, pode-se atribuir, respectivamente, os sinais em 70,0 e 80,0 ppm aos C-2 e C-3 de unidades de  $\beta$ -D-galactose não substituídas nestes carbonos.

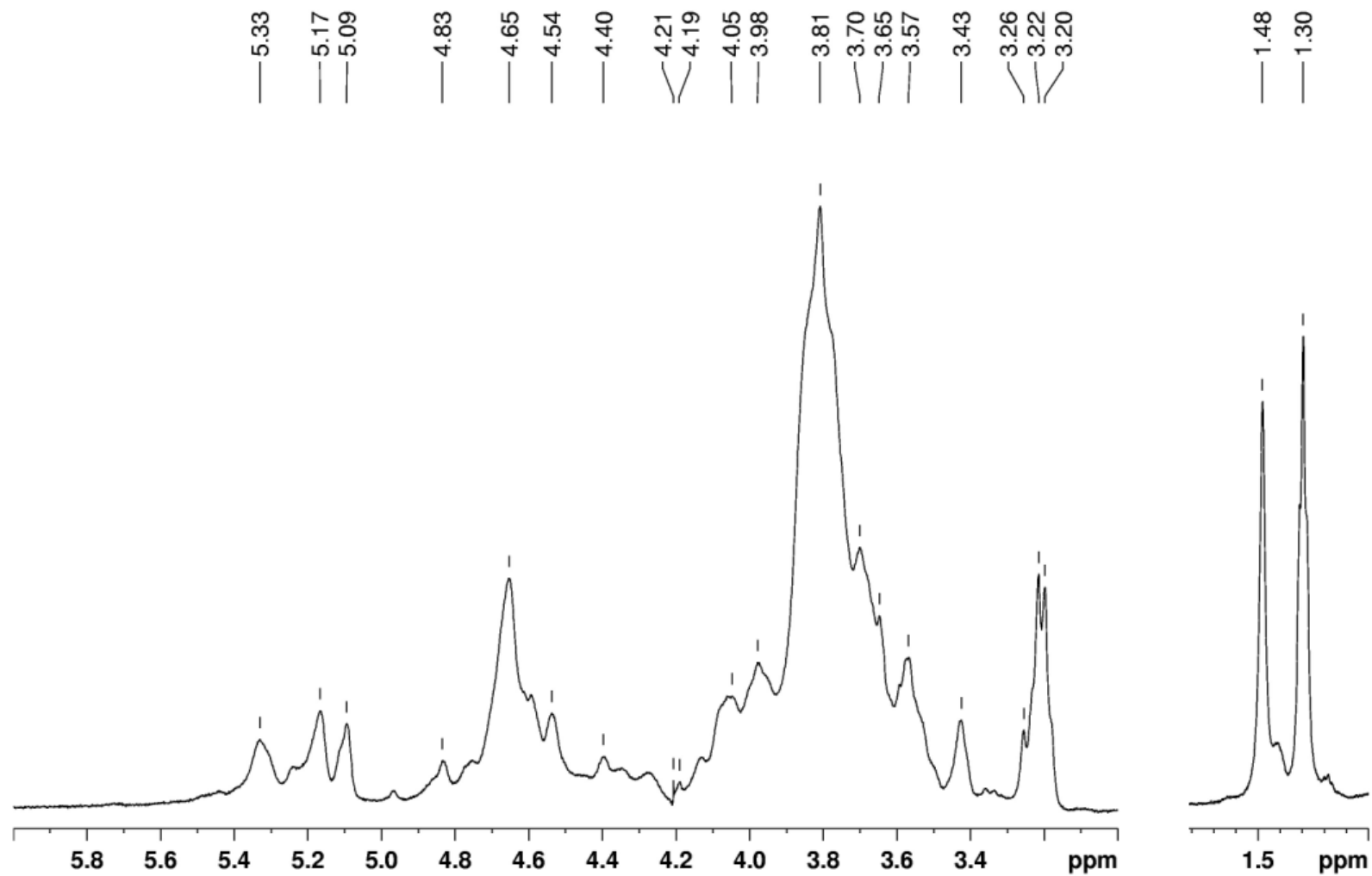
O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da fração HPS-D (Figura-14) permite identificar os prótons do grupo metílico do substituinte acetal de ácido pirúvico pelo sinal em 1,48 ppm. Além de confirmar a presença deste acetal, pode-se verificar o valor em 3,43 ppm, referente aos prótons do grupo  $\text{CH}_3$  das unidades de 6-O-metilgalactose presentes nesta galactana, de acordo com os dados da composição monossacarídica. O espectro ainda indica a presença de prótons das unidades de  $\alpha$ -D-galactose ligada a unidades de  $\beta$ -D-galactose piruvatadas (H-1 em 5,33 ppm) e não piruvatadas (H-1 em 5,17 ppm). Unidades anidrogalactosídicas pertencentes à série D- correspondem ao sinal em 5,09

ppm, enquanto as pertencentes à série L-, aparecem juntamente com unidades de  $\alpha$ -D-galactose (H-1 em 5,17 ppm) (MURANO et al., 1993; USOV, 1984; MAZUMDER et al., 2002). Além dos espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$ , a especificidade da absorção de prótons, pertencentes a unidades B de diferentes séries enantioméricas, também comprova que a fração HPS é constituída por galactanas DL-híbridas.

Apesar da confirmação do caráter híbrido desta galactana, o espectro da fração HPS nativa não permite que sejam interpretadas possíveis díades do polímero original. Porém, de acordo com as análises preliminares de metilação, esta galactana apresenta grande parte de suas unidades substituídas em C-2 (Tabela-10), tanto em unidades de  $\alpha$ -galactose, quanto 3,6-anidrogalactose.

Deste modo, apenas a análise de espectroscopia de RMN de  $^{13}\text{C}$  para esta galactana teria sido insuficiente para determinar suas características estruturais. No entanto, este mesmo tipo de análise conduzida no polímero dessulfatado permitiu caracterizar esta galactana como do tipo DL-híbrida.

FIGURA 14 - ESPECTRO DE RMN DE  $^1\text{H}$  DA FRAÇÃO HPS-D



Análise realizada à 70°C em  $\text{D}_2\text{O}$ , concentração das amostras 40mg/mL.

TABELA 10 - ANÁLISE DE RMN DE  $^{13}\text{C}$  E  $^1\text{H}$ : DÍADES<sup>a</sup> PRESENTES NA FRAÇÃO DESSULFATADA HPS-D

Carbono	GP→D <sup>b</sup>	G→D <sup>c</sup>	G→L <sup>d</sup>	G→DA <sup>e</sup>	G(P)→LA <sup>f</sup>
Unidade A					
C-1	104,1	104,4	103,3	102,2	102,2
C-2				69,1	
C-3		79,0			
C-4	67,2	65,2			
C-5	66,3			75,0	75,0
C-6	65,2				
Unidade B					
C-1	94,7	95,8	101,1	94,2	97,9
C-2					69,8
C-3					
C-4		78,6			77,7
C-5				76,5	75,6
C-6				69,1	69,1

<sup>a</sup> Abreviatura das díades constituintes consta na lista de abreviatura e siglas.

<sup>b</sup> FALSHAW et al., 2003; USOV et al., 1980; MILLER e BLUNT, 2000.

<sup>c</sup> DUARTE et al., 2002; USOV et al., 1980.

<sup>d</sup> DUARTE et al., 2002.

<sup>e</sup> USOV e SHASHKOV, 1985; LAHAYE et al., 1989.

<sup>f</sup> USOV e SHASHKOV, 1985; LAHAYE et al., 1989.

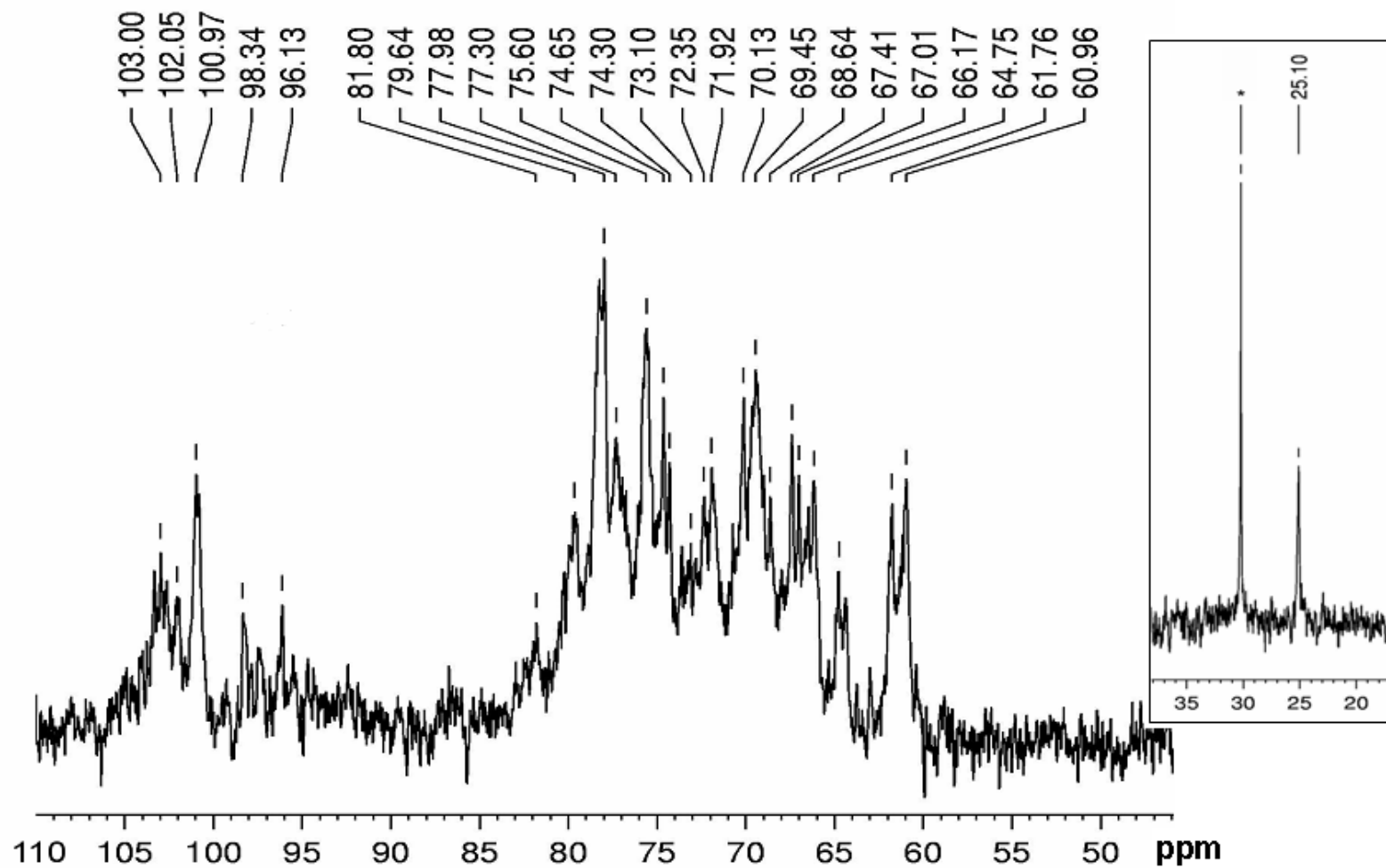
#### 4.8 ESPECTROSCOPIA DE RMN DE $^{13}\text{C}$ E $^1\text{H}$ DAS FRAÇÕES HS-2 E HS-2D

A análise de espectroscopia de RMN de  $^{13}\text{C}$  da fração HS-2 (Figura-15) permitiu assinalar apenas algumas absorções, devido a complexidade dos sinais tanto na região anomérica quanto fora dela.

Além do sinal em 25,1 ppm, referente ao carbono metílico de acetal de ácido pirúvico, o espectro de  $^{13}\text{C}$  da fração nativa HS-2 destaca em 101,0 ppm o sinal de unidades de  $\beta$ -D-galactose 2-sulfato piruvatadas ou não [ $\beta\text{DG2S(P)}$ ], que se correlaciona com o sinal em 96,1 ppm, referente a unidades de  $\alpha$ -D-galactose 6-sulfatadas ou não [ $\alpha\text{DG(6S)}$ ], formando a díade  $\beta\text{DG2S(P)}\rightarrow\alpha\text{DG(6S)}$ . O sinal em 103,0 ppm é atribuído ao C-1 das unidades de  $\beta$ -D-galactose ligadas a  $\alpha$ -L-galactose, enquanto as unidades de  $\beta$ -D-galactose ( $\beta\text{DG}$ ) ligadas a 3,6-anidrogalactose são indicadas pelo sinal em 102,0 ppm. É possível que as unidades de  $\beta$ -D-galactose (C-1 em 102,0 ppm) estejam ligadas a unidades anidrogalactosídicas da série estereoquímica L- ( $\alpha\text{LAG}$ ), as quais são representadas pelo sinal em 98,3 ppm (DUARTE et al., 2002). Estas mesmas díades puderam ser observadas na galactana HS-1 e são condizentes com díades encontradas para algas da ordem Halymeniales. As galactanas extraídas da alga *C. crenulata* também apresentam a díade  $\beta\text{DG2S(P)}\rightarrow\alpha\text{DG(6S)}$  e unidades de  $\beta$ -D-galactose ligadas a 3,6-anidro- $\alpha$ -L-galactose, porém com estas unidades anidrogalactosídicas substituídas em C-2 por grupos metil naturais. Enquanto galactanas da alga *C. seminervis* também apresentam unidades de  $\beta\text{DG}\rightarrow\alpha\text{LAG}$  (ZIBETTI, 2005).

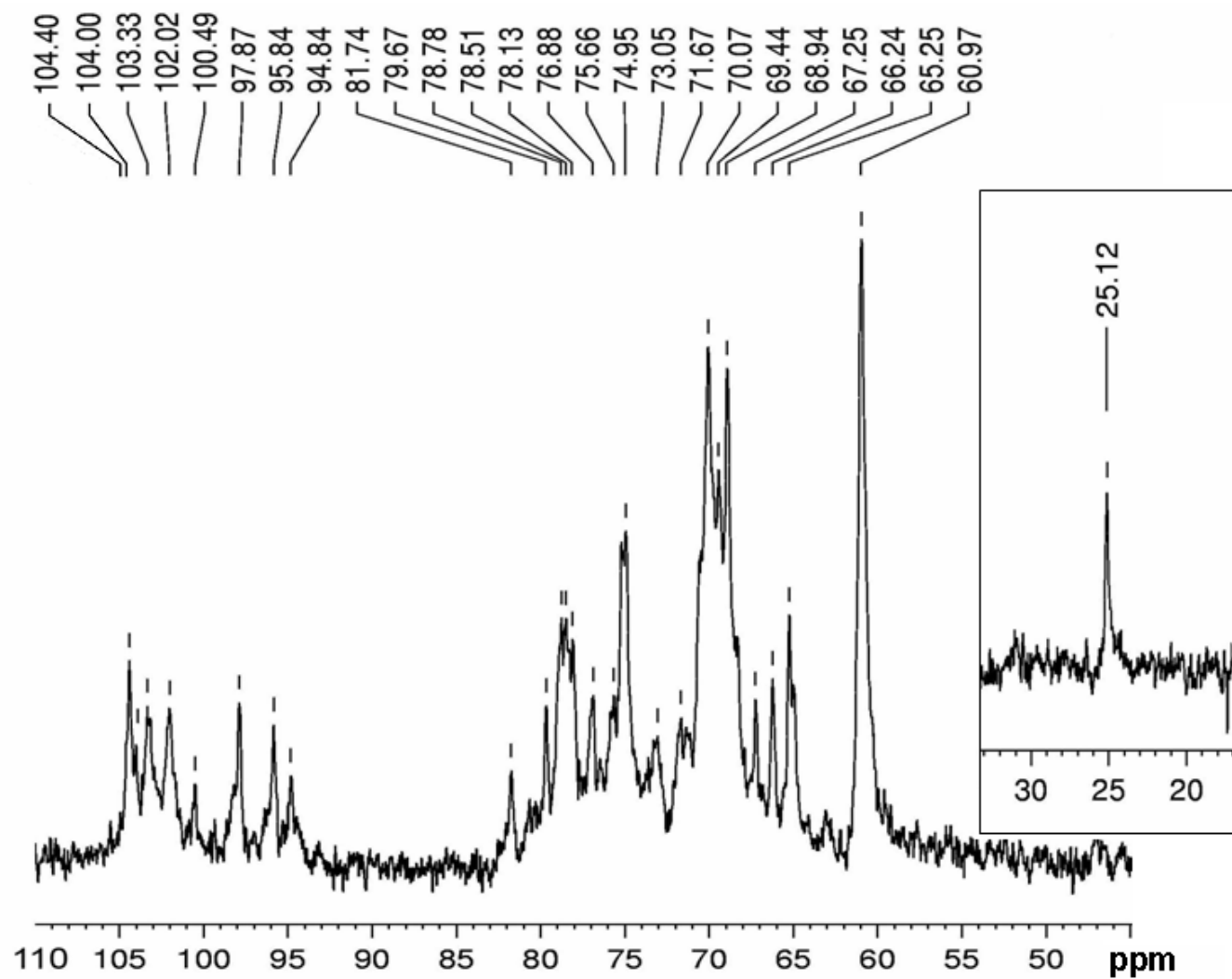
As unidades de  $\alpha$ -D-galactose ( $\alpha\text{DG}$ ), quando ligadas a unidades de  $\beta$ -D-galactose 2-sulfato piruvatadas ( $\beta\text{DG2SP}$ ) ou não ( $\beta\text{DG2S}$ ), apresentam o C-1 em 96,1 ppm. No entanto, após dessulfatação, devido a remoção do grupo sulfato em C-2, as unidades de  $\alpha$ -D-galactose apresentam sinais em 95,8 e 94,8 ppm, conforme a ligação com  $\beta$ -D-galactose 2-sulfato e  $\beta$ -D-galactose 2-sulfato piruvatadas, respectivamente.

FIGURA 15 - ESPECTRO DE RMN DE  $^{13}\text{C}$  DA FRAÇÃO HS-2



Análise realizada à 70°C em  $\text{D}_2\text{O}$ , concentração das amostras 40 mg/mL.

FIGURA 16 - ESPECTRO DE RMN DE  $^{13}\text{C}$  DA FRAÇÃO HS-2D



Análise realizada à 70°C em  $\text{D}_2\text{O}$ , concentração das amostras 40mg/mL.

Neste contexto, o espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da fração HS-2D dessulfatada (Figura-16), apresentou menor grau de complexidade e permitiu determinar as díades de  $\alpha\text{DG}$  (94,8 ppm) ligadas a  $\beta\text{DGP}$  (C-1 em 104,0 ppm) e  $\alpha\text{-DG}$  (95,8 ppm) ligadas a  $\beta\text{DG}$  (C-1 em 104,4 ppm) (FALSHAW et al., 2003).

Unidades de  $\beta\text{-D-galactose}$  (C-1 em 103,3 ppm) também podem estar ligadas a unidades de  $\alpha\text{-L-galactose}$  (C-1 em 100,5 ppm), sendo que o sinal em 100,5 ppm também se refere ao carbono acetálico do acetal de ácido pirúvico (DUARTE et al., 2002; GORIN et al., 1982).

A galactana HS-2D ainda apresenta o sinal em 102,0 ppm, correspondente a unidades de  $\beta\text{-D-galactose}$  ligadas a unidades anidrogalactosídicas, as quais podem ser representadas pelo seu sinal de C-1 em 97,9 ppm, referente a unidades de 3,6-anidro- $\alpha\text{-L-galactose}$  (DUARTE et al., 2002).

A eficiência da dessulfatação, que resultou na fração HS-2D, pode ser observada pelo desaparecimento do sinal em 101,0 ppm na região anomérica, referente a unidades de  $\beta\text{-D-galactose}$  2-sulfatada e pelo aumento dos sinais de C-2 e C-6 não substituídos em 70,1 ppm e 61,0 ppm, respectivamente. Já a presença do sinal em 25,1 ppm, referente ao carbono metílico de acetal de ácido pirúvico na fração dessulfatada, comprova que o processo solvolítico de dessulfatação, além de não ter degradado as unidades anidrogalactosídicas (Tabela-6), não causou a depiruvatação do polissacarídeo.

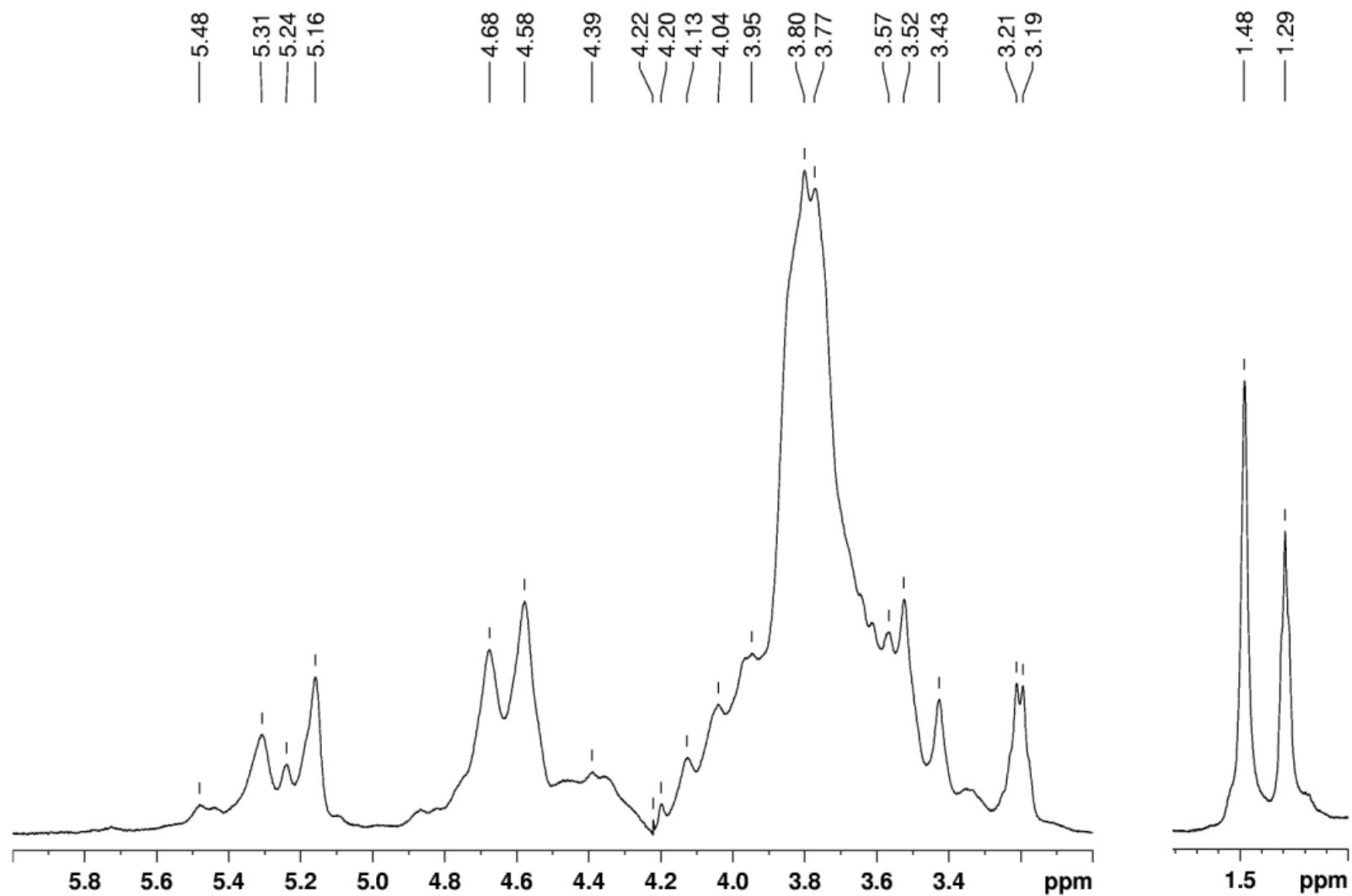
Além do assinalamento dos carbonos não anoméricos de algumas unidades presentes na fração HS-2D (Tabela-9), outras informações podem ser adicionadas com relação aos assinalamentos na região de carbonos 2 a 6 desta fração. O sinal em 81,7 ppm refere-se ao C-3 de unidades de  $\beta\text{-D-galactose}$  não substituídas por acetal de ácido pirúvico. Sendo que esta região do espectro ainda pode nos confirmar a dessulfatação, de acordo com o aumento da intensidade dos sinais em 70,0 e 60,9 ppm, referentes aos C-2 e C-6 não substituídos, respectivamente.

A região anomérica do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da fração HS-2D (Figura-17) permite identificar sinais em 5,31 ppm, referente aos prótons de unidades de  $\alpha\text{-D-galactose}$  ligada a unidades de  $\beta\text{-D-galactose}$  piruvatada e 5,16 ppm, correspondente também a unidades de  $\alpha\text{-D-galactose}$ , mas ligadas a  $\beta\text{-D-galactose}$  não substituída por

acetal de ácido pirúvico. Este sinal (H-1 em 5,16 ppm) também pode ser atribuído a unidades de 3,6-anidro- $\alpha$ -L-galactose. Já o sinal em 5,24 ppm, refere-se aos prótons de unidades de  $\alpha$ -L-galactose ligadas a unidades de  $\beta$ -D-galactose piruvatadas. Enquanto que na região de 3,00 – 3,70 ppm pode-se verificar a presença da absorção dos prótons dos grupamentos metil das unidades da fração HS-2D, metiladas naturalmente. Os sinais em 3,43 e 3,52 ppm referem-se aos prótons dos carbonos substituintes em C-6 e C-2, respectivamente (MURANO et al., 1993; USOV, 1984; MAZUMDER et al., 2002).

A galactana HS-2, biossintetizada pela alga *H. floridana* também se caracteriza como uma galactana do tipo DL-híbrida, assim como HS-1 e HPS. Destaca-se que embora os espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  destas galactanas nativas apresentem diferenças, os espectros destas frações dessulfatadas (Figuras-10, 13 e 16) permitiram assinalar várias díades características tanto de agaranas quanto de carragenanas. De forma que estas galactanas apresentam-se similares quando comparados os espectros referentes às frações dessulfatadas.

FIGURA 17 - ESPECTRO DE RMN DE  $^1\text{H}$  DA FRAÇÃO HS-2D



Análise realizada à 70°C em  $\text{D}_2\text{O}$ , concentração das amostras 40mg/mL.

TABELA 11 - ANÁLISE DE RMN DE  $^{13}\text{C}$  E  $^1\text{H}$ : DÍADES<sup>a</sup> PRESENTES NAS FRAÇÕES NATIVA HS-2 E DESSULFATADA HS-2D

Carbono	NATIVA	DESSULFATADA			
	G2S(P)→D(6S) <sup>b</sup>	GP→D <sup>c</sup>	G→D <sup>d</sup>	G→L <sup>e</sup>	G→LA <sup>f</sup>
Unidade A					
C-1	101,0	104,0	104,4	103,3	102,0
C-2					
C-3			78,8		
C-4		67,2	65,2		
C-5		66,2	74,9		
C-6		65,2			
Unidade B					
C-1	96,1	94,8	95,8	100,5	97,9
C-2					
C-3					79,7
C-4			78,1		
C-5					75,7
C-6					68,9

<sup>a</sup> Abreviatura das díades constituintes consta na lista de abreviatura e siglas.

<sup>b</sup> MILLER e BLUNT, 2000.

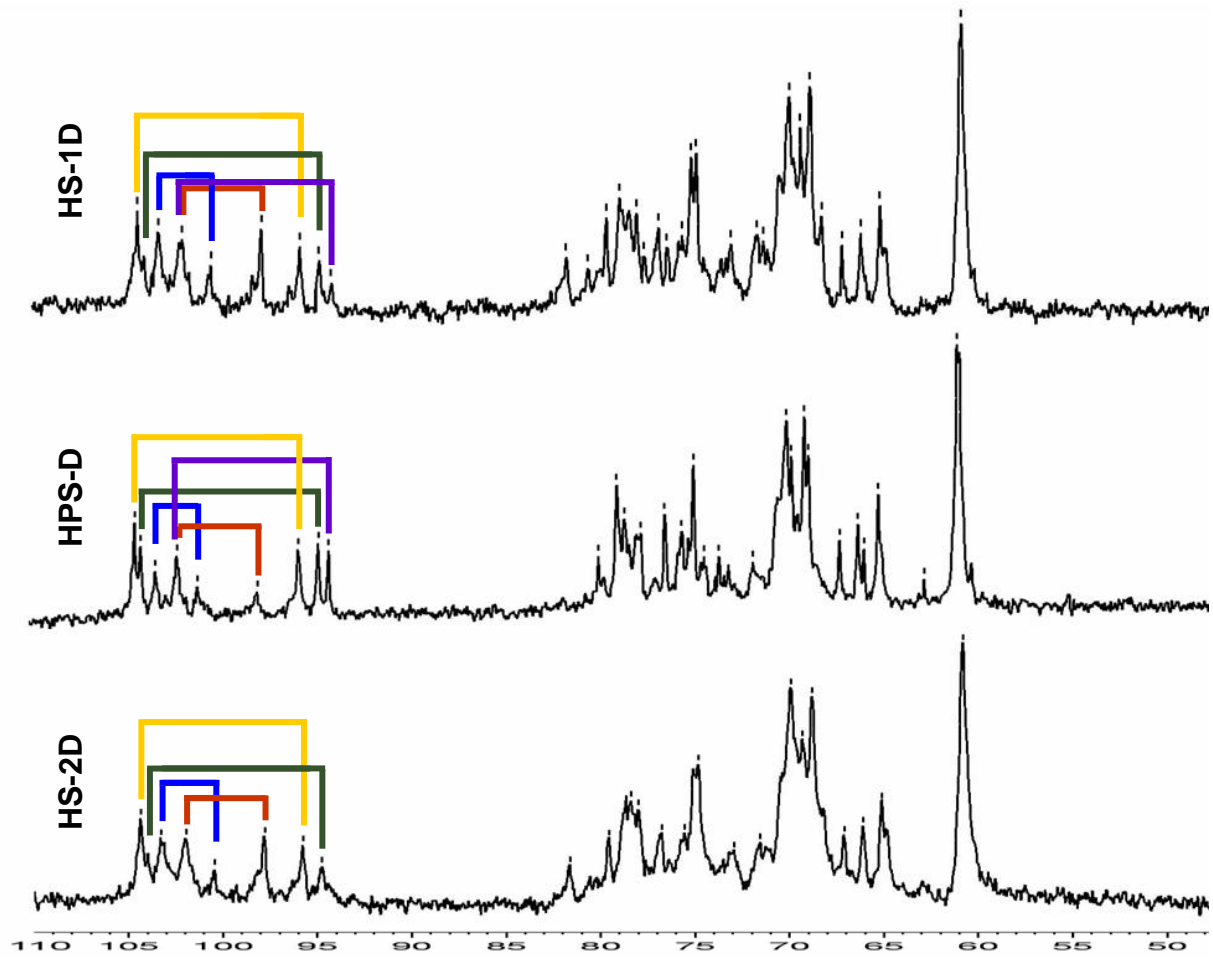
<sup>c</sup> FALSHAW et al., 2003; USOV et al., 1980.

<sup>d</sup> FALSHAW et al., 2003.

<sup>e</sup> DUARTE et al., 2002.

<sup>f</sup> DUARTE et al., 2002.

FIGURA 18 - ASSINALAMENTOS: DÍADES DAS GALACTANAS DESSULFATADAS



	DÍADES	Unidade A (ppm)	Unidade B (ppm)
HS-1D	G → D	104,4	95,8
	GP → D	104,0	94,8
	G → L	103,3	100,5
	GP → LA	102,0	97,9
	G → DA	102,0	94,2
HPS-D	G → D	104,4	95,8
	GP → D	104,1	94,7
	G → L	103,3	101,1
	GP → LA	102,2	97,9
	G → DA	102,2	94,2
HS-2D	G → D	104,4	95,8
	GP → D	104,0	94,8
	G → L	103,3	100,5
	GP → LA	102,0	97,9

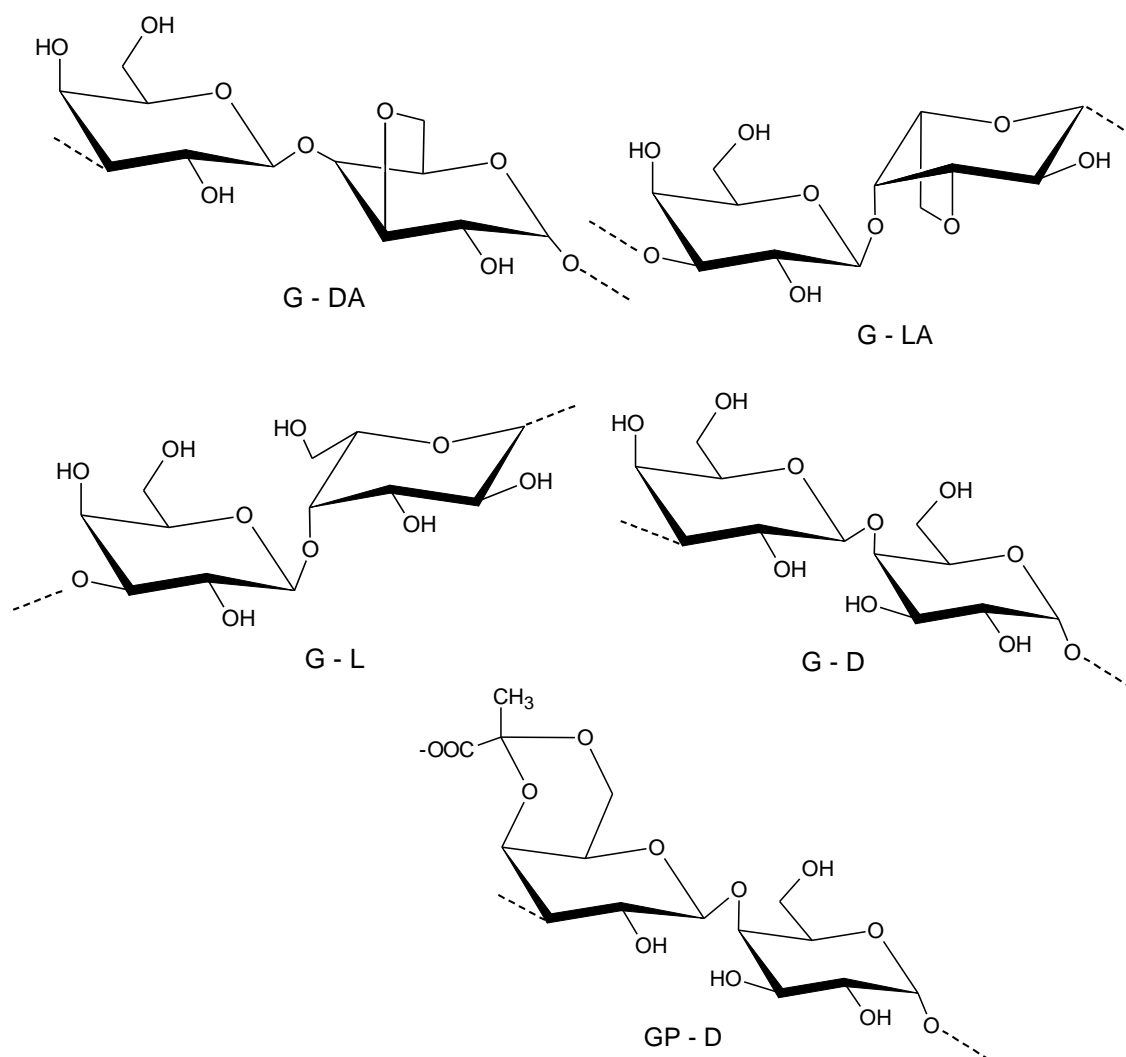
Em resumo, com base nos resultados obtidos e na literatura disponível, pode-se destacar que galactanas DL-híbridas são os biopolímeros majoritários isolados de algas da ordem Halymeniales. Unidades de  $\beta$ -D-galactose 2-sulfatadas parcialmente substituídas por acetal de ácido pirúvico estão presentes neste tipo de galactana, na qual as unidades de  $\alpha$ -galactose são representadas por uma grande diversidade de derivados de galactose pertencentes tanto a série estereoquímica D- quanto a L-. Adicionalmente, estas podem estar naturalmente metiladas e/ou sulfatadas em diferentes posições, proporcionando grande heterogeneidade às unidades B.

Todas estas características conferem a estes biopolímeros propriedades físico-químicas diferentes das observadas para carragenanas ou agaranas.

Destaca-se ainda que a galactana DL-híbrida de *C. crenulata* apresentou alta atividade antiviral (vírus da herpes simples e da dengue), *in vitro* e/ou *in vivo* (TALARICO et al., 2004; 2005). Deste modo, galactanas DL-híbridas são apontadas como potenciais agentes biológicos, sendo sua caracterização estrutural imprescindível para a correlação de suas características físico-químicas com suas funções biológicas e fisiológicas, de maneira a elucidar os mecanismos de atuação metabólica e clínica.

Além disso, a diversidade estrutural destes polímeros pode ser considerada na quimiotaxonomia, a fim de elucidar a filogenia da divisão Rhodophyta.

FIGURA 19 – DÍADES DAS FRAÇÕES DESSULFATADAS HS-1D, HPS-D E HS-2D



Díades correspondentes:

- |               |   |
|---------------|---|
| <b>G - DA</b> | $\beta$ -D-galactose ligada a 3,6-anidro- $\alpha$ -D-galactose                 |
| <b>G - LA</b> | $\beta$ -D-galactose ligada a 3,6-anidro- $\alpha$ -L-galactose                 |
| <b>G - L</b>  | $\beta$ -D-galactose ligada a $\alpha$ -L-galactose                             |
| <b>G - D</b>  | $\beta$ -D-galactose ligada a $\alpha$ -D-galactose                             |
| <b>GP - D</b> | $\beta$ -D-galactose 4,6-O-(1'-carboxietilideno) ligada a $\alpha$ -D-galactose |



## 5 CONCLUSÕES

A alga *H. floridana*, pertencente à ordem Halymeniales, sintetiza galactanas sulfatadas DL-híbridas, como principais polissacarídeos solúveis em meio aquoso.

Análises químicas e espectroscópicas permitiram detectar que as unidades de  $\beta$ -D-galactose 2-sulfatadas são parcialmente substituídas por acetal de ácido pirúvico neste tipo de galactana, já as unidades de  $\alpha$ -galactose são representadas por uma grande diversidade de derivados de galactose pertencentes tanto a série D- quanto a L-. Estas ainda, podem estar naturalmente metiladas e/ou sulfatadas em diferentes posições, o que proporciona grande heterogeneidade às unidades B.

## REFERÊNCIAS

- CARDOSO, M. A.; NOSEDA, M. D.; FUJII, M. T.; ZIBETTI, R. G. M.; DUARTE, M. E. R. Sulfated xilomannans isolated from red seaweeds *Chondrophyucus papillosus* and *C. flagelliferus* (Ceramiaceae) from Brazil. **Carbohydr. Res.**, v. 342, p. 2766-2775, 2007.
- CARLUCCI, M.J.; CIANCIA, M.; MATULEWICZ, M.C.; CERREZO, A.S.; DAMONTE, E.B. Antiherpetic activity and mode of action of natural carrageenans of diverse structural types. **Antivir. Res.**, v. 43, p. 93-102, 1999.
- CERREZO, A.S. The carrageenan system of *Gigartina skottsbergii* S. et G. Part I. Studies on a fraction of kappa-carrageenan. **J. Chem. Soc.**, (C), p. 992-997, 1967.
- CHIOVITTI, A.; BACIC, A.; CRAIK, D. J.; MUNRO, S. L. A.; KRAFT, G. T.; LIAO, M. L. Cell-wall polysaccharides from Australian red algae of the family Solieriaceae (Gigartinales, Rhodophyta): novel, highly pyruvated carrageenans from the genus *Callophycus*. **Carbohydr. Res.**, v. 299, p. 229-243, 1997.
- CHOPIN, T.; HANISAK, M. D.; CRAIGIE, J. S. Carrageenans from *Kallymenia westii* (Rhodophyceae) with a review of the phycocolloids produced by Cryptonemiales. **Bot. Mar.**, Berlin, v. 37, p. 433-444, 1994.
- CHOPIN, T.; KERIN, B. R.; MAZEROLLE, R. Phycocolloid chemistry as a taxonomic indicator of phylogeny in the Gigartinales, Rhodophyceae: a review and current developments using Fourier transform infrared diffuse reflectance spectroscopy. **Phycol. Res.**, v. 47, p. 167-188, 1999.
- CIUCANU, I.; KEREK, F. A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. **Carbohydr. Res.**, v. 131, p. 209-217, 1984.
- DODGSON, K.S. Determination of inorganic sulphate in studies on the enzymic and non-enzymic hydrolysis of carbohydrate and other sulphate esters. **Biochem. J.**, London, v. 78, p. 312-319, 1961.
- DUARTE, M.E.R.; NOSEDA, M.D.; TULIO, S.; PUJOL, C.A.P.; DAMONTE, E.B. Inhibitory effect of sulfated galactans from the marine alga *Bostrychia montagnei* on herpes simplex virus replication in vitro. **Phytomedicine**, v. 8 (1), p. 53-58, 2001.
- DUARTE, M.E.R.; NOSEDA, M.D.; CARDOSO, M.A.; TULIO, S.; CERREZO, A.S. The structure of a galactan sulfate from the red seaweed *Bostrychia montagnei*. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 337, p. 1137-1144, 2002.
- DUARTE, M.E.R.; CAUDURO, J.P.; NOSEDA, M.D.; GOLÇALVEZ, A.G.; PUJOL, C.A.; DAMONTE, E.B.; CERREZO, A.S. The structure of the agaran sulfate from *Acanthophora spicifera* (Rhodomelaceae, Ceramiaceae) and its antiviral activity.

Relation between structure and antiviral activity in agarans. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 339, p. 335-347, 2004.

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

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

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

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

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

GORIN, P.A.J.; MAZUREK, M.; DUARTE, H. S.; IACOMINI, M.; DUARTE, J.H. Properties of <sup>13</sup>C-N.M.R. spectra of O-(1'-carboxyethylidene) derivatives of methyl β-D-galactopyranoside: models for determination of pyruvic acid acetal structures in polysaccharides. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 100, p. 1-15, 1982.

JOL. C. N.; NEISS, T. G.; PENNINKHOF, B.; RUDOLPH, B.; DE RUITER, G. A. Novel High-Performance Anion-Exchange Chromatographic Method for the Analysis of Carrageenans and Agars Containing 3,6-Anhydrogalactose. **Anal. Biochem.**, v. 268, p. 213-222, 1999.

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

KRAFT, G.T.; ROBINS, P.A. Is the order Cryptonemiales (Rhodophyta) defensible? **Phycol.**, 24: 67-77, 1985.

KYLIN, H. Die Gattungen der Rhodophyceen. **Gleerups**, Lund, p. 669, 1956.

LAHAYE, M.; YAPHE, W.; VIET, M.T.P.; ROCHAS, C. <sup>13</sup>C-NMR spectroscopic investigation of methylated and charged agarose oligosaccharides and polysaccharides. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 190, p. 249-265, 1989.

LIAO, M. -L.; CHIOVITTI, A.; MUNRO, S.L.A.; CRAIK, D.J.; KRAFT, G.T.; BACIC, A. Sulfated galactanas from Australian specimens of the red alga *Phacelocarpus peperocarpos* (Gigartinales, Rhodophyta). **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 296, p. 237-247, 1996.

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

MAZUMDER, S.; GHOSAL, P. K.; PUJOL, C. A.; CARLUCCI, M. J.; DAMONTE, E. B.; RAY, B. Isolation, chemical investigation and antiviral activity of polysaccharides from *Gracilaria corticata* (Gracilariaceae, Rhodophyta). **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 31, p. 87-95, 2002.

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

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

MURANO, E.; TOFFANIN R.; KNUTSEN, S. H.; FOCHER, B.; RIZZO, B.; PAOLETTI, S. Evaluation of steam explosion as pretreatment in agar extraction from *Gracilaria dura* (C. Agardh) J. Agardh (Gracilariaceae, Rhodophyta). **J. Ap. Phycol.**, v. 5, p. 417-424, 1993.

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

NAVARRO, D. A. e STORTZ, C. A. Determination of the configuration of 3,6-anhydrogalactose and cyclizable  $\alpha$ -galactose 6-sulfate units in red seaweed galactans. **Carbohydr. Res.** 338, p. 2111-2118, 2003.

NOSEDA, M. D. Polissacarídeos sulfatados isolados da fase tetraesporofítica de *Gigartina skottsbergii* (Rhodophyta, Gigartinales). **Tese de doutorado**. Departamento de Bioquímica da UFPR, 180 p., 1994.

PAINTER, T.J. Algal Polysaccharides. In: ASPINALL, G. **The polysaccharides**, v. 2, p. 195-285, 1983.

PAREKH, R. G.; DOSHI, Y. A.; CHAUHAN, V. D. Polysaccharides from marine red algae *Acanthophora spicifera*, *Grateloupia indica* and *Halymenia porphyroides*. **Indian J. Mar. Sci.**, v. 18, p. 139-140, 1989.

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

SAITO, R.M.; OLIVEIRA, E.C, Chemical scening of Brazilian marine algae producing carrageenans, **Hydrobiol.**, Bucharest, v. 204/205, p. 585-588, 1990.

SAUNDERS, G.W.; KRAFT, G.T. Small-subunit rRNA gene sequences from representatives of selected families of the Gigartinales and Rhodymeniales

(Rhodophyta). 2. Recognition of the Halymeniales ord. nov. **Can. J. Bot.**, Ottawa, v. 74, p. 694-707, 1996.

SEN, S.A.K; DAS, A.K.; BANERJI, N.; SIDDHANTA, K.H.; MODY, B.K.; RAMAVAT, V.D.; CHAUHAN, J.R.; VEDASIROMONI, J.R.; GANGULY, D.K. A new sulfated polysaccharide with potent anti-coagulant activity from the red seaweed *Grateloupia indica*. **Int. J. Biol. Macromol.**; v. 16, p. 279-280, 1994.

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

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

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

STORTZ, C.A.; CERESO, A.S. Novel findings in carrageenans, agaroids and "hybrid" red seaweed galactans. **Curr. Topics Phytochem.**, v. 4, p. 121-134, 2000.

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

USOV, A.I. Sulfated polysaccharides of the red seaweeds. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 6, p. 9-23, 1998.

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

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

USOV, A. I.; IVANOVA, E. G.; SHASHKOV, A. S. Polysaccharides of algae. XXXIII: Isolation and  $^{13}\text{C}$ -NMR spectral study of some new gel-forming polysaccharides from Japan sea red seaweeds. **Bot. Mar.**, Berlin, v. 24, p. 285-294, 1983.

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

USOV, A. I., Shashkov, A. S. Polysaccharides of algae XXXIV: detection of iota-carrageenan in *Phyllophora brodiaei* (Turn.) J.Ag. (Rhodophyta) using  $^{13}\text{C}$ -NMR spectroscopy. **Bot. Mar.**, Berlin, v. 28, p. 367-373, 1985.

VAN DE VELDE, F.; KNUTSEN, S.H.; USOV, A.I.; ROLLEMA, H.S.; CEREZO, A.S.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  high resolution NMR spectroscopy of carrageenans: application in research and industry. **Trends Food Scie.Technol.**, v. 13, p. 73-92, 2002.

WITVROUW, M.; DE CLERCQ, E. Sulfated polysaccharides extracted from sea algae as potential antiviral drugs. **Gen. Pharmacol.**, v. 29, p. 497-511, 1997.

ZIBETTI, R.G.M. Determinação da estrutura química de galactanas híbridas-D/L isoladas da alga vermelha *Cryptonemia crenulata* (Cryptonemiales, Rhodophyta). **Dissertação de mestrado** Departamento de Bioquímica da UFPR, 2001.

ZIBETTI, R.G.M. Determinação da estrutura química de polissacarídeos isolados de algas pertencentes à ordem Halymeniales (Rhodophyta). **Tese de doutorado** Departamento de Bioquímica da UFPR, 2005.

ZIBETTI, R.G.M.; NOSEDA, M.D.; CEREZO, A.S.; DUARTE, M.E.R. The system of galactans from *Cryptonemia crenulata* (Halymeniaceae, Halymeniales) and structure of two major fractions. Kinetic studies on the alkaline cyclization of the unusual diad G2S  $\rightarrow$  D(L)6S. **Carbohydr. Res.** Amsterdam, v. 340, p. 711-722, 2005.