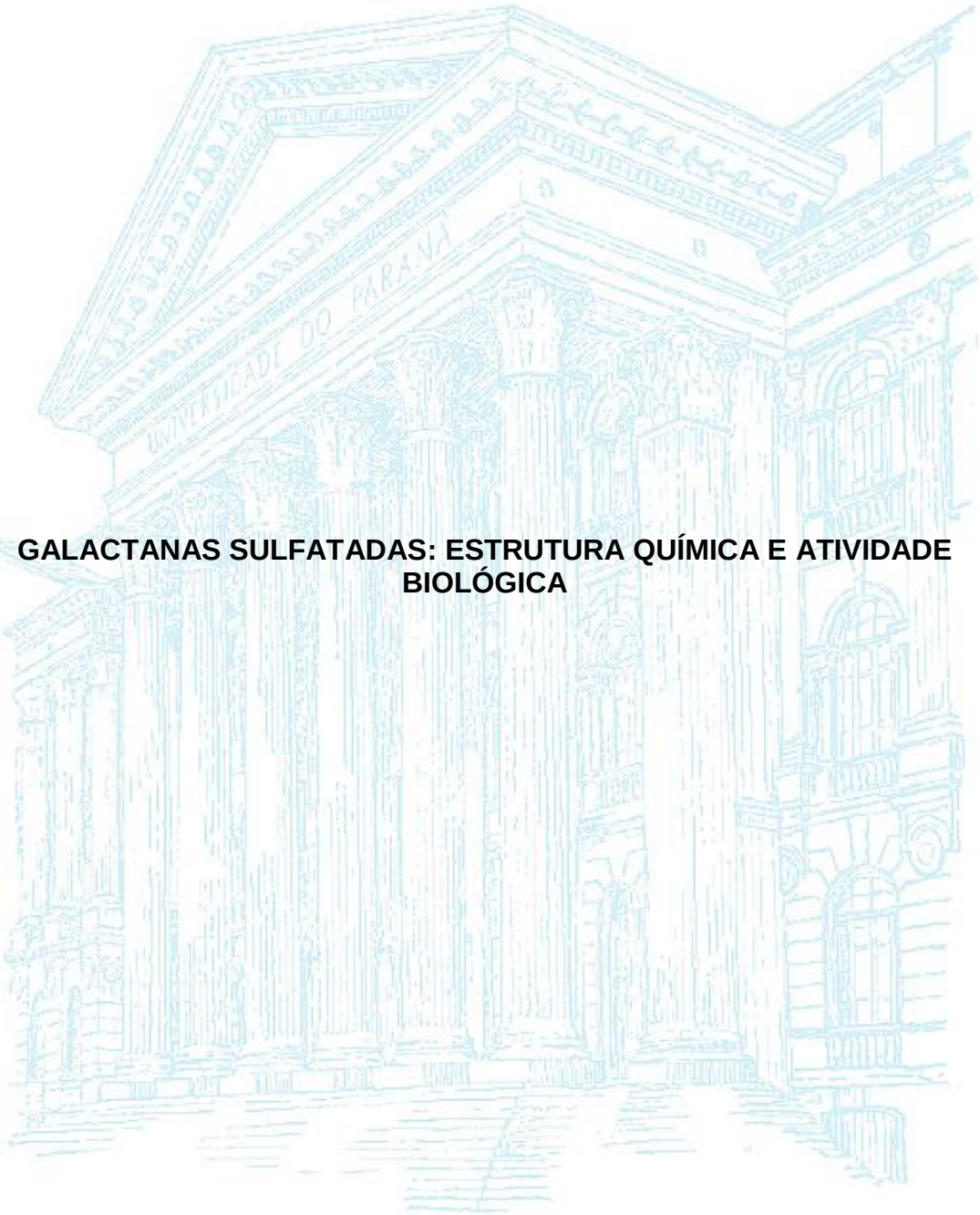
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

TATIANA MILANI CORDEIRO



GALACTANAS SULFATADAS: ESTRUTURA QUÍMICA E ATIVIDADE BIOLÓGICA

CURITIBA
2014

TATIANA MILANI CORDEIRO

GALACTANAS SULFATADAS: ESTRUTURA QUÍMICA E ATIVIDADE BIOLÓGICA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências – Bioquímica.

Orientadora: Profª. Drª. Maria Eugênia Duarte Noseda

Coorientadores: Prof. Dr. Miguel Daniel Noseda
Drª. Luciana Garcia Ferreira

CURITIBA
2014

Orientadora: Profª. Drª. Maria Eugênia Duarte Noseda

Coorientadores: Prof. Dr. Miguel Daniel Noseda
Drª. Luciana Garcia Ferreira

TERMO DE APROVAÇÃO

Tatiana Milani Cordeiro

GALACTANAS SULFATADAS: ESTRUTURA QUÍMICA E ATIVIDADE BIOLÓGICA

Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Ciências-Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:

Profª. Drª. Maria Eugênia Duarte Noseda – Presidente
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR

Prof. Dr. Diogo Ricardo Bazan Ducatti
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR

Profª. Drª. Siliane Denise Berté
Universidade Positivo e SENAI- Curitiba - PR

Curitiba, 31 de março de 2014.

Aos meus pais, Celeni e Joaquim, e irmãos, Talita e Tiago, por toda a força e confiança em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus, sempre.

Aos meus orientadores, professora Maria Eugênia, professor Miguel e Lu, por todo o tempo dispensado para me ajudar, me ensinar, obrigada por terem aceitado me orientar, mesmo não conhecendo nada da área. E Lu, agradeço por todos os ensinamentos teóricos e práticos, desde o começo, com certeza me ajudou bastante.

À empresa Gelymar e à professora Mutue pelas algas enviadas para realizar este trabalho.

À Eliz, Rosane e Lauro pelas análises e amizade3. Ao Guilherme, Diego e Arquimedes pelos RMN's e por toda a paciência, quando precisei de resultados, vocês são demais.

Aos amigos da turma de mestrado, obrigada por toda a força, amizade e boas risadas, a melhor turma que eu poderia ter.

Aos amigos do carboidratos, são tantos, obrigada por tudo, em especial à Andrea, Ge, Thaisa, Alex, Ana Helena, Larry, Sassá, Marília, Cris, Lu, por todo o apoio moral, solucionando minhas dúvidas e sempre dando boas gargalhadas.

Às amigas, companheiras, mães, irmãs, filhas que não posso deixar de agradecer, pois sem vocês, nada disso teria acontecido. Jeni, Tati, Fran, Ester e Shay, vocês dispensaram muito tempo comigo, tanto dentro, quanto fora do laboratório, amo vocês imensamente, sem vocês a minha vida não seria a mesma, obrigada por tudo. Robson (agregado da Jeni) também não posso deixar de agradecer, você e a Jeni são muito especiais, sempre me ajudando e tratando super bem. E não posso deixar de fora nosso IC mais memorável, Mateus, você vai longe garoto, foco que você consegue.

Lu, Pauline, Cassi, Mari, Diego, Amanda, Nando, obrigada por tudo, vocês tiveram muita paciência para me ajudar, desde o começo. Obrigada pela amizade.

Aos amigos e amigas de Joaçaba, Herval, Luzerna, Curitiba, Floripa e demais cidades, sinto tanta saudade, mas sei que torcem por mim e sabem que aqui é meu lugar.

Vocês, Tali, Dé, Rafa, Nane e Shay, foram meu pilar por muito tempo e continuam sendo, amizades duradouras e sinceras, amo vocês, espero que nós Glauberetes, possamos conviver muitos e muitos anos da vida. O Glauber deve sentir orgulho das "filhas" dele.

Minha amiga Shay, você mais que ninguém, pode dizer o quanto me aturou nas fases mais difíceis, obrigada por toda a paciência, esta fase que passei, foi também graças a você. Tantos anos dividindo trabalho, estudos, emoções, espero que estes anos se multipliquem por muito tempo. Obrigada.

À minha família, pai e mãe que fizeram de tudo para estar aqui em um dos dias mais importantes da minha vida e irmãos que não puderam vir. Sem vocês eu não seria absolutamente nada. Tudo que faço é pensando em vocês, para que eu possa ajudar sempre que precisarem, já passamos por muitas coisas nesta vida e superamos todas, pois sempre estávamos unidos. Vocês são a melhor família do mundo. Amo vocês.

À Pós-Graduação em Ciências-Bioquímica e aos órgãos financiadores CAPES, CNPq e Fundação Araucária.

“Live as if you were to die tomorrow;
Learn as if you were to live forever.”

Mahatma Gandhi

RESUMO

Neste trabalho foram estudadas as estruturas químicas de carragenanas e agaranas sulfatadas nativas e/ou modificadas quimicamente isoladas de macroalgas marinhas, bem como a capacidade de adsorção de carragenanas nativas e modificadas à bactéria enteropatogênica *Salmonella tiphymurium*. As carragenanas da macroalga vermelha *Gigartina skottsbergii* foram extraídas a 25 °C, originando a fração GS (*Kappa*-carragenana (55%), *Iota*-carragenana (21,9%), *Mu*-carragenana (2,9%) *e Nu*-carragenana (19,7%), 35,9% de grupos sulfato). A fração GS foi submetida a: tratamento alcalino, originando a fração GS-TA (*Kappa/Iota*-carragenana), precipitação com KCl, originado a fração precipitada GS-P (enriquecida com *Kappa/Iota*-carragenana) e a fração solúvel GS-S (enriquecida com *Nu/Kappa*-carragenana). Todas as frações foram submetidas à dessulfatação, originado as frações GS-D (enriquecida com *Beta*-carragenana), GS-TA-D (composta majoritariamente por *Beta*-carragenana), GS-P-D (enriquecida com *Beta*-carragenana) e GS-S-D (enriquecida com β-D-galactose ligada a α-D-galactose). Os resultados obtidos nos testes de ligação à *S. tiphymurium* destas frações foram comparados aos do produto comercial BioMos®. As frações GS, GS-D, GS-P-D e GS-TA foram estatisticamente semelhantes entre si e com capacidade de ligação superior à do BioMos®. As frações GS-TA-D, GS-P, GS-S e GS-S-D, bem como o BioMos, apresentaram valores estatisticamente semelhantes entre si. Deste modo pode-se observar que tanto a fração GS como seus produtos modificados quimicamente são compostos com capacidade de ligação superior ou igual à do BioMos® e, portanto, podem representar uma alternativa de substituição ou de uso conjunto com o produto comercial. Os polissacarídeos de *Chondria littoralis* (produtora de agaranas sulfatadas) foram extraídos a 25 °C e 80°C. Estas duas frações foram reunidas originando a fração CL, submetida ao tratamento com KCl, originando CLp e CLs. A fração de maior rendimento (CLs) foi fracionada por cromatografia de troca iônica em DEAE-Sephacel, originando as frações CL-1 a CL-3. A fração CL-2 eluída com NaCl 0,5M (55,0% de rendimento, 12,6% de grupos sulfato), apresenta massa molecular média de 304 kDa. Esta agarana é constituída principalmente por galactose (55,8%) e menores percentagens de 6-Me-Gal (17,3%), 2-Me-Gal (7,5%), 2-Me-AG (7,6%), 3,6-AG (6,7%) e xilose (5,1%). O valor de rotação específica negativa (-41,9°) demonstra que as galactanas de CL-2 pertencem ao grupo das agaranas, que é o tipo de galactana sintetizado por algas da ordem Ceramiales. Estas agaranas são parcialmente piruvatadas e constituídas principalmente por unidades de β-D-galactose 2-sulfato ligadas a unidades de 3,6-anidrogalactose ou seu derivado naturalmente metilado em C-2.

Palavras-chave: Estrutura química. Polissacarídeos de *Gigartina skottsbergii*. Capacidade de ligação. Enterobactéria *S. tiphymurium*. Polissacarídeos de *Chondria littoralis*.

ABSTRACT

In this work the chemical structures of carrageenans and agaranas native and/or modified sulfated chemically isolated from seaweeds were studied, and the adsorption capacity of native carrageenan and modified the enteropathogenic bacterium *Salmonella tiphymurium*. The carrageenan from red seaweed *Gigartina skottsbergii* was extracted at 25 °C, yielding GS fraction (*Kappa*-carrageenan (55%), *Iota*-carrageenan (21.9%)*, Mu*-carrageenan (2.9%) *and Nu*-carrageenan (19.7%), 35.9% of sulphate groups)*.* The GS fraction was subjected to: alkaline treatment, yielding the GS-TA fraction (*Kappa/Iota*-carrageenan), precipitation with KCl, the precipitated fraction originated GS-P (enriched with *Kappa/Iota*-carrageenan) and the soluble fraction GS-S (enriched with *Nu/Kappa*-carrageenan). All fractions were subjected to desulphation, originated the GS-D fractions (enriched with *Beta*-carrageenan), GS-TA-D (mainly composed of *Beta*-carrageenan), GS-P-D (enriched with *Beta*-carrageenan) and GS-S-D (enriched with β-D-galactose linked to α-D-galactose). The results obtained in binding assay *S. tiphymuriun* these fractions tests were compared to the commercial product BioMos®. The GS, GS-D, GS-P-D and GS-TA fractions were statistically similar among themselves and with capacity higher than BioMos® binding capacity. The GS-TA-D, GS-P, GS-S and GS-S-D fractions, as well as BioMos, showed similar results to one another. Thus it can be seen that both the GS fraction as their chemically modified products are compounds with binding capacity greater than or equal to BioMos® and therefore might represent an alternative or replacement for use in conjunction with commercial product. The polysaccharides of *Chondria littoralis* (producing sulfated agaranas) were extracted at 25 °C and 80 °C. These two fractions were combined yielding the CL fraction, subjected to treatment with KCl, giving CLp and CLs. The fraction with the highest yield (CLs) was fractionated by ion exchange chromatography on DEAE-Sephacel, yielding fractions CL-1 to CL-3. CL-2 fraction eluted with 0,5 M NaCl (55.0 % yield, 12.6% of sulphate groups) has an average molecular weight of 304 kDa. This agarana consists mainly of galactose (55.8%) and smaller percentages of 6- Me-Gal (17,3%), 2-Me-Gal (7,5%), 2- Me- AG (7,6%), 3,6-AG (6,7%) and xylose (5,1%). The value of negative specific rotation (-41.9 °) shows that the CL-2 galactans belong to the group of agaranas, which is synthesized by type of galactan algae of the order Ceramiales. These are agaranas partially piruvatadas and mainly constituted by β-D-galactose 2-sulfate units linked with 3,6-anhydrogalactose units or derivative thereof naturally methylated at C-2.

Keywords: Chemical Structure. Polysaccharides from *Gigartina skottsbergii*. Binding capacity. Enterobacteria *S. tiphymurium*. Polysaccharides of *Chondria littoralis*.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – DÍADES REPETITIVAS PRESENTES NAS GALACTANAS SULFATADAS 7

FIGURA 2 – ESTRUTURA LINEAR BÁSICA REPETITIVA DE CARRAGENANAS . 10

FIGURA 3 – CICLO DE VIDA DAS FASES GAMETOFÍTICA E TETRASPOROFÍTICA DE ALGAS DO GÊNERO GIGARTINA, ESPÉCIE *Gigartina skottsbergii* 13

FIGURA 4 – ESTRUTURA GERAL HIPOTÉTICA DE CARRAGENANA HÍBRIDA *KAPPA/IOTA/NU* 14

FIGURA 5 – INTERAÇÃO PROPOSTA ENTRE O GRUPO SULFATO NO C-2 DAS UNIDADES β- E O HIDROXIL NO C-3 DAS UNIDADES α-. 17

FIGURA 6 – *KAPPA*-CARRAGENANA: CONFORMAÇÃO DA UNIDADE A (β-D-GALACTOSE-4-SULFATO) $^{4}C_{1}$ E CONFORMAÇÃO DA UNIDADE B (3,6-ANIDRO-α-D-GALACTOSE) COM CONFORMAÇÃO $^{1}C_{4}$ 18

FIGURA 7 – REAÇÃO DE CICLIZAÇÃO: TRANSFORMAÇÃO DE *MU*- E *NU*-CARRAGENANAS EM *KAPPA*- E *IOTA*-CARRAGENANAS, RESPECTIVAMENTE. 19

FIGURA 8 – FORMAÇÃO DA ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL NA FORMAÇÃO DE GÉIS EM CARRAGENANAS 21

FIGURA 9 – ESTRUTURA LINEAR BÁSICA REPETITIVA DAS AGARANAS 23

FIGURA 10 - NÚMERO DE SURTOS POR AGENTE ETIOLÓGICO NO BRASIL, 2000-2013 29

FIGURA 11 - PROPORÇÃO DE SURTOS POR REGIÃO NO BRASIL, 2000-2013 . 30

FIGURA 12 – MECANISMO DOS OLIGOSSACARÍDEOS: AÇÃO ANTI-INFECTIVA DO MOS NA FÍMBRIA DA *Salmonella*, PREVENINDO ASSIM A COLONIZAÇÃO. SEM COLONIZAÇÃO NÃO PODE OCORRER PATOGÊNESE 34

FIGURA 13 – ADESÃO BACTERIANA AO EPITÉLIO INTESTINAL: (A) BACTÉRIAS ADEREM AOS RECEPTORES ANÁLOGOS DO EPITÉLIO DO INTESTINO. (B) BACTÉRIAS ADEREM AOS RECEPTORES ANÁLOGOS DE INIBIDORES DE ADESÃO 34

FIGURA 14 – EXTRAÇÃO AQUOSA A 25 °C DA ALGA *Gigartina skottsbergii* 39

FIGURA 15 – EXTRAÇÃO AQUOSA A 25 °C e 80 °C DA ALGA *Chondria littoralis*. 40

FIGURA 16 - ESQUEMA GERAL PARA OS ENSAIOS DE CAPACIDADE DE LIGAÇÃO. 1) PREPARAÇÃO DA AMOSTRA DE INTERESSE E INCUBAÇÃO; 2) INCUBAÇÃO DO BSA PARA BLOQUEIO DOS ESPAÇOS NÃO OCUPADOS PELAS AMOSTRAS E PREVENÇÃO DE LIGAÇÕES INESPECÍFICAS; 3) INCUBAÇÃO DA ENTEROBACTÉRIA EM OD 0,01; 4) ADIÇÃO DO MEIO E LEITURA DAS DENSIDADES ÓPTICAS NO LEITOR DE MICROPLACAS.....50

FIGURA 17 – ESQUEMA DE EXTRAÇÃO AQUOSA A 25 °C DA ALGA *Gigartina skottsbergii* 53

FIGURA 18 – ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DA FRAÇÃO GS.....57

FIGURA 19 – ESPECTRO DE RMN DE DEPT DA FRAÇÃO GS.....58

FIGURA 20 - POLISSACARÍDEO HÍBRIDO HIPOTÉTICO COMPOSTO PELAS DÍADES DE *KAPPA/IOTA/NU*-CARRAGENANAS, PRESENTES NA FRAÇÃO GS.59

FIGURA 21 – ESPECTRO DE RMN DE ^{1}H DA FRAÇÃO GS 59

FIGURA 22 - CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO ESTÉRICA DE ALTA PERFORMANCE (HPSEC-MALLS-RID) DA FRAÇÃO GS.....60

FIGURA 23 – ESQUEMA DE TRATAMENTOS QUÍMICOS REALIZADOS NAS CARRAGENANAS DE *G. skottsbergii* 62

FIGURA 24 – A FRAÇÃO GS FOI SUBMETIDA AO PROCESSO DE DESSULFATAÇÃO PARA REMOÇÃO DOS GRUPOS SULFATO, GERANDO A FRAÇÃO GS-D 63

FIGURA 25 – ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DAS FRAÇÕES GS E GS-D.....65

FIGURA 26 – ESPECTRO DE RMN DE ^{1}H DAS FRAÇÕES GS E GS-D 66

FIGURA 27 – ESQUEMA DAS CARRAGENANAS DE *G. skottsbergii* NA FORMA NATIVA (GS) E APÓS TRATAMENTO ALCALINO (GS-TA).....68

FIGURA 28 – ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DAS FRAÇÕES GS E GS-TA.....70

FIGURA 29 – ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C-DEPT DAS FRAÇÕES GS E GS-TA ..71

FIGURA 30 – ESPECTRO DE RMN DE ^{1}H DAS FRAÇÕES GS E GS-TA 72

FIGURA 31 – ESQUEMA DAS CARRAGENANAS DE *G. skottsbergii* SUBMETIDAS A TRATAMENTO ALCALINO (GS-TA) SEGUIDO DE DESSULFATAÇÃO (GS-TA-D) 74

FIGURA 32 – ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DAS FRAÇÕES GS-TA E GS-TA-D ...76

FIGURA 33 – ESPECTRO DE RMN DE ^{1}H DAS FRAÇÕES GS-TA E GS-TA-D.....77

FIGURA 34 – ESQUEMA DAS CARRAGENANAS DE *G. skottsbergii* NA FORMA NATIVA (GS) E PRECIPITADAS EM KCl 2 M (GS-P) E SOLÚVEIS EM KCl 2 M (GS-S).....80

FIGURA 35 – ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DAS FRAÇÕES GS, GS-P E GS-S 82

FIGURA 36 – ESPECTRO DE RMN DE ^{1}H DAS FRAÇÕES GS, GS-P E GS-S.....83

FIGURA 37a – ESQUEMA DAS CARRAGENANAS DE *G. skottsbergii* PRECIPITADAS EM KCl 2 M (GS-P) SEGUIDO DE DESSULFATAÇÃO SOLVOLÍTICA (GS-P-D).....85

FIGURA 37b – ESQUEMA DAS CARRAGENANAS DE *G. skottsbergii* SOLÚVEIS EM KCl 2 M SEGUIDO DE DESSULFATAÇÃO SOLVOLÍTICA (GS-S-D) 85

FIGURA 38 – ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DAS FRAÇÕES GS-P E GS-P-D.....88

FIGURA 39 – ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DAS FRAÇÕES GS-S E GS-S-D.....90

FIGURA 40 – ESPECTRO DE RMN DE ^{1}H DAS FRAÇÕES GS-P, GS-S, GS-P-D E GS-S-D.....92

FIGURA 41 – CURVA SIGMOIDAL DE CRESCIMENTO BACTERIANO.....96

FIGURA 42 – EXTRAÇÃO AQUOSA A 25 °C e 80 °C DA ALGA *Chondria littoralis*.102

FIGURA 43 – TRATAMENTO COM KCl DA FRAÇÃO CL, RESULTANTE DA UNIÃO DA FRAÇÃO CF E CQ.....103

FIGURA 44 – CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO ESTÉRICA DE ALTA PERFORMANCE (HPSEC-MALLS-RID) DA FRAÇÃO CL-2.....107

FIGURA 45 – ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DAS FRAÇÕES CL-2 E CL-2-D.....110

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – DIFERENTES CARACTERÍSTICAS DAS ALGAS VERMELHAS, PARDAS E VERDES 4

TABELA 2 - NOMEMCLATURA PROPOSTA POR KNUTSEN *et al*., 1994 PARA AS UNIDADES A E B DE GALACTANAS SULFATADAS 9

TABELA 3 – ESTRUTURAS IDEAIS E CLASSIFICAÇÃO DAS CARRAGENANAS 11

TABELA 4 - REAÇÃO DE CICLIZAÇÃO NO TRATAMENTO ALCALINO DE CARRAGENANAS 16

TABELA 5 – RENDIMENTO E ANÁLISES QUÍMICAS DA FRAÇÃO GS 54

TABELA 6 – COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DA FRAÇÃO GS POR HIDRÓLISE REDUTIVA TOTAL (MOL%) E POR INTEGRAÇÃO DA REGIÃO α-ANOMÉRICA DO RMN DE ^{1}H 55

TABELA 7 – RENDIMENTO E PORCENTAGEM DE DESSULFATAÇÃO DA FRAÇÃO GS-D 63

TABELA 8 – COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DA FRAÇÃO GS-D 67

TABELA 9 – COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES GS E GS-TA. 73

TABELA 10 – RENDIMENTO E PORCENTAGEM DE DESSULFATAÇÃO DA FRAÇÃO GS-TA-D 75

TABELA 11 – COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DA FRAÇÃO GS-TA-D 78

TABELA 12 – RENDIMENTO E TEOR DE GRUPOS SULFATO DAS FRAÇÕES GS-P E GS-S 81

TABELA 13 – COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES GS, GS-P E GS-S 84

TABELA 14 – RENDIMENTO E PORCENTAGEM DE DESSULFATAÇÃO DAS FRAÇÕES GS-P-D E GS-S-D 86

TABELA 15 – COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES GS-P-D E GS-S-D 92

TABELA 16 – PORCENTAGEM DE DÍADES PRESENTES NOS POLISSACARÍDEOS NATIVOS DA FRAÇÃO GS, BEM COMO NAS MODIFICAÇÕES QUÍMICAS 94

TABELA 17 – *SCREENING* DE POLISSACARÍDEOS DE DIFERENTES ESPÉCIES DE ALGAS NO TESTE DE CAPACIDADE DE LIGAÇÃO À *Salmonella entérica* sv. Typhimurium.....97

TABELA 18 – POLISSACARÍDEO NATIVO E QUIMICAMENTE MODIFICADO PARA TESTE DE CAPACIDADE DE LIGAÇÃO A BACTÉRIAS ENTEROPATOGÊNICAS.....98

TABELA 19 – FRACIONAMENTO DA FRAÇÃO CLs (POLISSACARÍDEOS SOLÚVEIS EM KCl) POR CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA.....104

TABELA 20 – CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DAS SUBFRAÇÕES DE CLs OBTIDAS POR CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA.....105

TABELA 21 – COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS SUBFRAÇÕES DE CLs (SOLÚVEIS EM KCl 2 M) POR CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA.....106

TABELA 22 – COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS GALACTANAS DA FRAÇÃO NATIVA (CL-2) E DESSULFATADA (CL-2-D).....108

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

δ	- Deslocamentos químicos nos espectros de RMN
AGP	- *Growth-promoting Antibiotic* (antibióticos promotores de crescimento)
BHI	- *Brain Heart Infusion*
Bio-Mos®	- Mananoligossacarídeos
BSA	- Soro-albumina bovina cristalina
C-2, C-4 e C-6	- Carbono 2, 4 e 6, respectivamente
CDC	- Centro de Controle e Prevenção de Doenças
CF	- Polissacarídeos obtidos das três extrações de *C.littoralis* a 25 °C
CG-EM	- Cromatografia Gasosa acoplada à Espectroscopia de Massa
CL	- Frações CF e CQ foram reunidas, formando a fração CL
CL-1, CL-2, CL-3 e CL-4	- Frações obtidas através do fracionamento em DEAE-Sephacel
CLp	- Fração precipitada em KCl 2 M, a partir dos polissacarídeos nativos de *Chondria littoralis*
CLs	- Fração solúvel em KCl 2 M, a partir dos polissacarídeos nativos de *Chondria littoralis*
CQ	- Polissacarídeos obtidos das três extrações de *C.littoralis* a 80 °C
DEAE-Sephacel	- Matriz de troca iônica utilizada para fracionamento dos polissacarídeos de *Chondria littoralis*
D_2O	- Água deuterada pura
DMSO	- Dimetilsulfóxido
DTA	- Doenças transmitidas por alimentos
GS	- Polissacarídeos obtidos das três extrações de *G. skottsbergii* a 25 °C
GS-D	- Dessulfatação dos polissacarídeos nativos da fração GS

GS-P - Polissacarídeos precipitados em KCl 2 M a partir de polissacarídeos nativos da fração GS

GS-P-D - Polissacarídeos precipitados em KCl 2 M a partir de polissacarídeos nativos da fração GS, com posterior dessulfatação

GS-S - Polissacarídeos solúveis em KCl 2 M a partir de polissacarídeos nativos da fração GS

GS-S-D - Polissacarídeos solúveis em KCl 2 M a partir de polissacarídeos nativos da fração GS, com posterior dessulfatação

GS-TA - Tratamento alcalino dos polissacarídeos nativos da fração GS

GS-TA-D - Tratamento alcalino dos polissacarídeos nativos da fração GS com posterior dessulfatação

HCl - Ácido clorídrico

HCMV - Citomegalovírus

HPSEC-MALLS-RID - Cromatografia de Exclusão Estérica de Alta Performance Acoplada a Espalhamento de Luz Laser Multiângulos e Detector de Índice de Refração

HSV-1 - Vírus herpes simplex 1

HSV-2 - Vírus herpes simplex 2

IgA - Imunoglobulina A

KCl - Cloreto de potássio

MMB - Agente redutor complexo borano 4-metil-morfolina

MOS - Mananoligossacarídeos

m/z - Relação massa/carga

M_w - Massa molecular média

$NaBH_4$ - Boroidreto de sódio

NaCl - Cloreto de sódio

NaN_3 - Azida de sódio

$NaNO_2$ - Nitrito de sódio

NaOH	- Hidróxido de sódio
OD	- Densidade óptica
PBS	- Tampão fosfato salino
RSV	- Vírus respiratório sincicial
SVS	- Secretaria de Vigilância em Saúde
TFA	- Ácido trifluoracético
TSB	- *Tryptone Soy Broth*
UFC	- Unidades formadoras de colônias
VSV	- Vírus da estomatite vesicular

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 1

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 3

2.1 ALGAS MARINHAS 3
2.1.1 Algas vermelhas 4
2.2 POLISSACARÍDEOS SULFATADOS 5
2.2.1 Galactanas sulfatadas de algas vermelhas 7
2.3 GALACTANAS DO TIPO CARRAGENANAS 9
2.3.1 Classificação geral 9
2.3.2 Fases do ciclo de vida de algas da Ordem Gigartinales 12
2.3.3 Galactanas produzidas por *Gigartina skottsbergii* 14
2.3.4 Tratamento alcalino de galactanas 15
2.3.5 Precipitação com cloreto de potássio em galactanas 20
2.4 GALACTANAS DO TIPO AGARANAS 22
2.4.1 Agaranas da ordem Ceramiales 25
2.5 ESTUDOS DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS DOS POLISSACARÍDEOS 28
2.5.1 Capacidade de adsorção de bactérias enteropatogênicas 28
2.5.1.1 Mecanismo de adsorção de enterobactérias 33

3 JUSTIFICATIVA 36

4 OBJETIVOS 37

4.1 OBJETIVO GERAL 37
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 37

5 MATERIAIS E MÉTODOS 38

5.1 MATERIAL BIOLÓGICO 38
5.2 POSICIONAMENTO SISTEMÁTICO DAS ESPÉCIES 38
5.3 EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS 39
5.4 MÉTODOS ANALÍTICOS GERAIS 41
5.4.1 Dosagem de açúcares totais 41
5.4.2 Dosagem de proteínas totais 41
5.4.3 Dosagem de sulfato 41
5.4.4 Determinação da rotação óptica específica 42
5.5 PRECIPITAÇÃO COM CLORETO DE POTÁSSIO (KCl 2 M) 42
5.6 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS 43
5.6.1 Purificação dos polissacarídeos por cromatografia de troca iônica 43
5.6.2 Cromatografia de Exclusão Estérica de Alta Performance Acoplada a Espalhamento de Luz Laser Multiângulos e Detector de Índice de Refração (HPSEC-MALLS-RID) – Análise de homogeneidade e massa molecular 43
5.6.3 Cromatografia Gasosa acoplada à Espectroscopia de Massa (CG-EM) 44
5.7 HIDRÓLISE REDUTIVA TOTAL 44
5.8 DESSULFATAÇÃO POR TRATAMENTO SOLVOLÍTICO 45

5.8.1 Preparo do sal de piridônio....45
5.8.2 Solvólise....46
5.9 TRATAMENTO ALCALINO....46
5.10 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)....47
5.10.1 Técnicas de RMN Monodimensionais....48
5.11 CAPACIDADE DE LIGAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS À ENTEROBACTÉRIAS....48
5.11.1 Ensaios de capacidade de ligação....48
5.11.2 Bactérias....49
5.11.3 Avaliação dos polissacarídeos sulfatados....49
5.11.4 Parâmetros de crescimento e análise estatística....51

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO....53

6.1 POLISSACARÍDEOS DA ALGA *Gigartina skottsbergii*....53
6.1.1 Extração das galactanas sulfatadas de *Gigartina skottsbergii*....53
6.1.2 Análises químicas dos polissacarídeos da fração GS....54
6.1.3 Espectroscopia de RMN da fração GS....56
6.1.4 Análise por HPSEC-MALLS-RID da fração GS....60
6.2 MODIFICAÇÕES QUÍMICAS DA FRAÇÃO GS....61
6.2.1 Dessulfatação da fração GS....62
6.2.1.1 Análises químicas da fração GS-D....63
6.2.1.2 Espectroscopia de RMN da fração GS-D....64
6.2.2 Tratamento alcalino da fração GS....68
6.2.2.1 Análises químicas da fração GS-TA....69
6.2.2.2 Espectroscopia de RMN da fração GS-TA....69
6.2.3 Dessulfatação da fração GS-TA....74
6.2.3.1 Análises químicas da fração GS-TA-D....74
6.2.3.2 Espectroscopia de RMN da fração GS-TA-D....75
6.2.4 Precipitação com KCl da fração GS....79
6.2.4.1 Análises químicas das frações GS-P e GS-S....81
6.2.4.2 Espectroscopia de RMN das frações GS-P e GS-S....81
6.2.5 Dessulfatação das frações GS-P e GS-S....85
6.2.5.1 Análises químicas das frações GS-P-D e GS-S-D....86
6.2.5.2 Espectroscopia de RMN das frações GS-P-D e GS-S-D....86
6.2.6 Porcentagem de díades presentes nos polissacarídeos nativos e modificados quimicamente....93
6.3 ESTUDOS BIOLÓGICOS *In vitro*....94
6.3.1 Ensaios de capacidade de ligação....94
6.3.2 Curva de cresimento....96
6.3.3 Avaliação da capacidade de ligação de polissacarídeos a bactéria enteropatogênica *Salmonella typhimurium*....97
7.1 CARACTERIZAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS DA ALGA *Chondria littoralis.* 101
7.1.1 Extração das galactanas sulfatadas de *Chondria littoralis*....101
7.2 TRATAMENTO COM KCl 2 M DAS FRAÇÕES CF E CQ....102
7.2.1 Fracionamento de CLs por cromatografia de troca iônica em DEAE-Sephacel....103
7.2.2 Caracterização química das subfrações obtidas a partir de CLs por cromatografia de troca iônica....104

7.2.3 Composição monossacarídica das subfrações obtidas a partir de CLs por cromatografia de troca iônica 105
7.2.4 Análise de massa molecular por HPSEC-MALLS-RID da subfração CL-2 obtida por cromatografia de troca iônica 106
7.2.5 Dessulfatação solvolítica da fração CL-2 107
7.2.6 Espectroscopia de RMN das frações CL-2 e CL-2-D 108

CONCLUSÕES 111

REFERÊNCIAS 113

1 INTRODUÇÃO

A parede celular das algas marinhas é composta por um componente interno rígido formado por microfibrilas de celulose ou outro tipo de polissacarídeo e uma camada externa que é a matriz mucilaginosa, esta geralmente é constituída por um polímero de polissacarídeos sulfatados (PAINTER, 1983). Estes polissacarídeos nas algas vermelhas são galactanas sulfatadas, que podem ser do tipo carragenanas, agaranas ou D/L-híbridas.

As algas marinhas são utilizadas em grande escala na indústria alimentícia, de cosméticos e farmacêutica, também para microbiologia e biotecnologia (WIJESEKARA; PANGESTUTI; KIM, 2011; WIJESINGHE; JEON, 2012). Além disso, as algas produzem uma variedade de compostos biologicamente ativos, dentre estes os polissacarídeos, que apresentam significativa variabilidade de atividades biológicas, tais como: atividade antiviral (DUARTE *et al*., 2001; TALARICO *et al*., 2004), potentes ações anticoagulante e antitrombótica (CARLUCCI *et al*., 1997; FARIAS *et al*., 2000), antiangiogênica (KOYANAGI *et al*., 2003), antitumoral (FERNÁNDEZ *et al*., 1989; ZHOU *et al*., 2004) e contra enteropatógenos (GUZMAN-MURILLO; ASCENCIO, 2000; MEDINA, 2001; O'DOHERTY *et al*., 2010).

As atividades biológicas atribuídas aos polissacarídeos de macroalgas marinhas são dependentes da estrutura química, ou seja, das unidades constituintes, anomericidade, posicionamento e distribuição de grupos substituintes, e padrão de substituição. Estas variações estruturais codificam informações distintas, podendo resultar em diferentes respostas nos sistemas biológicos (MEISSEN *et al*., 2009). Deste modo, o conhecimento da estrutura química fina dos polissacarídeos a serem utilizados em testes de bioatividade é de fundamental importância para que se possam estabelecer possíveis correlações entre estrutura química e atividade biológica.

No desenvolvimento deste projeto foram realizados estudos dos polissacarídeos sulfatados obtidos de duas macroalgas vermelhas: *Gigartina skottsbergii*, que produz galactanas do tipo carragenanas sulfatadas, e *Chondria littoralis*, que produz galactanas do tipo agaranas sulfatadas.

Os polissacarídeos nativos, obtidos de *Gigartina skottsbergii*, foram modificados quimicamente para estudo da estrutura química, bem como avaliação

no teste de capacidade de ligação à enterobactérias patogênicas (*Salmonella enterica* sv. Typhimurium), com o objetivo de estabelecer correlação entre estrutura química e atividade biológica exercida pelos polissacarídeos nativos e quimicamente modificados. Este trabalho tem como perspectiva verificar qual destes polissacarídeos pode ser introduzido em um novo produto comercial que impeça a adesão das bactérias ao epitélio do intestino dos animais, evitando a ocorrência de doenças causadas por estas bactérias.

Os polissacarídeos de *Chondria littoralis* foram estudados por métodos químicos e espectroscópicos para determinar a estrutura química fina das agaranas sulfatadas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ALGAS MARINHAS

Algas marinhas bentônicas podem ser encontradas ao longo de costões rochosos, onde são arranjadas tipicamente em faixas ou camadas bem distintas, visíveis em relação aos níveis de marés. Estas algas são maiores e mais complexas do que as encontradas em ambientes de água doce (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2007).

As algas não possuem tecidos e órgãos especializados, assim, não são diferenciadas em raízes, caules e folhas, seu corpo é um talo, por isso são chamadas de talófitas (SILVA, 2010).

A classificação destes organismos, tradicionalmente, era baseada na coloração dos talos verdes, vermelhos ou marrons, como resultado da combinação dos pigmentos fotossintetizantes contidos em seus plastos (clorofilas e pigmentos acessórios, como carotenóides, ficobilinas e xantofilas que mascaram a cor verde das clorofilas) e nas características morfológicas e anatômicas. Atualmente, a sistemática vegetal foi revolucionada pela aplicação de outras ferramentas, moleculares e químicas, embora grande parte da classificação tenha sido mantida e corroborada por esta técnica. Entretanto, foi evidenciada a existência de agrupamentos filogeneticamente não relacionados e que tiveram que ser realocados em grupos taxonômicos distintos (filos, ordens, famílias, etc.), ou em novos grupos criados para acomodar organismos de origens filogeneticamente diferentes (SILVA, 2010).

As algas marinhas macroscópicas apresentam três divisões: algas vermelhas (divisão Rhodophyta), pardas (divisão Phaeophyta) e verdes (divisão Chlorophyta). Os cloroplastos destes três filos diferem em diversas características (Tabela 1) (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2007).

TABELA 1 – DIFERENTES CARACTERÍSTICAS DAS ALGAS VERMELHAS, PARDAS E VERDES

Divisões	Pigmentos fotossintéticos	Substâncias de reserva	Componentes da parede celular	Habitat
Rhodophyta (algas vermelhas)	Clorofila *a,* ficobilinas e carotenóides	Amido das florídeas	Galactanas sulfatadas, celulose, carbonato de cálcio em muitas	Marinho, apenas algumas de águas continentais; muitas espécies tropicais
Phaeophyta (algas pardas)	Clorofilas *a* e *c*; carotenóides, principalmente fucoxantina	Laminarina, manitol	Matriz celulósica com ácidos algínicos (polissacarídeos)	Predominantemente marinho; abundantes em águas oceânicas frias
Chlorophyta (algas verdes)	Clorofilas *a* e *b*; carotenóides	Amido	Polissacarídeos, algumas vezes celulose	Marinho e de água continental

FONTE: Raven, Evert, Eichhorn (2007).

As algas estudadas neste trabalho pertencem ao filo Rhodophyta, o qual será abordado em maiores detalhes.

2.1.1 Algas vermelhas

As algas vermelhas (filo Rodhophyta) são filogeneticamente a divisão mais antiga de macrófitas marinhas (USOV, 1998).

Existem atualmente 7.105 espécies de algas vermelhas conhecidas, distribuídas em oito classes. Pouco mais de 100 espécies diferentes de algas vermelhas ocorrem em ambiente de água doce, mas no mar o número de espécies é maior do que de algas pardas e verdes juntas. As algas vermelhas crescem, geralmente, presas às rochas ou sobre outras algas (ALGAE BASE, 2015; USOV, 1984; RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2007).

As águas tropicais quentes têm maior abundância de algas vermelhas, apesar de estas serem encontradas também nas regiões mais frias do mundo. Os pigmentos fotossintéticos clorofila *a* e ficobilinas, presentes nos cloroplastos, são responsáveis pela cor da alga (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2007).

Como polissacarídeo de reserva as algas vermelhas apresentam o polímero “amido das florídeas”, constituído por unidades de α-D-glucose com ligações glicosídicas do tipo α (1→4) e pontos de ramificação no C-6, que se assemelha à

porção amilopectina do amido, mas devido ao alto teor de ramificações, o polímero é mais próximo do glicogênio do que do amido (PAINTER, 1983; RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2007).

Das algas marinhas podem-se extrair polissacarídeos sulfatados, os quais são amplamente estudados dentre as diferentes espécies de algas vermelhas. Estes polímeros são estudados com maior frequência nas espécies pertencentes às ordens Ceramiales, Corallinales, Gigartinales e Gracilariales que constituem, dentre outras ordens, a classe Florideophyceae que corresponde a 6.753 espécies conhecidas (ALGAE BASE, 2015).

Neste trabalho foram estudados polissacarídeos biossintetizados pelas algas vermelhas *Gigartina skottsbergii* (Ordem Gigartinales) e *Chondria littoralis* (ordem Ceramiales).

2.2 POLISSACARÍDEOS SULFATADOS

As algas vermelhas produzem polissacarídeos cuja composição difere de outros polissacarídeos obtidos de outras plantas (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2007).

A maioria das algas vermelhas é estruturalmente complexa e inclui, em sua parede celular, um componente interno rígido formado por microfibrilas de celulose ou outro tipo de polissacarídeo, e uma camada externa que é a matriz mucilaginosa, esta geralmente é constituída por um polímero de galactanas sulfatadas, a qual confere flexibilidade e textura escorregadia à alga (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2007). Esta matriz polissacarídica pode estar envolvida com a regulação mecânica, osmótica ou iônica das algas, podendo deste modo garantir a adaptação ao meio marinho (PAINTER, 1983; KLOAREG; QUATRANO, 1988).

Os polissacarídeos sulfatados são onipresentes em algas marinhas e durante muitos anos acreditou-se serem pertencentes apenas a estas espécies. Entretanto, estudos recentes mostraram que os polissacarídeos sulfatados também são encontrados em plantas halófitas (plantas essencialmente terrestres, adaptadas a viverem no mar ou próximo a ele), com uma possível correlação com estresse salino. Estudos realizados com plantas halofíticas mostraram que a concentração de

polissacarídeos sulfatados, bem como o grau de sulfatação são correlacionadas com uma adaptação das plantas a ambientes com elevados teores de sal, sendo esta uma adaptação evolutiva (AQUINO; GRATIVOL; MOURÃO, 2011; BOSE; MORENO; SHABALA, 2013).

As algas marinhas tradicionalmente fazem parte da dieta oriental. Nos países ocidentais há uma grande utilização das algas para a extração de compostos utilizados pelas indústrias alimentícia, cosmética e farmacêutica, também para microbiologia e biotecnologia (WIJESEKARA; PANGESTUTI; KIM, 2011; WIJESINGHE; JEON, 2012). Na indústria alimentícia, os polissacarídeos sulfatados das algas marinhas são utilizados em grande escala devida suas propriedades físico-químicas, pois atuam como agentes geleificantes e espessantes (COSTA *et al*., 2010; BARROS *et al*., 2013).

São produzidos anualmente sete milhões de toneladas de algas para fins alimentícios, e outras 300 mil toneladas para diversos usos na indústria química. O Brasil desponta como grande exportador de algas (SEAGRI, 2014).

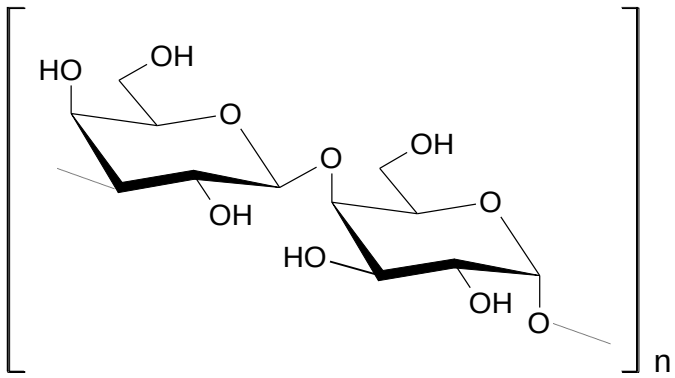
As algas produzem uma variedade de compostos biologicamente ativos (polifenóis, peptídeos, polissacarídeos, entre outros), com diferentes estruturas e propriedades funcionais interessantes, muitos destes com numerosos benefícios à saúde (WIJESINGHE; JEON, 2012). Estes compostos bioativos podem exercer diversas atividades biológicas, como atividade antiviral (DUARTE *et al*., 2001, 2004; TALARICO *et al*., 2004, 2005; MATSUHIRO *et al*., 2005; MENDES *et al.*, 2014), antitumoral (ZHOU *et al*., 2004), antiproliferação de células (COSTA *et al*., 2010), antioxidante (SOUZA *et al*., 2012), antimetapneumovirus (MENDES *et al*., 2014), anticoagulante (LIANG *et al*., 2014), antiangiogênica (SOUZA *et al*., 2012; BERTÉ, 2013) e contra enteropatógenos (GUZMAN-MURILLO; ASCENCIO, 2000; MEDINA, 2001; O'DOHERTY *et al*., 2010, RODRIGUES, 2012; MACHADO *et al*., 2012).

As atividades biológicas atribuídas aos polissacarídeos são dependentes da estrutura química. Estes polímeros possuem uma grande variabilidade estrutural e estas variações codificam informações distintas, podendo resultar em diferentes respostas nos sistemas biológicos. Deste modo, a determinação da estrutura química das galactanas sulfatadas, principais polissacarídeos presentes nas algas vermelhas, é de grande interesse para correlacionar os detalhes estruturais com as propriedades físico-químicas ou atividades biológicas. A química dos polissacarídeos pode também complementar critérios clássicos, bem como

morfologia, anatomia e estudos da história de vida, na elucidação da posição taxonômica das algas vermelhas (USOV, 1998; MEISSEN *et al*., 2009).

2.2.1 Galactanas sulfatadas de algas vermelhas

As galactanas sulfatadas, principais polissacarídeos presentes nas algas vermelhas, apresentam uma estrutura formada por unidades repetitivas de β-D-galactopiranose ligadas glicosidicamente pelas posições 1 e 3, sendo estas chamadas de unidades A; e por unidades de α-galactopiranose ligadas glicosidicamente através das posições 1 e 4, chamadas de unidades B (Figura 1).



[(→ 3) – β-D-galactopiranose – (1→4) – α-galactopiranose – (1→)] $_n$

Unidade A Unidade B

FIGURA 1 – DÍADES REPETITIVAS PRESENTES NAS GALACTANAS SULFATADAS

Nas galactanas, as unidades representadas na figura 1 formam um arranjo alternando no qual cada díade é composta por uma unidade A e uma unidade B. As unidades A podem apresentar substituições, dos grupos hidroxil, por grupos éster de sulfato e/ou *O*-metil em C-2, C-4 ou C-6, além de acetal de ácido pirúvico (4,6-*O*-(1'-carboxietilideno), nas posições C-4 e C-6. Adicionalmente, as unidades A podem se apresentar glicosiladas por diferentes monossacarídeos. As unidades B, podem

apresentar substituição em C-2, C-3 e C-6 por grupos sulfato e/ou *O*-metil, além de glicosilação. Frequentemente estas unidades estão ciclizadas na forma de 3,6-anidrogalactose (PAINTER, 1983; USOV, 1992; USOV, 1998).

A grande diversidade estrutural das galactanas sulfatadas é devida aos diferentes tipos de substituintes, os quais são responsáveis por converter as estruturas básicas e repetitivas destes biopolímeros em estruturas altamente complexas (PAINTER, 1983).

Nas galactanas sulfatadas, as unidades A (β-galactopiranose) estão sempre presentes como enantiômeros da série-D (USOV, 1998), diferentemente das unidades B (α-galactopiranose ou 3,6-anidro-α-galactopirase), que podem pertencer tanto à série D quanto à L. Deste modo, as galactanas são classificadas de acordo com a configuração enantiomérica da unidade B. Quando estas unidades são pertencentes à série D, caracteriza-se o grupo das carragenanas, e quando pertencentes à série L, o grupo das agaranas. Quando as unidades B se encontram presentes nas formas enantioméricas D e L na mesma cadeia polissacarídica caracteriza-se a presença de galactanas do tipo D/L-híbridas (USOV, 1998; STORTZ; CEREZO, 2000).

Knutsen *et al*. (1994), devido à grande diversidade estrutural das galactanas sulfatadas, propuseram uma nomenclatura para facilitar e padronizar a escrita das díades (unidades A e B) componentes destes biopolímeros (Tabela 2).

A posição do substituinte é indicada pelo número do carbono ao qual ele está ligado, seguido da letra correspondente ao tipo de substituição: grupo metil (M), sulfato (S) e unidades de xilose (X). Por exemplo: G4S→DA2S corresponde às unidades de β-D-galactopiranose com sulfato no C-4, ligadas a 3,6-anidro-α-D-galactopiranose com sulfato no C-2. As unidades A que estiverem substituídas por acetal de ácido pirúvico são representadas por GP.

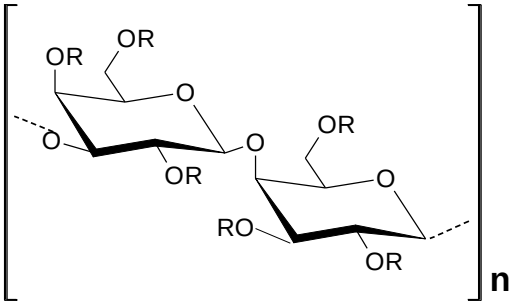
TABELA 2 - NOMEMCLATURA PROPOSTA POR KNUTSEN *et al*., 1994 PARA AS UNIDADES A E B DE GALACTANAS SULFATADAS

Unidade A		Unidade B	
Código de letra	Nome da unidade	Código de letra	Nome da unidade
G	β-D-galactopiranose	D	α-D-galactopiranose
		L	α-L-galactopiranose
		DA	3,6-anidro-α-D-galactopiranose
		LA	3,6-anidro-α-L-galactopiranose

2.3 GALACTANAS DO TIPO CARRAGENANAS

2.3.1 Classificação geral

As carragenanas apresentam uma estrutura linear repetitiva, constituída de unidades alternadas A: (1→3)-β-D-galactopiranose e B: (1→4)-α-D-galactopiranose (Figura 2). A unidade B frequentemente é encontrada na forma de seu derivado, 3,6-anidro-α-D-galactose, ou na forma precursora deste anidro-açúcar (α-D-galactose 6-sulfato). Em geral as carragenanas apresentam uma alta porcentagem de grupos sulfato e uma baixa porcentagem de grupos *O*-metil naturais (NOSEDA, 1994; PAINTER, 1983) quando comparadas às agaranas.



R = H, SO_3^-, CH_3

[(→ 3) – β-D-galactopiranose – (1→4) – α-D-galactopiranose – (1→)] $_n$

Unidade A Unidade B

FIGURA 2 – ESTRUTURA LINEAR BÁSICA REPETITIVA DE CARRAGENANAS

De acordo com a posição dos grupos sulfato nas unidades A e B, além da presença de 3,6-anidro-α-D-galactose na unidade B, as carragenanas são classificadas em quatro famílias (Tabela 3):

I- *Kappa* (κ): apresenta grupos sulfato no C-4 das unidades A e, dependendo da posição dos grupos sulfato nas unidades B e da ciclização destas últimas, é dividido em κ-, ι-, μ-, ν- e o- carragenanas;

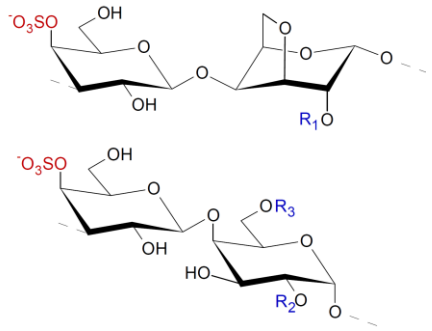
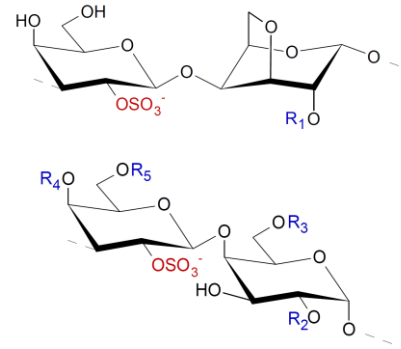
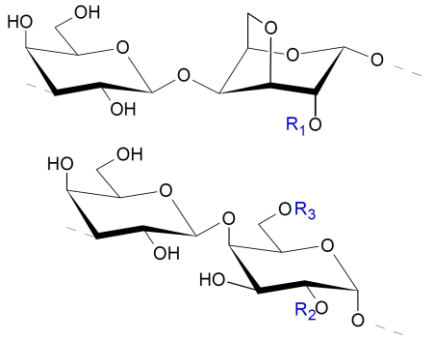
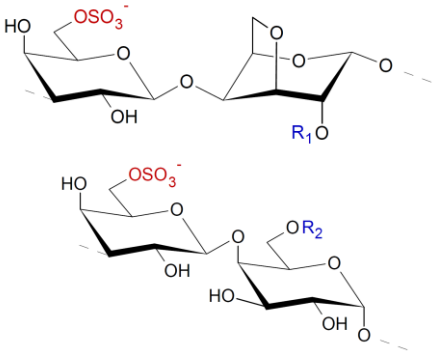
II- *Lambda* (λ): possui grupos sulfato no C-2 das unidades A e divide-se em λ-, ξ-, π- e θ- carragenanas;

III- *Beta* (β): não apresenta sulfatação nas unidades A e divide-se em β-, α-carragenanas e suas precursoras biológicas, γ- e δ- carragenana;

IV- *Omega* (ω): apresenta sulfatação no C-6 das unidades A e divide-se em ω-carragenana e sua precursora biológica ψ-carragenana (REES, 1963; PAINTER, 1983; STORTZ; CEREZO, 2000).

Esta nomenclatura em letras gregas foi denominada por Rees (1963) e mantém-se até hoje. Knutsen *et al*. (1994) propuseram uma nomenclatura simplificando a denominação das díades ideais (Tabela 2), pois há uma grande diversidade de substituintes nas carragenanas que modificam as estruturas ideais, promovendo grande variabilidade e complexidade estrutural a estes polímeros.

TABELA 3 – ESTRUTURAS IDEAIS E CLASSIFICAÇÃO DAS CARRAGENANAS[1]

Estrutura	Subtipo	R_1	R_2	R_3	R_4	R_5	Díade[2]
 **Família** *Kappa* (κ)	*Kappa* (κ)	H	-	-			G4S-DA
	Iota (ι)	SO_3^-	-	-			G4S-DA2S
	Mu (μ)	-	H	SO_3^-			G4S-D6S
	Nu (ν)	-	SO_3^-	SO_3^-			G4S-D2S,6S
	Omicron (ο)	-	SO_3^-	H			G4S-D2S
 **Família** *Lambda* (λ)	*Lambda* (λ)	-	SO_3^-	SO_3^-	H	H	G2S-D2S,6S
	Xi (ξ)	-	SO_3^-	H	H	H	G2S-D2S
	Pi (π)	-	SO_3^-	H	GP[3]	GP	GP2S-D2S
	Theta (θ)	SO_3^-	-	-	-	-	G2S-DA2S
 **Família** *Beta* (β)	*Beta* (β)	H	-	-			G-DA
	Alfa (α)	SO_3^-	-	-			G-DA2S
	Gamma (γ)	-	H	SO_3^-			G-D6S
	Delta (δ)	-	SO_3^-	SO_3^-			G-D2S,6S
 **Família** *Omega* (ω)	*Omega* (ω)	H	-				G6S-DA
	Psi (ψ)	-	SO_3^-				G6S-D6S

[1] Modificado de KNUTSEN *et al*. (1994), DUCATTI (2005), COLODI (2011)
[2] Nomenclatura proposta por Knutsen *et al*., 1994
[3] GP = substituição por acetal de ácido pirúvico

A tabela 3 representa as estruturas repetitivas denominadas de “estruturas ideais” das carragenanas, no entanto, na natureza dificilmente são encontradas carragenanas totalmente repetitivas, no lugar são encontradas carragenanas híbridas. Estas são constituídas por dois ou mais tipos de estruturas ideais (DUCATTI, 2005; VAN DE VELDE, 2008).

2.3.2 Fases do ciclo de vida de algas da Ordem Gigartinales

A ordem Gigartinales apresenta 883 espécies conhecidas. As famílias com maior número de espécies nesta ordem são: Gigartinaceae (153 espécies), Kallymeniaceae (171 espécies) e Phyllophoraceae (124 espécies). As algas da ordem Gigartinales geralmente produzem diferentes polissacarídeos nos diferentes estágios de vida (Figura 3) (STORTZ; CEREZO, 2000; ALGAE BASE, 2015).

Os estádios de ciclo reprodutivo das espécies gigartináceas afeta profundamente o tipo de carragenana produzido. Plantas gametofíticas produzem *Kappa*, *Iota*, *Mu* e *Nu*-carragenanas, já as tetrasporofíticas produzem carragenanas do tipo *Lambda*. *Kappa* e *Iota*-carragenanas são formadores de gel, enquanto *Mu*, *Nu* e *Lambda*-carragenanas geram soluções aquosas viscosas (PIRIZ; CEREZO, 1991; USOV, 1998; AMIMI *et al*., 2001).

Estudos com carragenanas dos estádios cistocárpico e tetraspórico de *Iridea undulosa* e *Gigartina skottsbergii* mostraram que amostras cistocárpicas produzem dois tipos de carragenanas separáveis por tratamento com cloreto de potássio: o polissacarídeo solúvel é composto por *Mu*/*Nu*-carragenanas parcialmente ciclizadas, enquanto o polissaccarídeo precipitado é formado por *Kappa*/*Iota* (MATULEWICZ *et al*., 1989; STORTZ; CEREZO, 1993). Carragenanas isoladas de *Iridaea undulosa* (fase cistocárpica) geraram uma fração geleificada, composta predominantemente por *Kappa*-carragenana, a qual é ainda constituída por menores porcentagens de díades de *Iota* e *Nu*-carragenana. Adicionalmente outra fração solúvel em KCl foi obtida. Esta é constituída por *Nu*-carragenanas parcialmente ciclizadas e baixas porcentagens de díades correspondentes a *Kappa*-carragenana. O estádio tetraspórico de *Iridea undulosa* é basicamente composto por *Lambda*-caragenanas (STORTZ *et al*., 1994).

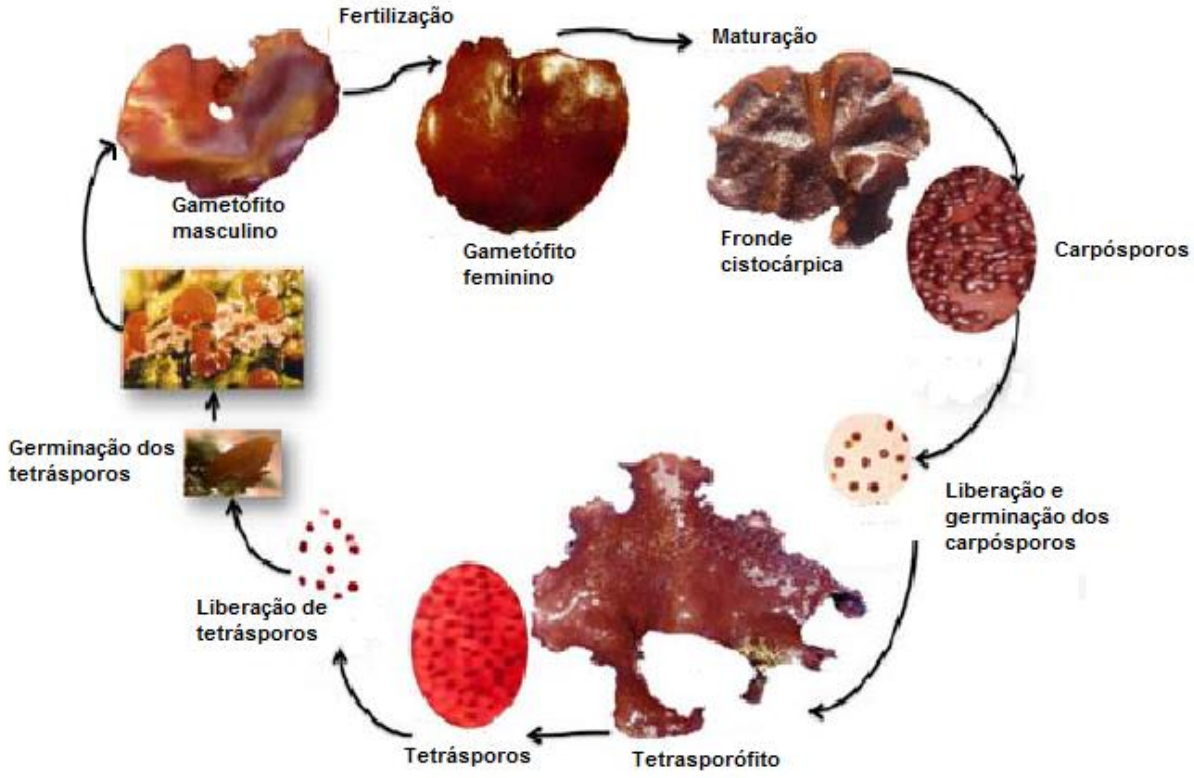


FIGURA 3 – CICLO DE VIDA DAS FASES GAMETOFÍTICA E TETRASPOROFÍTICA DE ALGAS DO GÊNERO GIGARTINA, ESPÉCIE *Gigartina skottsbergii*
FONTE: Modificado de Sánchez; Sánchez (2012).

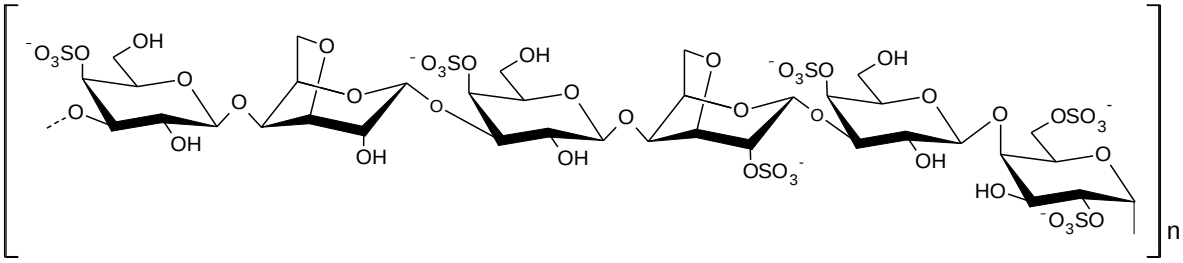
A estrutura das carragenanas produzidas pelas fases do ciclo de vida gametofítica e tetrasporofítica de *Gigartina pistillata* varia de acordo com a fase biológica da planta. As algas gametofíticas sintetizam *Kappa*/*Iota*-carragenanas híbridas, e em menores proporções *Nu*-carragenana. A fase tetrasporofítica sintetiza um complexo de galactanas sulfatadas composta por *Lambda*, *Xi*, *Pi*-carragenanas e carragenanas sulfatadas contendo β-D-galactopiranose 3-ligada, substituída por 2,6-dissulfato (AMIMI *et al.*, 2001).

Tanto a fase gametofítica quanto a tetrasporofítica podem ser estudadas através de técnicas laboratoriais que separem os tipos de polissacarídeos, ou ainda que modifiquem a sua estrutura para auxiliar na elucidação da estrutura química, bem como correlacioná-los à atividade biológica desempenhada pelos diferentes tipos de polissacarídeos presentes na alga.

2.3.3 Galactanas produzidas por *Gigartina skottsbergii*

A estrutura química das carragenanas sulfatadas produzidas pela alga vermelha *Gigartina skottsbergii* (Gigartinales, Rhodophyta), tem sido estudada (MATULEWICZ *et al*., 1989; CIANCIA *et al*., 1993a; CIANCIA; MATULEWICZ, CEREZO, 1993; NOSEDA; CEREZO, 1995; CIANCIA; MATULEWICZ; CEREZO, 1997; NOSEDA *et al*., 2000). Esta alga é produzida comercialmente, tendo uma ampla utilização industrial através de seus polissacarídeos (GELYMAR, 2014).

As algas da fase cistocárpica produzem polissacarídeos da família *Kappa*, contendo diferentes porcentagens de díades correspondentes a *Kappa*, *Iota* e *Nu*-carragenanas (Figura 4), além de *Mu*-carragenana, enquanto a fase tetraspórica sintetiza polissacarídeos da família *Lambda* (CARLUCCI *et al*., 1997; CARLUCCI *et al*., 1999; BARAHONA *et al*., 2012).



Kappa-caragenana (κ) (G4S→DA)

Iota-carragenana (ι) (G4S→DA2S)

Nu-carragenana (ν) (G4S→D2S,6S)

FIGURA 4 – ESTRUTURA GERAL HIPOTÉTICA DE CARRAGENANA HÍBRIDA *KAPPA/IOTA/NU*
FONTE: O autor (2014)

Ciancia *et al*. (1993a) combinaram o uso de análises de metilação e espectroscopia de RMN (^{1}H e ^{13}C), o que permitiu a determinação da estrutura fina de carragenanas produzidas pelo estágio cistocárpico de *G. skottsbergii*. As plantas cistocárpicas sintetizam um sistema de carragenanas, cujas frações foram designadas como $1C_1$, $1C_2$ (geleificantes) e $1C_3$ (não geleificantes, solúveis em KCl 2 M). Análises químicas e espectroscópicas demonstram que $1C_1$ e $1C_2$ correspondem a *Kappa/Iota*-carragenanas híbridas (G4S→DA e G4S→DA2S), enquanto $1C_3$ contém díades de *Mu/Nu*-carragenanas (G4S→D6S e G4S→D2,6S) em maiores proporções.

As características estruturais regulares e claras das carragenanas são essenciais para um bom entendimento das atividades biológicas e importantes para realização de modificações químicas. Na literatura reações químicas já têm sido relatadas, a fim de alterar as propriedades físico-químicas e biológicas de carragenanas para avaliação das atividades biológicas, como a síntese de carragenanas ciclizadas com sulfatos em posições incomuns, para avaliação das propriedades anticoagulantes (ARAÚJO *et al*., 2013).

Deste modo, neste trabalho os polissacarídeos da alga *G. skottsbergii* foram modificados através de tratamento alcalino, dessulfatação e ainda precipitação com KCl para avaliação de atividade biológica.

2.3.4 Tratamento alcalino de galactanas

A reação de ciclização, formação de unidades 3,6-anidrogalactose a partir de unidades de α-galactose 6- ou 2,6-sulfato por tratamento alcalino, é uma importante reação para o estudo estrutural e/ou aplicação industrial de galactanas sulfatadas (NOSEDA; CEREZO, 1995).

O tratamento alcalino é usado comercialmente para aumentar o comportamento de geleificação e em laboratório para a determinação quantitativa das unidades de α-galactose 6-sulfato (CIANCIA *et al*., 1993b).

Os estudos de ciclização por tratamento alcalino podem determinar o tempo de meia-vida dos diferentes tipos de polissacarídeos (Tabela 4). Este tempo determina que 50% dos polissacarídeos estão ciclizados na forma de 3,6-anidrogalactose. A presença e posição de grupos sulfato nas unidades de β-D-galactose tem grande influência no processo de ciclização por tratamento alcalino (NOSEDA; CEREZO, 1995).

O tratamento alcalino foi realizado com *Kappa*/*Iota*-carragenanas, *Mu*/*Nu*-carragenanas parcialmente ciclizadas e *Lambda*-carragenanas. Para *Kappa*/*Iota*-carragenanas as reações de ciclização foram completadas após 2 e 4 minutos, respectivamente. A reação de ciclização em 60 °C, 70 °C e 80 °C é aproximadamente 20-60 vezes mais rápida em carragenanas da família *Kappa*

(unidades A sulfatadas no C-4) do que da família *Lambda* (unidades A sulfatadas no C-2) (CIANCIA *et al*., 1993b).

A reação de ciclização de *Iota*/*Nu*-carragenana (G4S→DA2S/G4S→D2,6S) foi 160-210 vezes mais rápida que *Lambda*-carragenana (G2S→D2,6S) (CIANCIA *et al*., 1993b; VIANA *et al*., 2004). *Iota/Nu*-carragenana foi também mais rápida do que *Mu/Nu*-carragenana (G4S→D2,6S/G4S→D6S), a complexidade estrutural de *Mu/Nu* sugere qua a ciclização de *Mu* “pura” deve ser mais lenta que uma *Nu* “pura”, deste modo obtiveram-se os tempos de meia-vida em 24,0 e 5,4 minutos (min.), respectivamente.

Os produtos de auto-hidrólise e de hidrólise ácida de *Lambda*-carragenana (G→D2,6S), foram 3,6-7,6 vezes mais rápidos do que *Lambda*-carragenana nativa (G2S→D2,6S), mostrando a influência dos grupos sulfato no C-2 das unidades A para a ciclização destas unidades, mas estes produtos de hidrólise foram 5-10 vezes mais lentos do que *Mu/Nu*-carragenanas (G4S→D2,6S/G4S→D6S), sugerindo que o sulfato no C-4 das unidades A interage com o 2- e 6-sulfato das unidades B desestabilizando a conformação da molécula e acelerando a reação (CIANCIA *et al*., 1993b; NOSEDA; CEREZO, 1993; NOSEDA; CEREZO, 1995).

Os valores de G2S→D(L)6S (70% de G2S→D6S e 30% de G2S→L6S) são intermediários entre os produtos de hidrólise ácida de *Lambda*-carragenana e *Lambda*-carragenana nativa (ZIBETTI *et al*., 2005; ZIBETTI *et al*., 2009).

TABELA 4 - REAÇÃO DE CICLIZAÇÃO NO TRATAMENTO ALCALINO DE CARRAGENANAS

Temperatura do tratamento alcalino	Díades (tempo de meia-vida (min))					
	G4S→D2,6S G4S→D6S[a]	G4S→DA2S G4S→D2,6S[b]	G→D2,6S[c]	G→D2,6S[d]	G2S→D(L)6S[e]	G2S→D2,6S[f]
60 °C	24,0	5,4	-	-	-	850,0
70 ºC	9,0	1,5	-	-	-	320,0
80 °C	4,5	-	24,7	38,3	68,6	170,0

[a]*Mu*/*Nu*-carragenana (80% de *Nu* e 20% de *Mu*) (CIANCIA *et al*., 1993b); [b]*Iota*/*Nu*-carragenana (71% de *Iota* e 21% de *Nu*) (VIANA *et al*., 2004); [c]Valores médios de degradação de *Lambda*-carragenana com 26 e 35 horas (h) de auto-hidrólise (NOSEDA; CEREZO, 1995); [d]Valores médios de um di-e trisacarídeo contendo esta díade de uma hidrólise ácida parcial de uma *Lambda*-carragenana (NOSEDA; CEREZO, 1993); [e]Fração C2S-3 de galactana de *Cryptonemia crenulata* contendo aproximandamente 70% de G2S→D6S e 30% de G2S→L6S (ZIBETTI *et al*., 2005); [f]*Lambda*-carragenana com 100% de G2S-D2,6S (CIANCIA *et al*., 1993b).

Em *Lambda*-carragenanas a alta densidade de cargas negativas dificulta a ionização do grupo hidroxil em C-3 das unidades de α-D-galactose. A etapa de ionização é essencial para que a reação de ciclização ocorra, o que está de acordo com o fato de que a reação de ciclização para *Lambda*-carragenanas ocorre a uma velocidade muito menor quando comparada com *Kappa* e/ou *Iota*-carragenana. Além disso, modelos moleculares de *Lambda*-carragenanas sugerem a formação de uma ponte de hidrogênio entre o grupo hidroxil no C-3 da unidade B e o grupo sulfato no C-2 da unidade A (Figura 5). Estas observações também explicam a ausência ou baixa porcentagem de derivados ciclizados de *Lambda*-carragenana na natureza. A facilidade com que a reação de ciclização ocorre para carragenanas da família *Kappa* indica que os tratamentos alcalinos utilizados industrialmente podem ser realizados sob condições mais suaves, constituindo géis de resistência elevada (CIANCIA *et al*., 1993b).

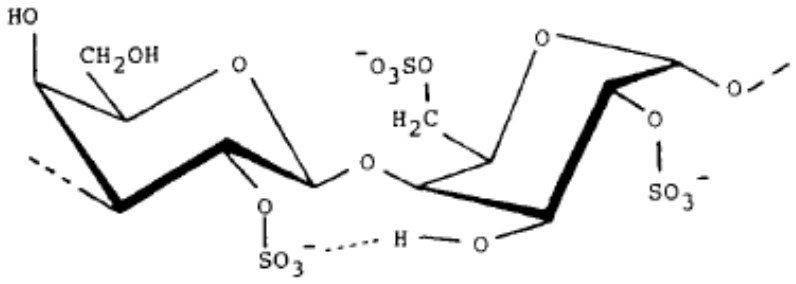
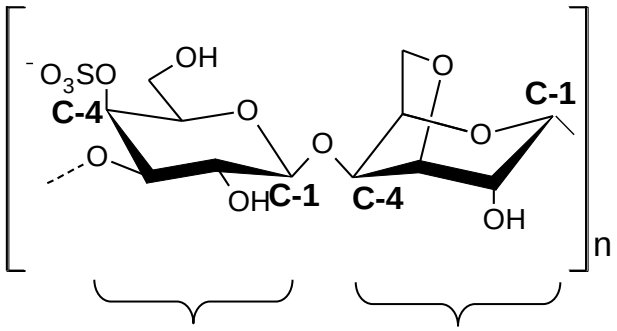


FIGURA 5 – INTERAÇÃO PROPOSTA ENTRE O GRUPO SULFATO NO C-2 DAS UNIDADES β- E O HIDROXIL NO C-3 DAS UNIDADES α-.
FONTE: CIANCIA *et al*. (1993b).

A reação de ciclização ocorre em meio básico e com temperatura variável. Estas condições promovem a liberação do grupo sulfato em C-6 das unidades de α-galactopiranose, e com a hidroxila livre em C-3, em seguida, ocorre a formação do anel 3,6-anidrogalactose (CIANCIA *et al*., 1993b; CIANCIA; MATULEWICZ; CEREZO, 1997; NOSEDA *et al*., 2000).

A reação de ciclização das unidades α-D-galactose 6-sulfato e/ou α-D-galactose 2,6-dissulfato, para os derivados correspondentes 3,6-anidrogalactose e 3,6-anidrogalactose 2 sulfato, envolve vários passos consecutivos: (1) primeiramente ocorre a ionização da hidroxila em C-3, o que gera repulsão entre o oxigênio equatorial em C-3 e o sulfato em C-6 (ou em C-2 e C-6) e, consequentemente, a desestabilização da conformação das unidades $^4C_1$ (exemplo na figura 6); (2) a

mudança de conformação para $^{1}C_{4}$ (exemplo na figura 6) posiciona o oxigênio do C-3 e o grupo sulfato do C-6 em posição paralela axial; (3) esta posição favorece o ataque nucleofílico do oxigênio em C-3 ao C-6, ocorrendo uma reação de substituição nucleofílica bimolecular (SN_2), em que o grupo sulfato em C-6 é liberado num processo de eliminação seguido pela formação do anel 3,6-anidro; (4) ocorre a reacomodação da conformação de toda a molécula. Nesta reação, a força direcional é a ionização da hidroxila em C-3 das unidades precursoras, que é proporcionada por temperatura em meio alcalino (CIANCIA *et al*., 1993b; NOSEDA; CEREZO, 1995; De RUITER; RUDOLPH, 1997).



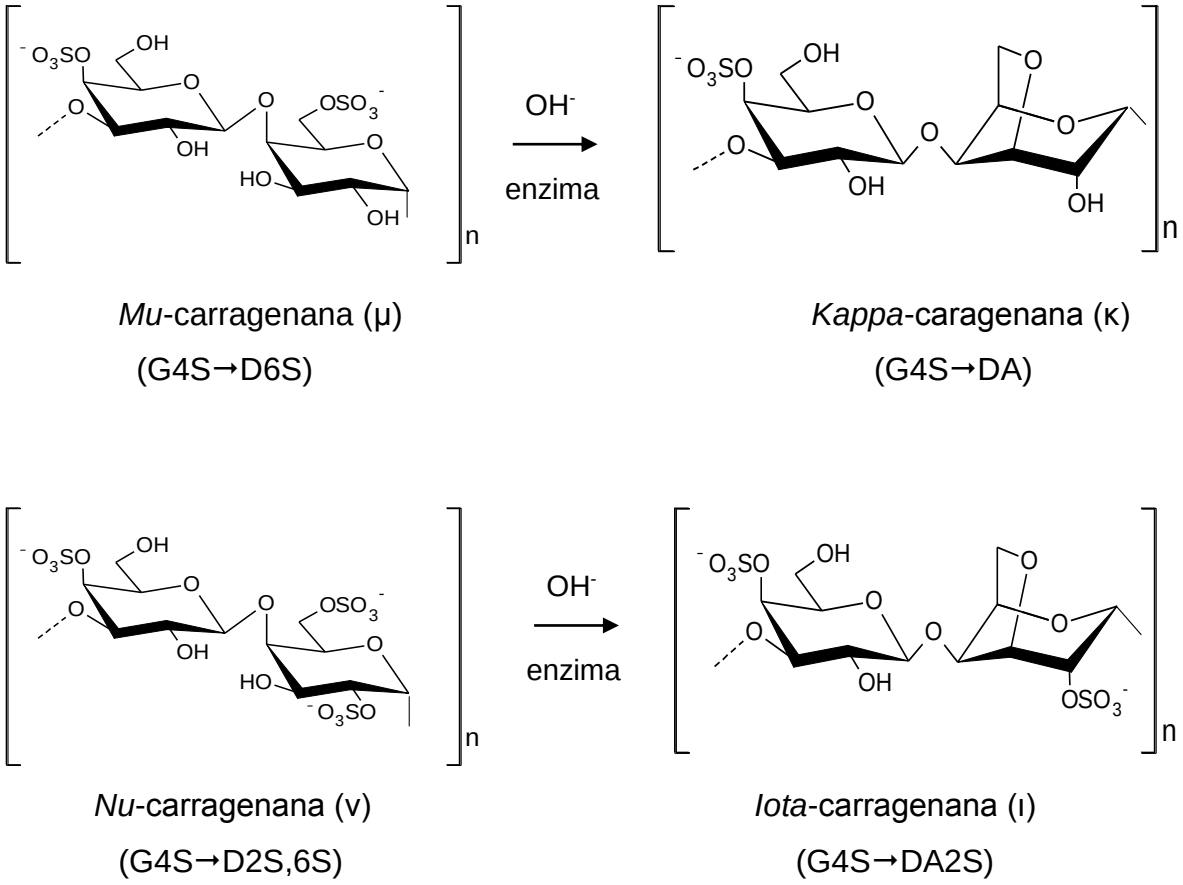
UNIDADE A (Conformação $^{4}C_{1}$) UNIDADE B (Conformação $^{1}C_{4}$)

FIGURA 6 – *KAPPA*-CARRAGENANA: CONFORMAÇÃO DA UNIDADE A (β-D-GALACTOSE-4-SULFATO) $^{4}C_{1}$ E CONFORMAÇÃO DA UNIDADE B (3,6-ANIDRO-α-D-GALACTOSE) COM CONFORMAÇÃO $^{1}C_{4}$.
FONTE: O autor (2014).

Apesar do fato de ambas as fases nucleares das Gigartinaceas conterem enzimas sulfohidrolase, as quais convertem α-galactose 6-sulfato e 2,6-dissulfato nos correspondentes derivados 3,6-anidrogalactose, esta reação ocorre somente com os precursores *Mu* e *Nu*-carragenanas em plantas haplóides (cistocárpicas). Estas enzimas são inibidas por *Lambda*-carragenanas (CIANCIA *et al*., 1993b).

Lawson e Rees (1970) propuseram que a modificação química (tratamento alcalino) das carragenanas pudesse ocorrer *in vivo*, através da ação de enzimas. Ao modificar enzimaticamente a *Mu*-carragenana de *Gigartina stellata* este dado foi confirmado. Este polissacarídeo gerou *Kappa*-carragenana, através da utilização de um extrato enzimático, purificado com sulfato de amônio (obtido através da própria alga). Assim, as carragenanas *Mu* e *Nu* foram consideradas os precursores

biológicos de *Kappa* e *Iota*-carragenana, respectivamente (Figura 7) (NOSEDA, 1994).



Mu-carragenana (μ) (G4S→D6S)

Kappa-caragenana (κ) (G4S→DA)

Nu-carragenana (ν) (G4S→D2S,6S)

Iota-carragenana (ι) (G4S→DA2S)

FIGURA 7 – REAÇÃO DE CICLIZAÇÃO: TRANSFORMAÇÃO DE *MU*- E *NU*-CARRAGENANAS EM *KAPPA*- E *IOTA*-CARRAGENANAS, RESPECTIVAMENTE
FONTE: Van de Velde *et al*. (2002)

Em laboratório o tratamento alcalino pode ser utilizado para auxiliar na caracterização estrutural das galactanas, pelo fato de serem estruturas mais repetitivas apresentam espectros de RMN menos complexos, e estes podem ser utilizados para auxiliar nos assinalamentos dos espectros de RMN da galactana nativa (FERREIRA, 2011).

A quantificação das unidades 3,6-anidro-galactose pode ser realizada por diferentes métodos como: integração da região α-anomérica dos espectros de RMN de ^{1}H, fotocolorimétricos pelo método de resorcinol (YAPHE; ARSENAULT, 1965) e por análises de composição monossacarídica após hidrólise redutiva parcial (STEVENSON; FURNEAUX, 1991; JOL *et al*., 1999).

Devido suas excelentes propriedades físicas funcionais, como capacidades espessantes, geleificantes e estabilizantes, que podem ser melhoradas através de modificações, como o tratamento alcalino, as carragenanas são amplamente utilizadas na indústria alimentícia e têm sido usadas para melhorar a textura de queijos cottage, para controlar a viscosidade e textura de pudins e sobremesas lácteas, e como aglutinantes e estabilizadores em indústria de processamento de carne, para a fabricação de salsichas e hambúrgueres com baixo teor de gordura. Outros produtos como gelatinas, alimentos para animais e molhos também tem a adição destes polissacarídeos. Na indústria farmacêutica, as carragenanas atuam como excipientes de comprimidos devida boa compatibilidade, alta robustez e viscoelasticidade persistente do comprimido durante a compressão. Estes polissacarídeos também são utilizados em outras indústrias como de cosméticos, têxtil e de papel (CAMPO *et al*., 2009; VAN DE VELDE *et al*., 2002).

2.3.5 Precipitação com cloreto de potássio em galactanas

As carragenanas têm um comportamento hidrofílico, deste modo são solúveis em água e insolúveis em solventes orgânicos. A solubilidade é influenciada pelos grupos sulfato, estes apresentam maior caráter hidrofílico em relação a 3,6-anidrogalactose. *Kappa* e *Iota*-carragenanas, por apresentarem altas porcentagens de unidades 3,6-anidrogalactose, precisam ser aquecidas para dissolverem completamente em soluções aquosas. Já, *Lambda*-carragenanas dissolvem-se em água à temperatura ambiente, pois estes polissacarídeos não apresentam unidades 3,6-anidrogalactose e contém um alto teor de éster de sulfato (GELYMAR, 2014).

Híbridos de *Kappa/Iota*-carragenanas dissolvem-se em temperaturas de 50-60 °C e formam uma rede molecular tridimensional, suspendendo a água ao formar um gel, quando resfriadas. Em solução aquosa, a geleificação acontece, pois estas carragenanas formam gel na presença de íons potássio, isto ocorre quando as carragenanas são dissolvidas através de aquecimento, com um resfriamento sequencial, este processo resulta na formação de uma rede tridimensional (Figura 8) (FARIA, 2002).

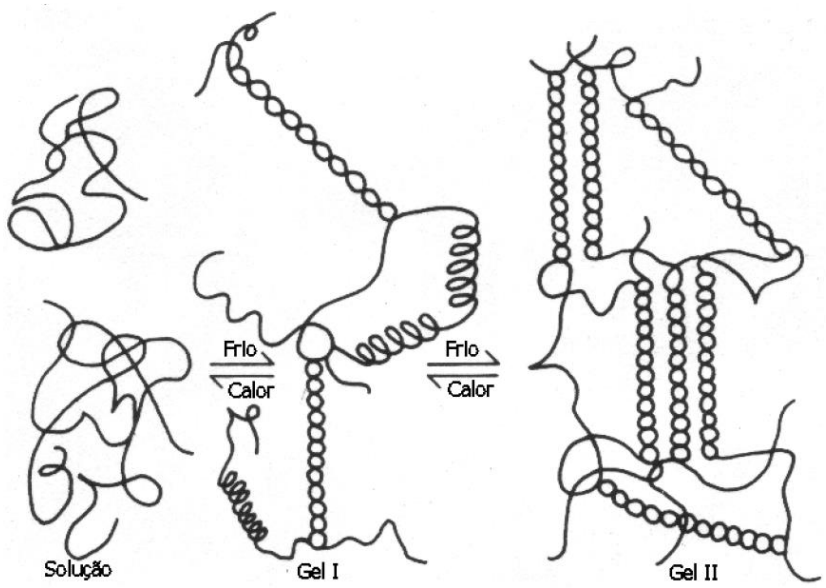


FIGURA 8 – FORMAÇÃO DA ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL NA FORMAÇÃO DE GÉIS EM CARRAGENANAS
FONTE: Rees (1977); Pereira (2014).

Os grupos sulfato das carragenanas interagem com os cátions que estão presentes na solução. O mecanismo em que os cátions causam a geleificação da carragenana em solução envolve a forma e o tamanho dos íons potássio e cálcio, permitindo que estes íons encaixem-se na hélice da molécula do hidrocolóide. Deste modo há uma estabilização da estrutura através da ligação dos íons positivos com os grupos sulfato das carragenanas carregados negativamente. Diferentes carragenanas geleificam em diferentes concentrações de cloreto de potássio (KCl), de acordo com o grau de sulfatação (CEREZO, 1967; LIN, 1977).

Em *Kappa* e *Iota*-carragenana verifica-se a ausência de sulfato no carbono 6 (C-6) e a presença de 3,6-anidrogalactose, esta estrutura favorece a formação da conformação helicoidal. Estudos de difração de raio-X e de dispersão de rotação óptica revelaram que *Kappa* e *Iota*-carreagenana, em solução aquosa com temperaturas acima de 50 °C, existem enoveladas ao acaso. Com a redução de temperatura essa casualidade desaparece, deste modo a estrutura da dupla hélice é formada. Sendo assim, o resfriamento tem como resultado interações intermoleculares e adicionalmente é formada a dupla hélice. Esta estrutura (dupla hélice) serve como sustentáculo da estrutura de gel da carragenana. Caso o final de ambos os lados da dupla hélice estiver livre, este fato torna-se um ponto de junção para interação com outra estrutura de dupla hélice, resultando em uma rede de gel tridimensional (Figura 8) (ANDERSON *et al*., 1969; REES, 1969; FARIA, 2002).

As unidades α-galactose 6-sulfato (G6S ou G2,6S, que compõem as díades de *Mu* e *Nu*-carragenena) auxiliam na solubilidade em KCl. As carragenanas com baixas proporções de unidades α-galactose 6-sulfato apresentam baixa solubilidade em soluções de KCl, no entanto *Mu* e *Nu*-carragenanas são completamente solúveis (STORTZ; CEREZO, 1993).

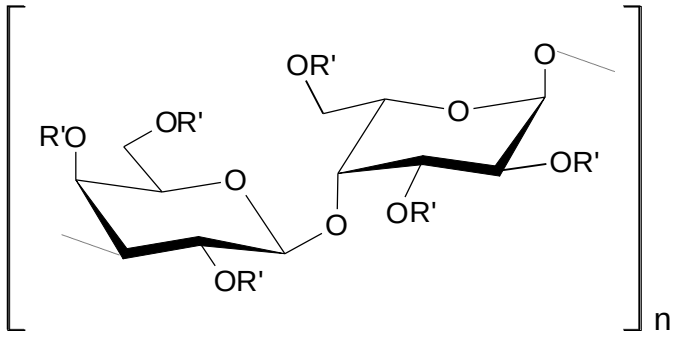
Gigartina skottsbergii das fases cistocárpica e tetrasporangial foram sequencialmente extraídas com água, em temperatura ambiente. A carragenana cistocárpica é composta por quantidades similares de polissacarídeos geleificados (*Kappa/Iota*-carragenanas) e polissacarídeos solúveis (*Mu/Nu*-carragenanas). Após precipitação com KCl foi gerada uma fração de maior rendimento precipitada (geleificada) composta por *Kappa/Iota*-carragenanas e pequenas quantidades de carragenanas solúveis *Mu/Nu*. Já a fração solúvel foi composta majoritariamente por *Mu/Nu*-carragenanas (MATULEWICZ *et al*., 1989).

O fracionamento das carragenanas tetrasporofíticas com cloreto de potássio, realizado por Matulewicz *et al*. (1989), indica a ausência de carragenanas do tipo *Kappa/Iota* na amostra e a composição majoritária de *Lambda*-carragenanas. As frações majoritárias geradas foram submetidas ao tratamento alcalino e fracionamento com KCl, gerando carragenanas não geleificadas, mostrando baixas porcentagens de 3,6-anidrogalactose.

O procedimento de fracionamento com KCl resulta na separação dos diferentes tipos de polissacarídeos, deste modo pode ser utilizado para purificação das frações desejadas.

2.4 GALACTANAS DO TIPO AGARANAS

As galactanas sulfatadas do tipo agaranas possuem uma estrutura básica repetitiva, com uma cadeia principal formada por unidades de (1→3)-β-D-galactopiranose (unidade A) e (1→4)-α-L-galactopiranose (unidade B). Deste modo, diferem das carragenanas pela presença da unidade B na forma estereoquímica L. Frequentemente as unidades B das agaranas estão na forma de seu derivado ciclizado 3,6-anidrogalactose (Figura 9) (PAINTER, 1983).



R’ = H, SO_3^-, CH_3

[(→ 3) – β-D-galactopiranose – (1→4) – α-L-galactopiranose – (1→)] $_n$

Unidade A Unidade B

FIGURA 9 – ESTRUTURA LINEAR BÁSICA REPETITIVA DAS AGARANAS

Devido sua complexidade e diversidade de substituições, não é possível classificar as agaranas em “estruturas ideais”, como as carragenanas. A variação da estrutura básica das agaranas ocorre devida presença de diferentes grupos substituintes nas unidades A e B, podendo estas unidades apresentarem-se sulfatadas, metiladas e/ou glicosiladas. As unidades A podem apresentar, além destes grupos substituintes, acetal de ácido pirúvico em C-4 e C-6. As unidades B podem ainda estar ciclizadas formando 3,6-anidro-α-L-galactopiranose (USOV, 1992; USOV, 1998; STORTZ; CEREZO, 2000; DAMONTE; MATULEWICZ; CEREZO, 2004).

As agaranas têm uma variedade de aplicações, como na indústria alimentícia, biotecnologia e medicina, primariamente como agentes geleificantes. Ágar é sintetizado por várias algas da classe Rhodophyceae. No entanto, somente as algas da ordem Gelidiales (*Gelidium, Pterocladia* e *Gelidiella*) e Gracilariales (*Gracilaria, Gracilariopsis* e *Hydropuntia*) estão sendo comercialmente explorados como matérias-primas para a sua produção como agente geleificante para várias aplicações (VILLANUEVA *et al.*, 2010).

O agararose é um exemplo de estrutura simples de agaranas, composta por uma sequência completamente regular de unidades dissacarídicas idênticas: [→3)-β-D-galactopiranosil-(1→4)-3,6-anidro-α-L-galactopiranosil-(1→]. Modificações na

cadeia principal influenciam fortemente as propriedades dos polissacarídeos, a agarose, por exemplo, possui alto conteúdo de unidades 3,6-anidrogalactose e baixo teor de grupos sulfato, resultando em boa capacidade de geleificação. A variação na posição e grau de substituição são fatores que influenciam diretamente a solubilidade destes biopolímeros e podem diminuir significativamente as propriedades formadoras de gel. Um maior grau de substituição por grupos sulfato, por exemplo, produz géis de menor força, géis macios (USOV, 1992; USOV, 1998; VILLANUEVA *et al*., 2010).

Os polissacarídeos não geleificantes ou com baixa propriedade formadora de gel, podem ser transformados em geleificantes por modificações alcalinas (tratamento alcalino), aumentando a proporção de unidades 3,6-anidrogalactose. Esta reação, conforme descrita anteriormente ocorre quando unidades de α-galactose 6-sulfatadas estão presentes: por aquecimento do polissacarídeo em meio altamente alcalino, o grupo OH no C-3 é ionizado, e produz um ataque nucleofílico intramolecular no grupo sulfato do C-6. A reação é altamente específica, visto que nenhum outro grupo sulfato é afetado. Esta reação é amplamente utilizada em laboratório e a nível industrial para promover propriedades de geleificação em carragenanas e agaranas (NAVARRO; STORTZ, 2005).

As agaranas possuem grande variedade de grupos substituintes, que são encontrados em diferentes proporções e posições, resultando em uma grande complexidade estrutural para alguns polímeros. As propriedades físico-químicas dos géis de ágar, bem como as atividades biológicas desempenhadas por estes polímeros, são afetadas pela localização e quantidade destes grupos substituintes (FREILE-PELEGRÍN; MURANO, 2005).

As agaranas apresentam diversas atividades biológicas, como atividade antiviral anti: HIV 1 e 2, HSV (vírus herpes simplex), RSV (vírus respiratório sincicial), VSV (vírus da estomatite vesicular), influenza A (WITVROUW *et al*., 1994), HCMV (citomegalovírus) (PUJOL *et al*., 1996), HSV 1 E 2 (DUARTE *et al*., 2001,2004; MAZUMDER *et al*., 2002), HIV-1 (HASLIN *et al*., 2001).

No filo Rhodophyta, o maior número de espécies conhecidas pertence à ordem Ceramiales. Muitas espécies desta ordem vêm sendo estudadas e descritas como produtoras de agaranas com um alto padrão de complexidade estrutural, sendo normalmente substituídas por diferentes grupos. Estes polissacarídeos podem estar substituídos nas unidades A e B por grupos metil, sulfato ou podendo

estar glicosiladas em diferentes posições. As unidades A podem ainda conter substituição por acetal de ácido pirúvico e as unidades B podem estar na forma de 3,6-anidro-α-L-galactopiranose (USOV; IVANOVA; SHASHKOV, 1983; DUARTE *et al*., 2002; DUARTE *et al*., 2004; CARDOSO *et al*., 2007; PRADO; CIANCIA; MATULEWICZ, 2008; VILLANUEVA *et al*., 2010).

2.4.1 Agaranas da ordem Ceramiales

A ordem Ceramiales possui 2.643 espécies conhecidas (ALGAE BASE, 2015), várias espécies estudadas já foram descritas como produtoras de agaranas sulfatadas.

Estudos realizados com *Bostrychia montagnei*, por Duarte *et al*., (2001) e Duarte *et al*., (2002) mostraram que esta espécie sintetiza agaranas sulfatadas de baixa massa molecular, com menores quantidades de xilanas e/ou xilogalactanas, também de baixa massa molecular. As unidades A podem ser substituídas por grupos metil no C-6, unidades simples de xilose e em menores proporções por unidades galactopiranosil. Estas unidades são principalmente sulfatadas em C-4 e em menores proporções em C-6 e C-2. Aproximadamente metade das unidades B são constituídas por 3,6-anidrogalactopiranosil que podem ser não substituídas, ou substituídas no C-2 por grupos metil. As unidades B (L-galactopiranosil) apresentaram sulfatação no C-3, com menores quantidades de 2,3- e 3,6-dissulfato e 2-*O*-metil ou 2-*O*-glicosil 3-sulfatada. Estas agaranas possuem atividade antiviral contra vírus herpes simplex, HSV-1 e HSV-2. Esta atividade antiviral pode ser correlacionada com o peso molecular e o conteúdo de sulfato dos polissacarídeos.

As agaranas sulfatadas isoladas da alga vermelha *Acanthophora spicifera*, apresentam as unidades A altamente substituídas por grupos sulfato no C-2, podendo conter acetal de ácido pirúvico, além de baixa porcentagem de grupos sulfato ou metil no C-6. As unidades B são formadas majoritariamente por unidades 3,6-anidro-α-L-galactose e seus precursores α-L-galactose 6-sulfato e baixas porcentagens de 3,6-anidro-α-L-galactose 2-sulfato, α-L-galactose 2,6-dissulfato, α-L-galactose 2,3,6-trissulfato, α-L-galactose 2,6-dissulfato 3-xilose, 2-*O*-metil-α-L-galactose e α-L-galactose não substituída. Algumas agaranas isoladas de *A.*

spicifera mostraram uma seletiva e potente atividade antiviral contra os vírus HSV-1 e HSV-2 (DUARTE *et al*., 2004).

Gonçalves *et al*. (2002) realizaram um pré-tratamento com álcali em *A. spicifera* para a completa ciclização de α-L-galactopiranose 6-sulfato para 3,6-anidro-α-L-galactopiranose e submeteram à hidrólise redutiva parcial. Deste modo foram isolados dissacarídeos alditóis com grupos sulfato em C-2 das unidades A e também com acetal de ácido pirúvico nestas mesmas unidades, o que está de acordo com os resultados prévios sobre a estrutura química das agaranas isoladas desta espécie.

Os polissacarídeos produzidos por duas espécies de *Chondrophycus: Chondrophycus papillosus* e *Chondrophycus flagelliferus*, reclassificadas há pouco tempo como *Palisada papilosa* e *Palisada flagellifera,* respectivamente, foram estudados por Cardoso *et al*., (2007). Estas espécies apresentaram além de galactanas sulfatadas, xilomananas sulfatadas formadas por uma cadeia principal de unidades de β-D-manose 4-*O*-ligadas sulfatadas em C-2, podendo estar ou não ramificadas em C-6 por unidades de β-D-manose sulfatadas em C-2 ou β-D-xilose. Esta foi a primeira vez que se verifica a presença deste tipo de polissacarídeo.

Estudos realizados com as galactanas sulfatadas de *Palisada flagellifera* por Ferreira *et al*. 2012, demonstraram que *P. flagellifera* sintetiza uma família de agaranas sulfatadas, com estruturas altamente complexas. As unidades A são principalmente 2-sulfatadas com acetal de ácido pirúvico em C-4 e C-6, e também 6-*O*-metiladas, sendo estas últimas parcialmente 2- e 2,4-sulfatadas. Em menores quantidades foi verificada a presença de unidades β-D-galactopiranosil 2-, 6- e 2,6-sulfatadas, 6- glicosiladas ou não substituídas. As unidades B foram compostas predominantemente de L-galactoses com seus derivados ciclizados, 3,6-anidrogalactose e 3,6-anidro-2-*O*-metilgalactose. Uma quantidade significante de unidades α-L-galactopiranose estavam ligadas a unidades de β-D-galactose 2-sulfato piruvatadas. Uma significativa percentagem das unidades B são constituídas por unidades de α-L-galactose 6-sulfato substituídas em C-3 por unidades simples de xilose, galactose e/ou unidades de 2,3-di-*O*-metil-galactose ou grupos sulfato que impede a sua ciclização em derivados 3,6-anidrogalactose. Estudos de atividade antiviral com *P. flagellifera* mostraram que agaranas desta espécie apresentam atividade nula contra o vírus HSV-1, mas é eficaz contra o vírus HSV-2 (FERREIRA, 2011).

Frações polissacarídicas isoladas de *Polysiphonia nigrescens* foram caracterizadas contendo agaranas ciclizadas parcialmente sulfatadas, altamente substituídas em C-6 principalmente com grupos sulfato e em menores proporções foram observados grupos metil e unidades simples de β-D-xilose. Agarose 6-sulfatada foram também isoladas. Os espectros de RMN apresentaram sinais correspondentes às diades G6S→L6S, os quais foram pela primeira vez completamente assinalados (PRADO; CIANCIA; MATULEWICZ, 2008).

As algas vermelhas *Laurencia obtusa* e *Laurencia filiformis* compreendem um complexo de agaranas sulfatadas. *L. obtusa* apresenta unidades de β-D-galactose 3-ligada em parte sulfatada no C-2 ou metilada no C-6, enquanto as unidades 4-ligadas são principalmente de 3,6-anidro-α-L-galactose e α-L-galactose 6-sulfato, algumas das últimas unidades são substituídas com β-D-xilose na posição-3, impedindo a ciclização alcalina. As unidades A de *L. filiformis* são principalmente sulfatadas no C-2, mas aproximadamente metade destes resíduos são piruvatados. As unidades B ciclizadas em 3,6-anidrogalactose são substituídas por grupos metil ou em partes com unidades simples de β-D-xilose no C-2 (CANELÓN *et al*., 2014).

Chondria macrocarpa foi descrita por Furneaux e Stevenson (1990) como produtora de galactanas sulfatadas do grupo das agaranas. Estas agaranas apresentam um elevado teor de unidades precursoras de 3,6-anidro-α-L-galactopiranose (α-L-galactopiranose 6-sulfato) e unidades de xilose como terminais não redutores em C-3 das unidades de α-L-galactopiranose. E esse tipo de substituição tem sido também descrita para algumas agaranas da ordem Ceramiales (USOV; ELASHVILI, 1991; FERREIRA *et al*., 2012). Os polissacarídeos de *C. macrocarpa* coletados no outono e na primavera foram analisados por Miller e Blunt (2002). No outono os polissacarídeos foram semelhantes aos descritos por Furneaux e Stevenson (1990), mas os polissacarídeos dos exemplares da primavera mostraram altos níveis de α-L-galactopiranose 6-sulfato, unidade precursora, e quantidades moderadas de grupos *O*-metil em C-6. Exemplares coletados no mês de novembro (primavera no hemisfério sul) também continham acetal de ácido pirúvico (MILLER; BLUNT, 2002). Miller e Blunt (2002) concluíram que as agaranas de *C. macrocarpa* variam de acordo com a estação do ano, sendo na primavera polímeros precursores de ágar e no outono polímeros de ágar sulfatado.

A família Rhodomelaceae, é a mais estudada quanto à estrutura química de seus polissacarídeos (STORTZ; CEREZO, 2000). Esta família compõe o maior

número de espécies na ordem Ceramiales, com 1.059 espécies conhecidas (ALGAE BASE, 2015).

As agaranas podem ser aplicadas industrialmente e possuem várias atividades biológicas, devida complexidade de seus polissacarídeos. Assim é importante o conhecimento da estrutura química destes polímeros, para que suas aplicações sejam otimizadas, bem como o estudo de diferentes atividades biológicas que podem ser desempenhadas pelas agaranas.

2.5 ESTUDOS DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS DOS POLISSACARÍDEOS

Os diferentes tipos de polissacarídeos biossintetizados pelas algas apresentam uma diversidade de atividades biológicas, como por exemplo, contra enteropatógenos (GUZMAN-MURILLO; ASCENCIO, 2000; MEDINA, 2001; O'DOHERTY *et al*., 2010); atividade antiviral (DUARTE *et al*., 2001, 2004; TALARICO *et al*., 2004, 2005); antitumoral (ZHOU *et al*., 2004); antiangiogênica (BERTÉ, 2013) e antimetapneumovirus (MENDES *et al*., 2014).

2.5.1 Capacidade de adsorção de bactérias enteropatogênicas

As infecções entéricas são uma das maiores causas de mortalidade humana global, chegando a mais de dois milhões de mortes/ano. Deste modo, há uma grande necessidade para a medicina humana e animal, bem como para as indústrias alimentícias, o desenvolvimento de métodos de defesa contra as infecções causadas por enterobactérias. Dentre as principais enterobactérias, podem ser citadas as dos seguintes gêneros: *Escherichia*, *Salmonella*, *Clostridium* e *Helicobacter*. Essas bactérias gram-negativas estão intimamente correlacionadas às infecções intestinais (WILSON *et al*., 2002; PATON; MORONA; PATON, 2006; GANNER *et al*., 2010).

O CDC (Centro de Controle e Prevenção de Doenças) estima que a cada ano aproximadamente 1 em cada 6 americanos (ou 48 milhões de pessoas) fica

doente, 120.000 são hospitalizados e 3.000 morrem de doenças transmitidas por alimentos contaminados. Os índices de infecções causadas por doenças transmitidas por alimentos (DTA) divulgados mostraram uma redução de 44% de transmissão por *E. coli* 0157 e um aumento de 3% por *Salmonella* sp., sendo esta responsável pelo maior número de hospitalizações e mortes, dentre as DTA, gerando um custo de 365 milhões de dólares em despesas médicas por ano (CDC, 2014).

A *Salmonella* sorotipo Typhimurium e *Samonella* sorotipo Enteritidis são as mais comuns nos Estados Unidos. A estimativa é de que aproximadamente 400 pessoas morrem por ano com salmonelose aguda (salmonelose é o termo usado para a infecção com a bactéria *Salmonella*). O CDC estima que nos Estados Unidos, mais de dois milhões de pessoas ficam doentes todos os anos com infecções que apresentam resistência a antibióticos, com pelo menos 23 mil mortes em consequência (CDC, 2014).

Segundo dados epidemiológicos da Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS) entre os anos de 2000 e 2013 foram identificados aproximadamente 1.522 surtos de infecções causadas por *Salmonella* sp. no Brasil (Figura 10) (SVS, 2013).

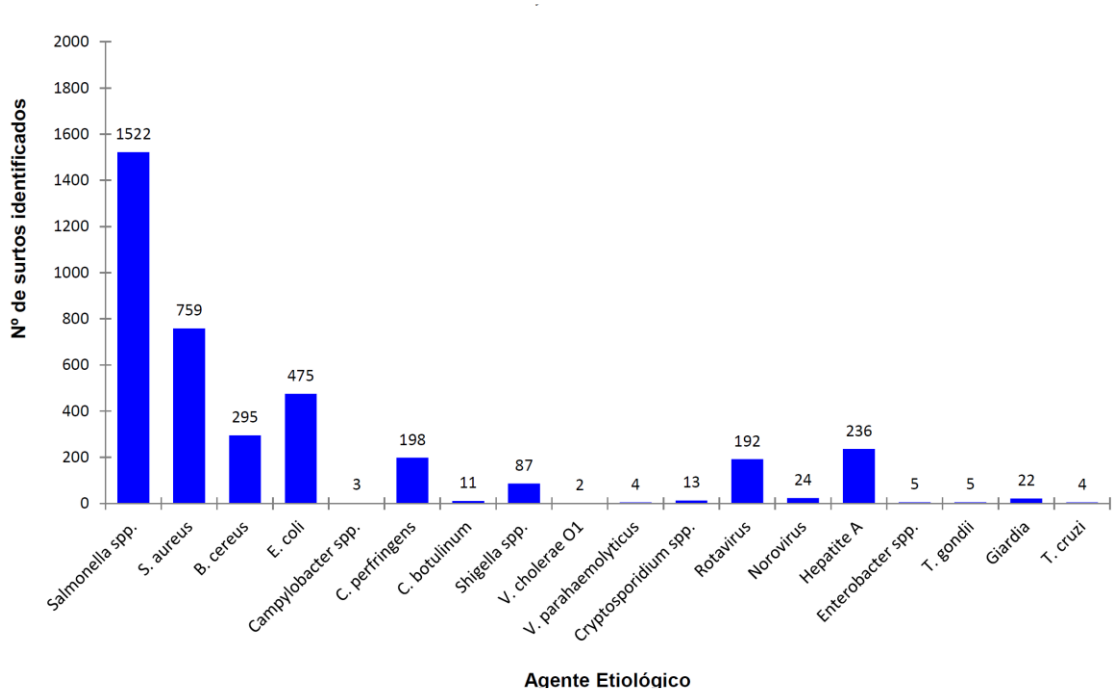


FIGURA 10 - NÚMERO DE SURTOS POR AGENTE ETIOLÓGICO NO BRASIL, 2000-2013
FONTE: SVS (2013)

A região Sul é a mais notificada em ocorrência de DTA, não necessariamente é a região com maior número de casos, mas sim onde ocorre o maior número de notificações (Figura 11) (SVS, 2013).

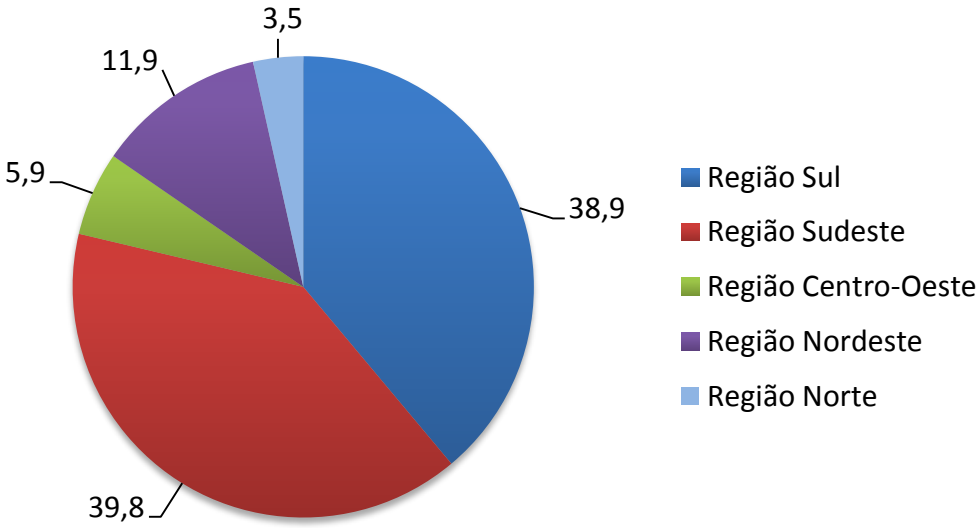


FIGURA 11 - PROPORÇÃO DE SURTOS POR REGIÃO NO BRASIL, 2000-2013
FONTE: SVS (2013)

A salmonelose tem diversas fontes de contaminação: aves domésticas (29%), ovos (18%), vegetais, frutas e nozes (13%), carne de porco (12%), carne bovina (8%) e outras fontes como folhas verdes, raízes, peixes, cereais em grão, laticínios (20%) (CDC, 2014).

Juntos, a transmissão por aves, carne de porco e carne bovina, são aproximadamente 70% da contaminação. Sendo que os animais podem transportar bactérias patogênicas que representam um potencial risco para os seres humanos, às vezes até sem causar sintomas ao animal em si, sendo este um grave problema de saúde pública. Além disso, os animais com problemas gastrointestinais podem causar perdas econômicas consideráveis na pecuária (GANNER; SCHATZMAYR, 2012).

Durante décadas tem-se utilizado antibióticos intensivamente na produção de animais, como promotores de crescimento e para controlar patógenos intestinais, reduzindo a mortalidade e promovendo melhora na saúde e desempenho animal. O uso prolongado de antibióticos promotores de crescimento - AGP - (*Growth-promoting Antibiotics)* ocasionou resistência das bactérias patogências aos

antibióticos. Houve então um maior interesse em produtos alternativos aos AGPs, que mantenham equivalentes o desempenho e saúde animal (PATON; MORONA; PATON, 2006; BOROWSKY; CORÇÃO; CARDOSO, 2009; GANNER; SCHATZMAYR, 2012). Consequentemente, a procura destas alternativas para AGPs tem sido intensificada e efeitos benéficos no sistema imune e na saúde do intestino tem sido sugeridos e discutidos para estes. Alternativas naturais como produtos de leveduras, prebióticos, probióticos, acidificantes, óleos essenciais, glicanas (oligômeros ou polímeros de manose) estão atualmente no foco de interesse, e assim, estão cada vez mais sendo investigados (MORAN, 2014; GANNER; SCHATZMAYR, 2012).

O Bio-Mos® (MOS), baseado em β-glucanas e mananoligossacarídeos, derivado da parede celular de *Saccharomyces cerevisiae*, é usado como um pró-nutriente, ingrediente alimentar que promove um melhor desempenho (crescimento do animal) e aumenta a resistência do animal contra doenças entéricas. Estas características do produto se dão, devido suas capacidades de: inibir a colonização de patógenos entéricos bloqueando a adesão bacteriana, pois contém receptores de manose que podem ligar aos sítios receptores da bactéria patogênica evitando a adesão da bactéria ao epitélio intestinal; melhorar a função imunológica, pelo aumento da imunidade; e aumentar a barreira de muco no lúmen intestinal, através da produção de imunoglobulina A – IgA, que inibe a ligação e penetração da bactéria ao lúmen. Especificamente, o MOS é um prebiótico que tem a capacidade de aderir às fímbrias do tipo 1 da bactéria e tem sido usado como uma alternativa ao uso dos antibióticos (OFEK; HASTY; SHARON, 2003; KOCHER; TUCKER, 2005; BIGGS; PARSONS; FAHEY, 2007; BOROWSKY; CORÇÃO; CARDOSO, 2009; GURBUZ *et al*., 2010; TEODORO, 2012; MORAN, 2014).

Diversas pesquisas divulgadas nesta última década têm demonstrado o potencial de compostos alternativos que atuem impedindo a adesão de enteropatógenos ao epitélio intestinal. Neste contexto, foi demonstrado que *Lactobacillus crispatus* exibiu capacidade de autoagregação e atividade inibitória contra a adesão de *Salmonella braenderup* (SUN *et al*., 2012). *Lactobacillus acidophilus* interferiram no processo de adesão de *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium (NAKAZATO *et al*., 2011). Polissacarídeos sulfatados de microalgas inibiram o processo de citoadesão pelo patógeno humano *Helicobacter pylori*, sendo que *H. pylori* tem especificidade para os resíduos de carboidratos do heparan

sulfato, A interação da ligação com o receptor aumenta devida junção da carga líquida com a estereoquímica molecular (GUZMAN-MURILLO; ASCENCIO, 2000). Estudos realizados com goma Konjac, extrato de semente de gergelim, abóbora e tomate revelaram eficientes matrizes de ligação a *Salmonella* sp., já para *Escherichi coli* extratos de sementes de gergelim e alcachofra foram mais eficientes (BECKER; GALLETTI, 2008). Derivados de levedura, incluindo componentes da parece celular de levedura são alternativas promissoras para antibióticos (GANNER; SCHATZMAYR, 2012). Estudos realizados em nosso laboratório de química de carboidratos com farelo de soja (RODRIGUES, 2012), extratos de microalgas (MACHADO, 2012) e leveduras *Saccharomyces cerevisiae* PE-2 (TEODORO, 2012) apresentaram capacidade de ligação à enterobactérias *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium *in vitro*. Rodrigues (2012) estudou várias frações obtidas através do farelo de soja, a maior capacidade de ligação foi obtida com uma fração contendo alto teor de proteínas (86,6%) e baixo teor de carboidratos (13,4%), estes, compostos majoritariamente por ácidos urônicos, seguido de galactose e manose. Entretando Machado (2012) obteve o melhor resultado de capacidade de ligação com uma fração extraída da microalga *Pavlova gyrans*, a fração apresentou alto teor de proteínas e carboidratos constituídos majoritariamente por β-glucanas – (1→3)-ligadas. E avaliando a capacidade de ligação à bactéria enteropatogênica, Teodoro (2012) obteve melhores resultados com o MOS, contendo uma fração solúvel composta por mananas e uma fração insolúvel composta por proteínas, mananas e β-glucanas.

Estes estudos demonstram que há diferentes estruturas, as quais podem ser responsáveis pela ligação à bactéria enteropatogênica, assim, é necessário um estudo com a estrutura química nativa e modificada, para que se possa avaliar qual destas tem a maior capacidade de ligação, podendo sugerir os fatores responsáveis pela adesão entre polissacarídeo e bactéria.

Devido à grande procura por alternativas naturais aos antibióticos e a variabilidade estrutural dos polissacarídes sulfatados obtidos de algas marinhas, bem como as inúmeras bioatividades atribuídas a estes, é de grande interesse estudar a capacidade de ligação de polissacarídeos sulfatados, com estruturas químicas definidas, à bactérias enteropatogênicas. Neste projeto foram realizados testes de ligação à enteropatógenos com polissacarídeos obtidos de diferentes

espécies de algas marinhas (*screening*) e também através de modificações químicas realizadas com as carragenanas da alga *Gigartina skottsbergii* (fase gametofítica).

2.5.1.1 Mecanismo de adsorção de enterobactérias

Para sobreviver no intestino, bem como multiplicar-se e invadir células intestinais, a *Salmonella* precisa se ligar aos receptores na parede intestinal. Os fatores de aderência microbiana estão ligados a adesinas e podem ser feitos a partir de polipeptídeos (proteínas) ou polissacarídeos (carboidratos ou açucares). A aderência ao tecido do hospedeiro é considerada o passo inicial importante para a sobrevivência, colonização e patogênese (processo de infecção) (LINDHORST; KIEBURG; WENZEL, 1998; WILSON *et al*., 2002).

As bactérias carregam lectinas específicas em organelas da sua superfície chamadas fímbria ou pili. A adesão bacteriana é realizada pela interação de lectinas fimbriais com a superfície de estruturas oligossacarídicas das células do hospedeiro. A caracterização estrutural dos sítios de ligação carboidrato-lectina bacteriana podem levar a um derivado de carboidrato projetado que pode efetivamente inibir a interação específica lectina-açucar. Isto pode eventualmente ajudar na prevenção da infecção bacteriana (LINDHORST; KIEBURG; WENZEL, 1998).

A maioria das espécies de *Salmonella* colonizam o trato gastro-intestinal usando estruturas especializadas conhecidas como fímbrias do tipo-1. Estas fímbrias possuem lectinas manose específicas, que reconhecem glicoproteínas, ricas em manose, localizadas sobre a superfície das células epiteliais do intestino. Por esta razão, muitos produtores estão incluindo materiais ricos em manose, como o produto Bio-Mos®, para as dietas animais, deste modo a *Salmonella* liga a manose ao invés da parede do intestino e são “empurradas” para fora do intestino ligadas ao material rico em manose (Figura 12) (LINDHORST; KIEBURG; WENZEL, 1998; WILSON *et al*., 2002; MORAN, 2014).

Os mananoligossacarídeos são mais eficazes que a manose livre na sua capacidade de se ligar a *Salmonella* (MORAN, 2014).

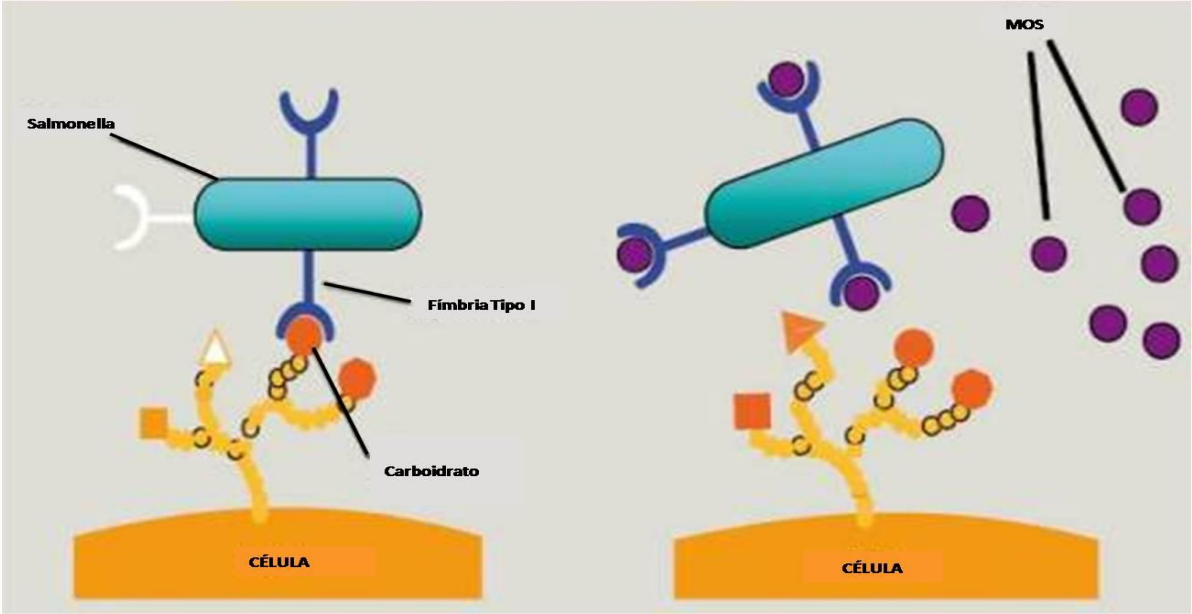


FIGURA 12 – MECANISMO DOS OLIGOSSACARÍDEOS: AÇÃO ANTI-INFECTIVA DO MOS NA FÍMBRIA DA *Salmonella*, PREVENINDO ASSIM A COLONIZAÇÃO. SEM COLONIZAÇÃO NÃO PODE OCORRER PATOGÊNESE
FONTE: MORAN (2014)

As bactérias aderem através das suas adesinas à receptores cognatos em células epiteliais da superfície da mucosa, para suportar os mecanismos normais de limpeza que visam a erradicação de patógenos invasores (Figura 13). As bactérias que não possuem adesinas são varridas (A). Na presença de inibidores de adesão (B), as bactérias são erradicadas pelo mecanismo de limpeza normal. Nota-se que a aderência de um mutante com uma adesina específica para um receptor distinto não é inibida e continua a aderir às células epiteliais (OFEK; HASTY; SHARON, 2003).

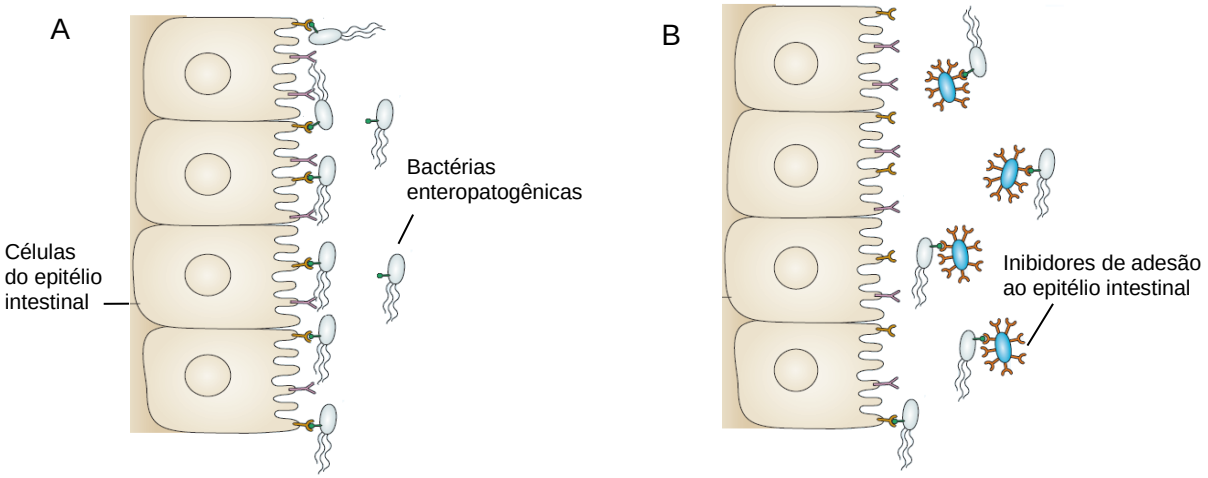


FIGURA 13 – ADESÃO BACTERIANA AO EPITÉLIO INTESTINAL: (A) BACTÉRIAS ADEREM AOS RECEPTORES ANÁLOGOS DO EPITÉLIO DO INTESTINO. (B) BACTÉRIAS ADEREM AOS RECEPTORES ANÁLOGOS DE INIBIDORES DE ADESÃO
FONTE: Modificado de PATON; MORONA; PATON (2006)

A patogênese de infecções por *Salmonella enterica* requer adesão a várias superfícies celulares do hospedeiro, e um largo número de estruturas adesivas podem ser encontradas. Dependedo do sorotipo (sorovar) da *S. enterica*, grupos de genes para vários tipos de adesinas fimbriais podem ser identificados (WAGNER; HENSEL, 2011).

Os mecanismos de patogênese bacteriana tornam-se um assunto cada vez mais importante, pois os patógenos cada vez mais adquirem resistência aos antibióticos. A capacidade de bloquear a adesão bacteriana representa uma estratégia ideal para combater a patogênese, devido à sua importância no início do processo infeccioso. É também adequado para aplicação de uma estratégia profilática para prevenir a infecção, sendo que impedir a colonização de patógenos no intestino humano e animal conduz-se a uma redução do número de infecções gastrointestinais e o risco de transmissão pela cadeia alimentar (BECKER *et al*., 2007; GANNER *et al*., 2010; MORAN, 2014).

Neste trabalho as carragenanas produzidas pela fase gametofítica da alga *Gigartina skottsbergii* (nativas e modificadas quimicamente) foram avaliadas quanto a sua atividade contra enteropatógenos (*Salmonella* sp). *Chondria littoralis*, produtora de agaranas foi estudada para elucidação de sua estrutura química.

3 JUSTIFICATIVA

O Brasil possui uma grande biodiversidade algal. Em contrapartida, poucas espécies foram estudadas quanto à estrutura química de seus polissacarídeos associados à atividade biológica. Os estudos de estrutura química dos polissacarídeos de macroalgas são importantes para a utilização industrial, bem como para entender a atuação nas mais diversificadas atividades biológicas exercidas por estes polissacarídeos, como contra enteropatógenos.

Devido à diversidade estrutural resultante do tipo, número e posicionamento dos grupos substituintes, as galactanas de algas da Ordem Gigartinales e Ceramiales são modelos de interesse no estudo de atividades biológicas.

Assim, foi investigada a capacidade de ligação de polissacarídeos sulfatados à enterobactéria *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium através de um *screening* com diferentes galactanas sulfatadas. Dentre os polissacarídeos que apresentaram resultados promissores, as galactanas sulfatadas obtidas de *Gigartina skottsbergii* (fase gametofítica) foram selecionadas para dar continuidade a estes estudos, realizando diferentes modificações químicas no polissacarídeo nativo. Essas modificações têm como objetivo auxiliar os estudos de correlação entre a estrutura química e atividade biológica apresentada por estas galactanas, na busca de uma alternativa à resistência da bactéria aos antibióticos utilizados na alimentação de animais que podem causar salmonelose, considerada uma das grandes causas globais de mortalidade.

Outro aspecto investigado no presente trabalho foi a determinação da estrutura química dos polissacarídeos sulfatados da macroalga *Chondria littoralis* pertencente à ordem Ceramiales. Neste contexto, algas da ordem Ceramiales apresentam grande diversidade estrutural, especialmente quanto a posição de grupos sulfato representando assim novos modelos estruturais para estudos de atividades biológicas.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho teve como objetivo geral o estudo da estrutura química de carragenanas e agaranas sulfatadas, nativas e/ou modificadas quimicamente, isoladas de macroalgas marinhas. Capacidade de ligação de carragenanas nativas e modificadas à bactérias enteropatogênicas foram avaliadas.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Extração dos polissacarídeos isolados de *Gigartina skottsbergii* (Rhodophyta, Gigartinales, Gigartinaceae);
- Avaliar estatisticamente a capacidade de ligação à bactéria enteropatogênica *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium (*in vitro*) exercida por polissacarídeos sulfatados obtidos de diferentes algas marinhas (*screening* com diferentes galactanas);
- Modificar quimicamente e determinar a estrutura química das galactanas sulfatadas obtidas da alga vermelha *Gigartina skottsbergii*;
- Avaliar estatisticamente a capacidade de ligação à bactéria enteropatogênica *Salmonella enterica* sv. Typhimurium (*in vitro*) exercida pelas galactanas de *G. skottsbergii* em sua forma nativa e quimicamente modificada;
- Delinear possíveis parâmetros estruturais responsáveis pela atividade de ligação dos polissacarídeos estudados à *Salmonella enterica* sv. Typhimurium;
- Extração e purificação de polissacarídeos isolados de *Chondria littoralis* (Rhodophyta, Ceramiales, Rhodomelaceae);
- Determinação da estrutura química fina dos polissacarídeos purificados por métodos químicos e espectroscópicos.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Os exemplares da alga *Gigartina skottsbergii* foram gentilmente cedidos pela empresa Extractos Naturales Gelymar S.A., localizada em Puerto Montt, Chile.

Os exemplares da alga vermelha *Chondria littoralis* foram coletados na praia de Parati (Anchieta) no Espírito Santo, em junho de 2007. A classificação foi feita pela Drª. Mutue Toyota Fujii, do Instituto de Botânica, seção de ficologia, São Paulo. Estes exemplares foram depositados no Herbário do Departamento de Botânica da Universidade Federal do Paraná – UFPR e registrados com o número de tombo 60125.

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

5.2 POSICIONAMENTO SISTEMÁTICO DAS ESPÉCIES

Filo: Rhodophyta;
Classe: Florideophyceae;
Ordem: Gigartinales;
Família: Gigartinaceae;
Gênero: *Gigartina*;
Espécie: *Gigartina skottsbergii* (ALGAE BASE, 2015).
Ordem: Ceramiales;
Família: Rhodomelaceae;
Gênero: *Chondria*;
Espécie: *Chondria littoralis* (ALGAE BASE, 2015).

5.3 EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS

Gigartina skottsbergii e *Chondria littoralis* secas e moídas foram separadamente submetidas à extração aquosa (1,0% p/v) sob agitação mecânica, a 25 °C por 3 h. Os respectivos extratos foram centrifugados a 8.000 rpm por 20 min., 4 °C, o sobrenadante foi separado do resíduo. Aos sobrenadantes foram adicionados 3 volumes de etanol. Após centrifugação (8.000 rpm, 20 min., 4 °C), os precipitados etanólicos foram ressolubilizados em água, dialisados contra água destilada e liofilizados (FIGURA 14 e 15).

O resíduo obtido após a extração a 25 °C de *Chondria littoralis* foi submetido à extração aquosa (1,0% p/v) sob agitação mecânica a 80 ˚C por 3 h. Após centrifugação (8.000 rpm, 20 min., 4 °C) ao sobrenadantes foi adicionado etanol (3 volumes) e após centrifugação (8.000 rpm, 20 min., 4 °C) os polissacarídeos obtidos por precipitação etanólica foram ressolubilizados em água, dialisados contra água destilada e liofilizados (FIGURA 15).

Os processos de extração a 25 °C de *G. skottsbergii* e *C. littoralis* e os procedimentos para obtenção dos polissacarídeos solúveis em água a 80 ˚C de *C. littoralis* foram realizados 3 vezes em cada temperatura.

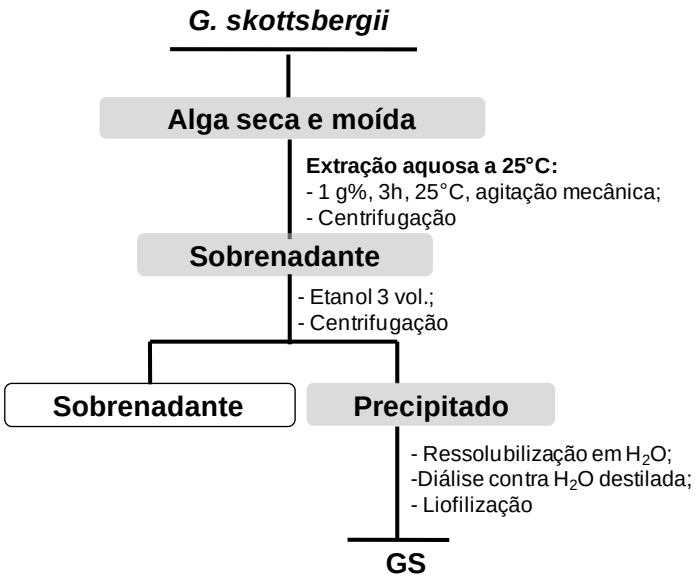


FIGURA 14 – EXTRAÇÃO AQUOSA A 25 °C DA ALGA *Gigartina skottsbergii*

Os polissacarídeos obtidos das três extrações de *G. skottsbergii* a 25 °C foram reunidos e identificados como fração GS.

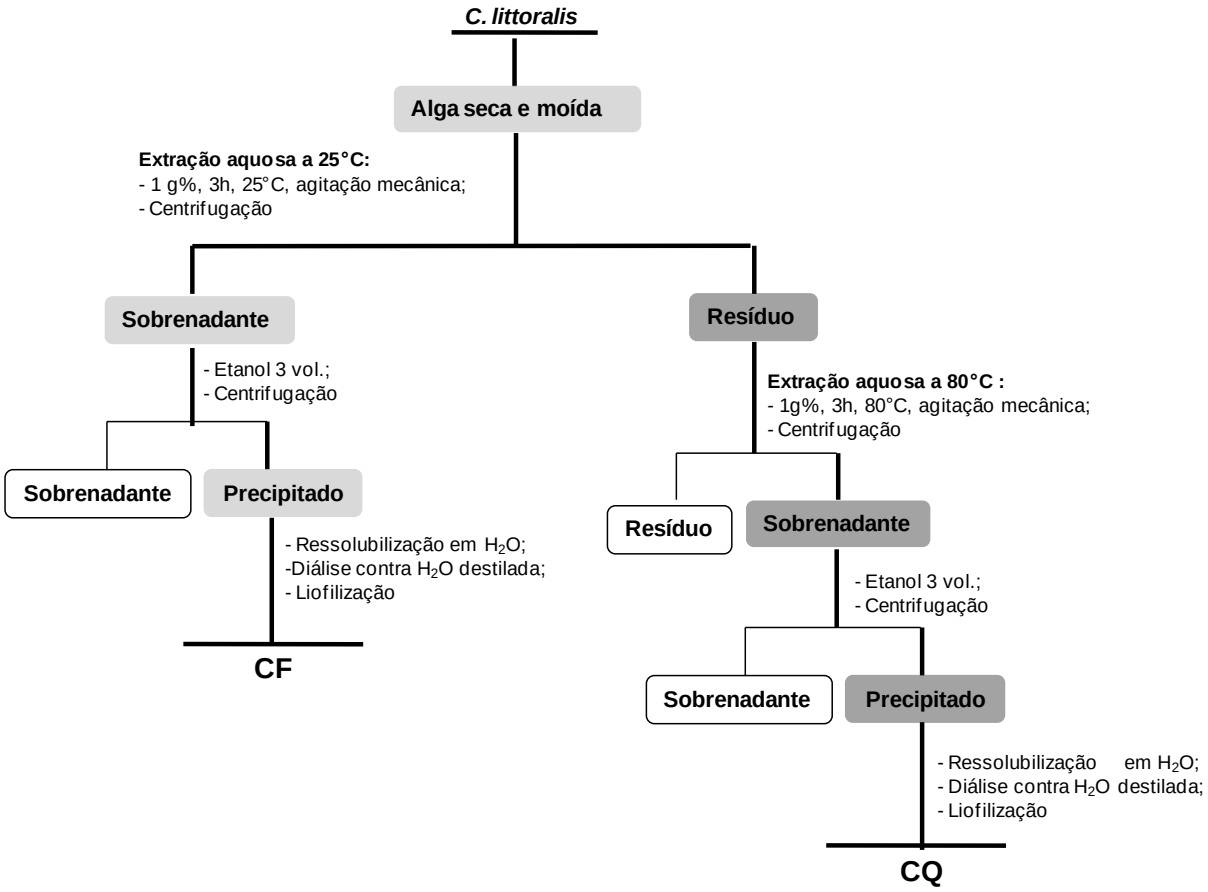


FIGURA 15 – EXTRAÇÃO AQUOSA A 25 °C e 80 °C DA ALGA *Chondria littoralis*

Os polissacarídeos obtidos das três extrações de *C. littoralis* a 25 °C foram reunidos e identificados como fração CF. Os polissacarídeos obtidos das três extrações a 80 °C foram reunidos e identificados como CQ. Estas duas frações foram posteriormente reunidas, gerando a fração CL.

5.4 MÉTODOS ANALÍTICOS GERAIS

5.4.1 Dosagem de açúcares totais

As dosagens de açúcares totais foram realizadas pelo método colorimétrico do fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS *et al*., 1956), o intervalo linear deste método é entre 10-85 µg de galactose. O comprimento de onda utilizado para as leituras em espectrofotômetro foi de 490 nm e para construção da curva padrão foi utilizada galactose1 mg/mL.

5.4.2 Dosagem de proteínas totais

As dosagens de proteínas totais foram realizadas pelo método colorimétrico de Lowry *et al.* (1951), com intervalo linear entre 5-100 µg de proteína. Para a construção de curva padrão foi utilizada a solução de soro-albumina bovina cristalina (BSA) na concentração de 1 mg/mL e as leituras foram realizadas no comprimento de onda de 660 nm.

5.4.3 Dosagem de sulfato

Os teores de sulfato foram determinados pelo método de Dodgson (1961), após hidrólise das amostras com ácido clorídrico (HCl) 1 M, 5 h a 105-110 ˚C. Foi utilizada solução de sulfato de sódio na concentração de 1mg/mL para construção de curva padrão, a linearidade do método é de 20-200 µg de sulfato. As leituras foram realizadas no comprimento de onda de 360 nm.

5.4.4 Determinação da rotação óptica específica

A determinação da rotação óptica específica ($[\alpha]_D$) foi realizada em polarímetro JASCO P-2000, a 25 ˚C, com bomba de sódio, cubeta de 100 mm (1dm). A leitura foi realizada no comprimento de onda de 589 nm com as amostras na concentração de 2 mg/mL (0,2% p/v) em água. Os valores de rotação óptica foram calculados pela fórmula:

$$[\alpha] = \alpha \, . \, 100 \, / \, L \, . \, C$$

α é a rotação observada em graus, obtida pelo equipamento
L é o comprimento do caminho óptico em dm
C é a concentração da solução em g/100mL

5.5 PRECIPITAÇÃO COM CLORETO DE POTÁSSIO (KCl 2 M)

Os polissacarídeos da fração GS, obtida após extração de *G. skottsbergii* a 25 °C e da fração CL, obtida após extração de *C. littoralis* a 25 °C e 80 °C, foram separadamente solubilizados em água (0,25% p/v) sob agitação mecânica, em seguida foi adicionado KCl sólido de modo a formar uma solução 2 M. Após agitação por 3 h e repouso de 16 h a 4 °C, foi realizada centrifugação (8.000 rpm, 20 min., 4 °C), originando um sobrenadante e um precipitado. A fração sobrenadante foi dialisada contra água destilada e liofilizada. A fração precipitada em KCl 2 M foi ressolubilizada em água, dialisada contra água destilada e liofilizada.

Os polissacarídeos precipitados com KCl foram identificados pela adição das letras “S” (solúvel em KCl) e “P” (precipitado em KCl) ao nome da fração de origem (MATULEWICZ *et al*., 1989).

5.6 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

5.6.1 Purificação dos polissacarídeos por cromatografia de troca iônica

Os polissacarídeos da fração CL, obtidos após extração de *C. littoralis* a 25 °C e 80 °C, foram fracionados por cromatografia de troca iônica em coluna contendo DEAE-Sephacel. A amostra foi eluída primeiramente com água destilada e então, com soluções de cloreto de sódio (NaCl), em concentrações crescentes de 0,25 a 2 M.

O material eluído da coluna foi monitorado pelo teste do fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS *et al*., 1956). As frações coletadas foram concentradas em rotaevaporador, dialisadas em água destilada e liofilizadas.

5.6.2 Cromatografia de Exclusão Estérica de Alta Performance Acoplada a Espalhamento de Luz Laser Multiângulos e Detector de Índice de Refração (HPSEC-MALLS-RID) – Análise de homogeneidade e massa molecular

Para as análises de homogeneidade e determinação de massa molecular média (M_w) foram preparadas soluções de 1 mg de amostra em 1 mL de nitrito de sódio ($NaNO_2$ 0,1 M) e azida de sódio (NaN_3, 200 ppm) dissolvidas em água MilliQ. As soluções foram filtradas em membrana Millipore (acetato de celulose) com diâmetro de poro de 0,22 µm para homogeneidade e 0,45 µm para determinar a massa molecular.

As análises 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) WAYTT TECHNOLOGY modelo DAWN DSP com 18 detectores dispostos ao redor da fotocélula em diferentes ângulos. Para uma melhor separação foram utilizadas 4 colunas de gel filtração WATERS, modelo Ultrahydrogel^{tm} 2000, 500, 250 e 100, com limites de exclusão de $7x10^6$, $4x10^5$,

$8x10^4$ e $5x10^3$Da, respectivamente, conectadas em série. A fase móvel utilizada foi uma solução de $NaNO_2$ 0,1 M contendo NaN_3 (200 ppm), a 20 °C.

Para a determinação da variação do índice de refração com relação à concentração (dn/dc), foram preparadas soluções de 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1,0 mg das amostras em 1,0 mL de $NaNO_2$ 0,1M e NaN_3 (200 ppm).

Foi utilizado o programa ASTRA (WAYTT TECHNOLOGY) para análise dos dados obtidos e para a determinação da massa molecular ponderal média (M_w) foi utilizado o valor de dn/dc obtido juntamente à análise de homogeneidade.

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

As análises cromatográficas em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa foram realizadas em um cromatógrafoa gás da marca VARIAN 3800, acoplado a um espectrômetro de massa também da marca VARIAN, modelo Saturn 2000R (tipo *ion trap*). O CG é equipado com coluna capilar (30 m x 0.25 mm i.d.) modelo DB-225, marca J.W. O gás carreador utilizado foi o hélio, com fluxo de 1 mL/min.

As áreas dos picos de interesse foram determinadas por integração no software Varian MS Workstation Toolbar. Os espectros de massa foram obtidos por impacto de elétrons a 70 eV, repetidamente a cada 1/8 de segundo, abrangendo fragmentos com relação massa/carga (*m/z*) variando de 40 a 300. Este método foi utilizado para quantificação de acetatos de alditóis (SLONEKER, 1972), sendo identificados por meio de seus tempos de retenção e perfis característicos de fragmentação por impacto de elétrons comparados com padrões descritos na literatura (JANSSON *et al*., 1976; CARPITA; SHEA, 1989; SASSAKI *et al*., 2005).

5.7 HIDRÓLISE REDUTIVA TOTAL

Os polissacarídeos foram hidrolisados de acordo com o método de Stevenson e Furneaux (1991) e de Jol *et al*. (1999).

O processo hidrolítico foi realizado em duas etapas:

1) Hidrólise suave: onde 1,0 mg do polissacarídeo foi solubilizado em 50 µL de água destilada e, logo em seguida, adicionado 100 µL de uma solução 80 mg/mL do agente redutor complexo borano 4-metil-morfolina (MMB), que possui estabilidade em meio reacional ácido. Em seguida, 100 µL de ácido trifluoracético (TFA) 6 M foi adicionado, atingindo a concentração final de 2,4 M, esta solução foi aquecida a 80 °C por 30 min. para ocorrer a hidrólise. Após atingir a temperatura ambiente, 100 µL da solução de MMB (80 mg/mL) foi adicionada e as amostras foram evaporadas, a 50 °C, até atingir a consistência de xarope. Essa primeira etapa tem a finalidade de hidrolisar e reduzir os pontos da cadeia polissacarídica que apresentam unidades de 3,6-anidro-α-galactopiranose, protegendo-as da degradação em meio ácido.

2) Hidrólise forte: ao produto final da hidrólise suave foi adicionado 100 µL da solução de MMB (80 mg/mL) e 100 µL de TFA 4 M, atingindo a concentração final de 2 M; esta solução foi aquecida a 120 °C por 60 min., para ocorrer a hidrólise. Em seguida foi adicionado 100 µL da solução de MMB (80 mg/mL). A amostra então, foi evaporada a 50 °C e o produto final congelado e liofilizado. Nesta segunda hidrólise, ocorre a quebra das ligações glicosídicas envolvendo as demais unidades constituintes do polissacarídeo, as quais por sua vez foram também reduzidas.

Os monossacarídeos reduzidos foram acetilados (anidrido acético/TFA concentrado na proporção de 2:1 a 65 °C por 15 min.). As amostras na forma de acetatos de alditóis foram extraídas em clorofórmio, lavadas com bicarbonato de sódio e água, para que ocorra a retirada dos ácidos e sais formados. Após evaporar o clorofórmio das amostras, estas foram analisadas por CG-EM.

5.8 DESSULFATAÇÃO POR TRATAMENTO SOLVOLÍTICO

5.8.1 Preparo do sal de piridônio

O processo de dessulfatação solvolítica foi conduzido com os polissacarídeos na forma de sal de piridônio, deste modo são solúveis em DMSO.

Para formação deste sal as amostras foram solubilizadas em água e adicionada resina catiônica DOWEX 50x8 na forma H^+, sob agitação magnética à temperatura ambiente por 45 min., com pH entre 1-2. O material foi filtrado e neutralizado com piridina até pH 7 e liofilizado (STEVENSON; FURNEAUX, 1991).

5.8.2 Solvólise

Os polissacarídeos, na forma de sal de piridônio, foram solubilizados em uma mistura de 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 da mistura (NAGASAWA; INOUE; TOKUYASU, 1979).

A solução resultante foi mantida a 100 °C durante 4 h para os polissacarídeos de *Chondria littoralis*.

Os polissacarídeos de *Gigartina skottsbergii* foram submetidos a dessulfatação durante 5, 7,5 e 9 horas. Após 5 horas obteve-se um rendimento de 69,0 %, com 7,5 horas, 63,5 % de rendimento e com 9 horas um rendimento de 71,9%, deste modo a dessulfatação da solução de polissacarídeos solúveis em DMSO, metanol e piridina foi realizada a 100 °C durante 9 h, para obter um maior rendimento.

Após o resfriamento, as frações solvolisadas foram submetidas à diálise exaustiva contra água destilada e liofilizadas. Os polissacarídeos submetidos à dessulfatação solvolítica foram identificados pela adição da letra “D” (dessulfatados) ao nome da fração de origem.

5.9 TRATAMENTO ALCALINO

O tratamento solvolítico é capaz de remover os grupos sulfato de maneira inespecífica, sendo que no tratamento alcalino ocorre uma dessulfatação seletiva dos grupos sulfato em C-6, da unidade B (NOSEDA; CEREZO, 1995), obtendo uma fração quimicamente modificada.

Os polissacarídeos da fração GS (polissacarídeos extraídos de *G. skottsbergii*) foram dissolvidos em água destilada (0,2 g%) e, em banho de gelo, adicionou-se boroidreto de sódio ($NaBH_4$–10% em relação ao peso do polissacarídeo) como agente redutor. A solução foi mantida por 20 h a 4 °C. A adição de $NaBH_4$ evita que o polissacarídeo sofra degradação a partir dos terminais redutores (“peelling”). Hidróxido de sódio (NaOH) 3 M foi adicionado de modo que a concentração final da solução fosse de NaOH 1 M, e mais 5% em peso do polissacarídeo de $NaBH_4$ foi adicionado (MATULEWICZ *et al*., 1989).

A solução foi mantida a 80 °C por 60 min., mas nos espectros de RMN de ^1H foi observada degradação, desta forma a condição utilizada para dar continuidade ao tratamento alcalino foi manter a solução a 60 °C em banho termostatizado, por 60 min. A solução foi resfriada em banho de gelo a fim de interromper a reação, neutralizada com HCl até pH 7, dialisada e liofilizada (MATULEWICZ *et al*., 1989).

Para determinar a porcentagem de unidades 3,6-anidrogalactose formadas, foi utilizada a integração das áreas da região α-anomérica dos espectros de Ressonância Magnética Nuclear de próton (^1H), em relação ao total de unidades B da galactana.

A fração polissacarídica resultante do tratamento alcalino foi identificada pela adição das letras “TA” (tratamento alcalino) ao nome da fração de origem.

5.10 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)

As análises de ressonância magnética nuclear mono e bidimensionais foram realizadas em espectrômetro da marca BRUKER, modelo DRX 400 e 600 MHz, série Avance, em tubos de 5 mm de diâmetro, a temperatura de 70 °C e as amostras sendo dissolvidas em água deuterada pura (D_2O). Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em ppm, utilizando como padrão interno acetona (δ = 30,2 ppm para ^{13}C e 2,224 ppm para ^1H).

5.10.1 Técnicas de RMN Monodimensionais

Para realização das técnicas de RMN monodimensionais as amostras foram dissolvidas em D_2O, em uma concentração de ~30 mg/mL para ^{13}C e DEPT e ~15 mg/mL para ^{1}H. As técnicas realizadas foram:

- Ressonância Magnética Nuclear de Carbono–13 (RMN de ^{13}C);

- Ressonância Magnética Nuclear de Carbono–13 DEPT 135 (*Distortionless Enhancement by Polarization*);

- Ressonância Magnética Nuclear de Próton (RMN – ^{1}H).

5.11 CAPACIDADE DE LIGAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS À ENTEROBACTÉRIAS

5.11.1 Ensaios de capacidade de ligação

Os ensaios de capacidade de ligação foram realizados segundo as metodologias propostas por Becker *et al.* (2007) e Ganner *et al.* (2010). Estas metodologias determinam *in vitro* a capacidade de ligação dos polissacarídeos à bactérias enteropatogênicas através da relação densidade óptica (OD) x unidades formadoras de colônias (UFC)/mL.

A cepa utilizada foi cultivada sucessivamente em placas contendo meio BHI (*Brain Heart Infusion*) em condições aeróbicas para enriquecer seletivamente as fimbrias do tipo I como descrito por Old e Duguid (1970) e Snellings, Tall e Venkatesan (1997).

5.11.2 Bactérias

Os testes foram realizados com a enterobactéria *Salmonella enterica* sv. Typhimurium ATCC 14028, cedida pelo Centro de Diagnóstico Marcos Enrietti (Departamento de Fiscalização e de Defesa Agropecuária da Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento do Paraná). A cepa foi cultivada em meio BHI, sob condições aeróbicas a 37 °C.

5.11.3 Avaliação dos polissacarídeos sulfatados

As amostras testadas foram diluídas em tampão PBS (tampão fosfato salino: fosfato de sódio 10 mmol/L, NaCl 0,15 mol/L, pH 7,0) numa concentração de 1%, agitadas em vórtex, homogeneizadas em banho de ultrassom em três repetições de 30 segundos cada e novamente agitadas em vórtex. Em seguida 300 µL desta suspensão foram transferidos em triplicata aos poços da placa de poliestireno de alta aderência (*Corning Incorporated* – Costar® 3590, 96 poços). Após incubação *overnight* a 4 °C, a placa foi lavada 3 vezes com 300 µl de PBS/poço, para remoção do excesso de polissacarídeos (polissacarídeos não ligados).

O bloqueio dos espaços não ocupados pela amostra e a prevenção de ligações inespecíficas se deu com a adição de 300 µL de BSA 1%, incubado durante 1 h a 4 °C, seguida de lavagem com 300 µL de PBS por três vezes, para remoção do excesso de BSA. Após crescimento da bactéria e devida diluição (obtenção de uma solução com densidade óptica (OD) de 0,01 para verificação do tempo de detecção secundário) foram adicionados aos poços 300 µL da suspensão bacteriana, a qual foi incubada a 37 °C durante 1 h, para permitir sua ligação à amostra testada. Após seis lavagens com 300 µL de PBS, para retirar as bactérias que não se ligaram aos polissacarídeos aderidos à placa, foi adicionado 200 µL de TSB (*Tryptone Soy Broth*) para que ocorra o crescimento bacteriano, e uma gota de óleo de parafina, para que não haja evaporação do meio durante as leituras das densidades ópticas.

A placa foi então incubada em leitor de microplacas SpectraMax Plus 384 a 37 °C, com leituras a cada 15 min., em 690 nm, durante 16 h. O esquema geral do ensaio realizado para o teste de ligação está apresentado na FIGURA 16.

O controle negativo de ligação consistiu em poços apenas bloqueados com BSA adicionados da bactéria e do meio de cultivo, sem as amostras a serem testadas a fim de determinar os sítios de ligações inespecíficas. O controle de crescimento consistiu em poços bloqueados com BSA contendo uma suspensão bacteriana de OD 0,01 em meio TSB, de modo que se possa acompanhar eventuais alterações durante o crescimento das bactérias. Foram utilizados também branco das amostras, estes consistiram de poços bloqueados com BSA contendo a amostra a ser testada sem adição da bactéria. Poços contendo apenas meio, foram utilizados a fim de detectar possíveis contaminações. Por fim, como controle comercial, foi utilizado o produto comercial BioMos® da *Alltech*, o qual já tem a sua ação anti-adesão bacteriana comprovada.

Todos os dados gerados pelo programa do equipamento (SoftMax Pro 6.3) foram convertidos para arquivos de texto e importados para Excel.

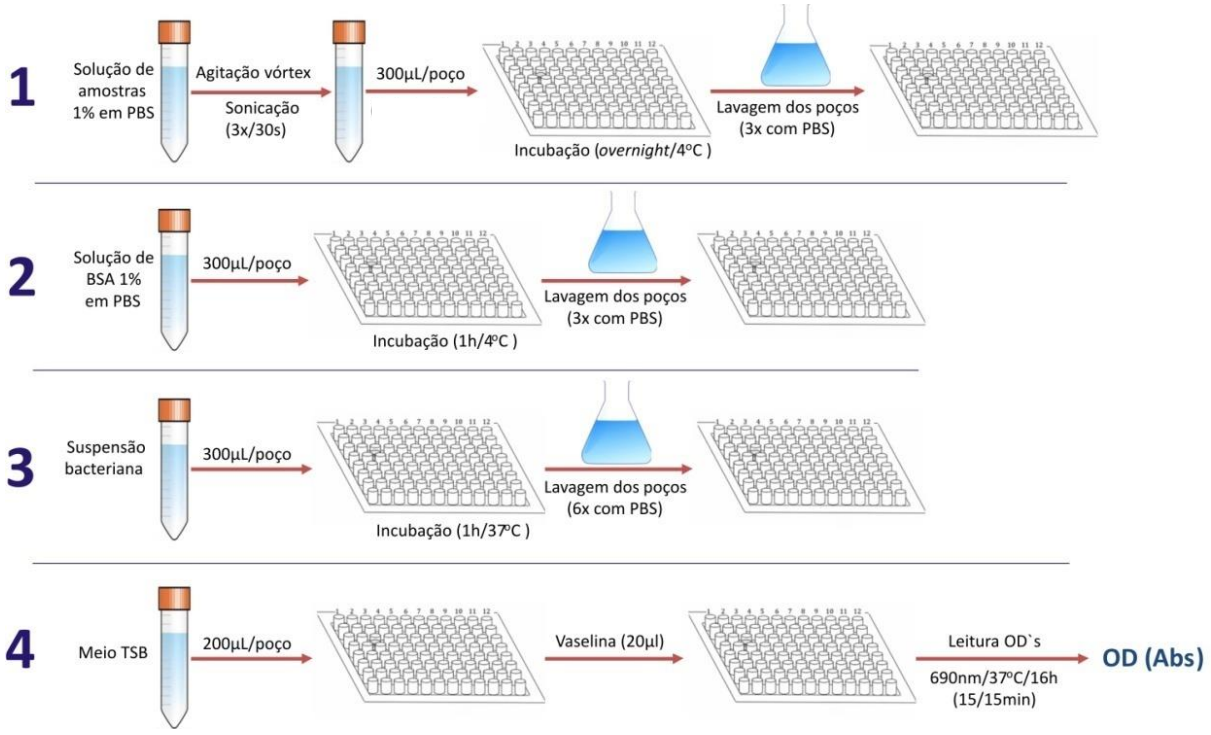


FIGURA 16 - ESQUEMA GERAL PARA OS ENSAIOS DE CAPACIDADE DE LIGAÇÃO. 1) PREPARAÇÃO DA AMOSTRA DE INTERESSE E INCUBAÇÃO; 2) INCUBAÇÃO DO BSA PARA BLOQUEIO DOS ESPAÇOS NÃO OCUPADOS PELAS AMOSTRAS E PREVENÇÃO DE LIGAÇÕES INESPECÍFICAS; 3) INCUBAÇÃO DA ENTEROBACTÉRIA EM OD 0,01; 4) ADIÇÃO DO MEIO E LEITURA DAS DENSIDADES ÓPTICAS NO LEITOR DE MICROPLACAS.
FONTE: Modificado de Rodrigues (2012).

5.11.4 Parâmetros de crescimento e análise estatística

Os resultados de densidade óptica coletados para cada uma das amostras foram tratados utilizando-se a metodologia proposta por Becker *et al.* (2007). Segundo mostra a autora, os dados coletados podem ser ajustados utilizando-se uma cinética de modelo sigmoidal como a mostrada na equação (1):

$$f_{OD}(t) = \frac{A}{1+\frac{B^C}{t^C}} \quad (1)$$

Nessa equação, $f_{OD}(t)$ denota a densidade óptica do meio contido em cada poço da placa no tempo t após a incubação da mesma. O parâmetro A representa o valor da assíntota da densidade óptica no estado estacionário, B representa o tempo de incubação após o qual metade do rendimento máximo em biomassa foi obtido e C é uma constante que determina a curva.

A primeira derivada, $f'_{OD}(t)$ é:

$$f'_{OD}(t) = \frac{AB^C C}{t^{C+1}\left(1+\frac{B^C}{t^C}\right)^2} \quad (2)$$

Além disso, pela segunda derivada da equação (1), pode-se determinar t_{pi} que é o tempo correspondente ao ponto de inflexão da curva:

$$t_{pi} = B\left(\frac{C-1}{C+1}\right)^{1/C} \quad (3)$$

Assim também, a determinação da fase lag aparente ou o tempo de detecção, t_{det} (4), pode ser determinado pelas equações (1), (2) e (3):

$$t_{det} = t_{pi} - \frac{f_{OD}(t_{pi})}{f'_{OD}(t_{pi})} \quad (4)$$

Além disso, o tempo $t_{OD\,=\,0,1}$ foi determinado como um segundo tempo de detecção, representando assim o tempo no qual a OD_{690} de 0,1 foi obtida:

$$t_{OD=0,1} = \left(\frac{B^C(-0,1)}{0,1-A}\right)^{1/C} \quad (5)$$

Os dados foram avaliados estatisticamente utilizando-se o programa R, aplicando-se análise de variância ANOVA e teste de Tukey, para comparação das médias. Os resultados foram expressos como média + desvio padrão de no mínimo três experimentos em triplicata. Foram considerados estatisticamente significativos os valores comparados ao nível de significância de $p< 0,05$.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 POLISSACARÍDEOS DA ALGA *Gigartina skottsbergii*

6.1.1 Extração das galactanas sulfatadas de *Gigartina skottsbergii*

Os exemplares de *G. skottsbergii* secos e moídos (24 g) foram submetidos a 3 extrações aquosas sequenciais, sob agitação mecânica, a 25 °C por 3 horas. Aos sobrenadantes foi adicionado etanol absoluto (3 volumes), para precipitação dos polissacarídeos. O precipitado etanólico foi ressolubilizado em água, dialisado contra água destilada e liofilizado. Os polissacarídeos precipitados das três extrações foram reunidos gerando a fração GS (15 g de polissacarídeo) (Figura 17).

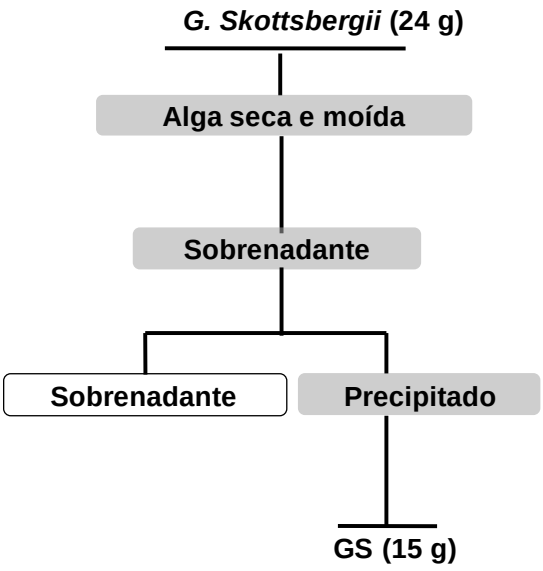


FIGURA 17 – ESQUEMA DE EXTRAÇÃO AQUOSA A 25 °C DA ALGA *Gigartina skottsbergii*

A fração GS apresentou 62,5 % de rendimento em relação ao peso da alga seca e moída utilizada para extração, semelhante ao obtido por Matulewicz *et al.*, (1989).

6.1.2 Análises químicas dos polissacarídeos da fração GS

As análises químicas da fração GS (Tabela 5) mostraram um teor de carboidrato de 56,5 %, sulfato 35,9 % e proteína 1,5 %. Os teores de sulfato são condizentes aos descritos por Carlucci *et al*., (1997).

TABELA 5 – RENDIMENTO E ANÁLISES QUÍMICAS DA FRAÇÃO GS

Fração	Rendimento (%)[a]	Carboidrato (%)[b]	Sulfato (%)[c]	Proteína (%)[d]
GS	62,5	56,5	35,9	1,5

[a] = Rendimento em relação ao peso seco do extrato polissacarídico de *G. skottsbergii*; Determinações de acordo com os métodos de: [b] = Dubois *et al*., 1956; [c] = Dodgson, 1961; [d] = Lowry *et al*., 1951.

A composição monossacarídica da fração GS foi realizada por dois métodos: hidrólise redutiva total (STEVENSON; FURNEAUX, 1991; JOL *et al*., 1999) e por integração dos sinais da região α-anomérica do espectro de RMN de ^{1}H, correspondente aos H-1 das unidades B.

Este último método é realizado pelo valor da integração dos sinais presentes na região α-anomérica. Por uma regra de três é possível quantificar a porcentagem de galactose e 3,6-anidrogalactose presente no polissacarídeo. A soma da integração de todos os sinais presentes na região α-anomérica é nosso 100% e a soma da integração dos sinais correspondentes às unidades B compostas por 3,6-anidrogalactose corresponde à porcentagem que é desconhecida. O resultado deve ser dividido por dois, pois a unidade B representa 50% da díade, sendo assim é necessária esta divisão, deste modo é encontrado o valor correspondente às unidades compostas por 3,6-anidrogalactose no polissacarídeo, o restante da porcentagem total corresponde a galactose.

Os monossacarídeos constituintes da fração GS são galactose e 3,6-anidrogalactose. Através da composição monossacarídica por hidrólise redutiva total foi observado 70,4 mol% de galactose e 29,6 mol% de 3,6-anidrogalactose. Pelo método de integração através do RMN de ^{1}H foi observado 61,3% de galactose e 38,7% de 3,6-anidrogalactose (Tabela 6).

TABELA 6 – COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DA FRAÇÃO GS POR HIDRÓLISE REDUTIVA TOTAL (MOL%) E POR INTEGRAÇÃO DA REGIÃO α-ANOMÉRICA DO RMN DE ^{1}H

Monossacarídeo	(mol%)[a]	^{1}H RMN (%)[b]
Gal	70,4	61,3
AG	29,6	38,7

[a] Determinada de acordo com Stevenson; Furneaux (1991) e Jol *et al*., (1999);[b] Determinada a partir da integração das áreas dos sinais da região α-anomérica do espectro de RMN de ^{1}H; Gal = Galactose, AG = 3,6-anidrogalactose.

As unidades monossacarídicas de 3,6-anidrogalactose são degradadas nas condições da hidrólise ácida em meio aquoso. Para evitar a perda destas unidades uma estratégia foi encontrada com a adição do complexo redutor borano 4-metil-morfolina (MMB). Este agente redutor é resistente à degradação em meio ácido, durante o processo de hidrólise. Deste modo os monossacarídeos liberados sob condição ácida são rapidamente reduzidos para alditóis (GAREGG *et al*., 1988).

Desta forma, os protocolos de hidrólise redutiva total foram estabelecidos na presença de MMB (Item 5.7). A hidrólise redutiva total consiste em duas etapas: hidrólise suave, para clivar apenas as ligações 3,6-anidrogalactosídicas, tendo então suas extremidades reduzidas por MMB (as demais unidades liberadas por esta hidrólise também têm suas extremidades reduzidas); hidrólise forte ocorre apenas após nova adição do agente redutor, neste passo todas as ligações glicosídicas são clivadas em meio ácido para posterior análise em CG-EM (STEVENSON; FURNEAUX, 1991). Neste método as unidades 3,6-anidrogalactose não são totalmente recuperadas.

O método de quantificação através de RMN de ^{1}H, pela integração das áreas dos picos de interesse na região α-anomérica, se mostrou adequado e não destrutivo. As unidades 3,6-anidrogalactose quantificadas pelo método de ^{1}H mostraram 9,1% de unidades a mais do que o método de hidrólise redutiva total (38,7% ^{1}H e 29,6 mol% na hidrólise redutiva total). Deste modo, o método de quantificação através do RMN de ^{1}H será utilizado para todas as frações.

6.1.3 Espectroscopia de RMN da fração GS

Nas análises de espectroscopia de RMN de ^{13}C, observa-se a região anomérica (90-110 ppm), que corresponde aos sinais referentes aos C-1 das unidades monossacarídicas.

A região anomérica do espectro de RMN de ^{13}C da fração GS (Figura 18) é composta pelos sinais atribuídos ao C-1 das unidades A em 104,3 ppm de *Nu*-carragenana (β-D-galactopiranose 4-sulfatada) e em 102,0 ppm de *Kappa*-carragenana e *Iota*-carragenana (β-D-galactopiranose 4-sulfatada). Os sinais em 97,7, 94,8 e 91,6 ppm correspondem ao C-1 das unidades B de *Nu*-carragenana (α-D-galactopiranose 2,6-dissulfatada), *Kappa*-carragenana (3,6-anidro-α-D-galactose) e *Iota*-carragenana (3,6-anidro-α-D-galactose 2-sulfatada), respectivamente (CIANCIA *et al*., 1993a).

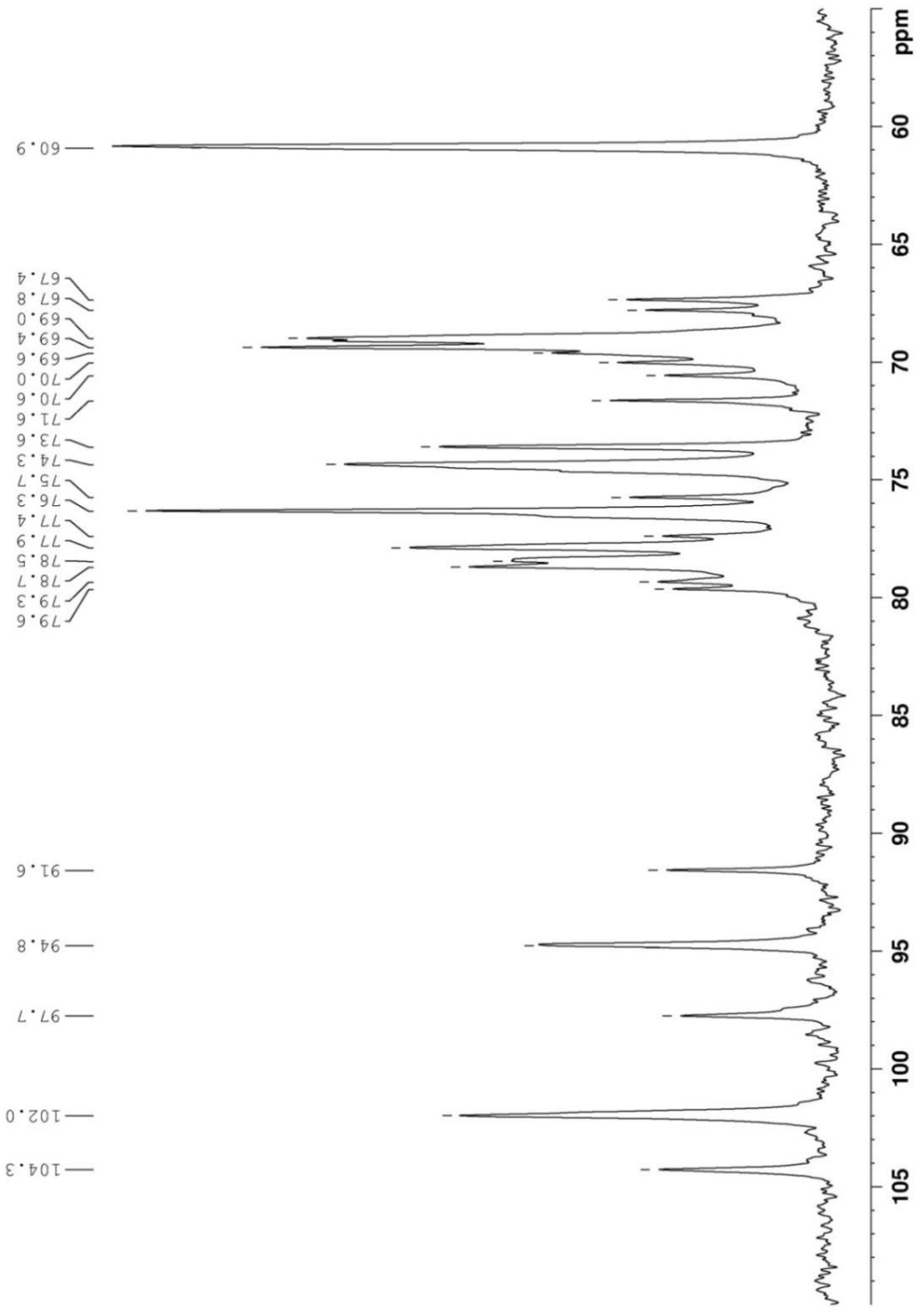


FIGURA 18 – ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DA FRAÇÃO GS
Solvente: D_2O (70 °C); Padrão interno: acetona (30,2 ppm)

No espectro de RMN de DEPT (Figura 19) foi possível identificar os C-6 presentes no polissacarídeo, pois há inversão dos sinais dos carbonos do tipo CH_2. Deste modo, foi possível localizar o C-6 da unidade β-D-galactopiranose 4-sulfatada (G4S) de *Kappa, Iota e Nu*-carragenana (60,8 ppm), C-6 da unidade α-D-galactopiranose 2,6-dissulfatada (D2S,6S) de *Nu*-carragenana (67,8 ppm), C-6 da unidade 3,6-anidro-α-D-galactose (DA) de *Kappa*-carragenana (68,9 ppm) e C-6 da unidade 3,6-anidro-α-D-galactose 2-sulfatada (DA2S) de *Iota*-carragenana (69,3 ppm) (CIANCIA *et al*., 1993a).

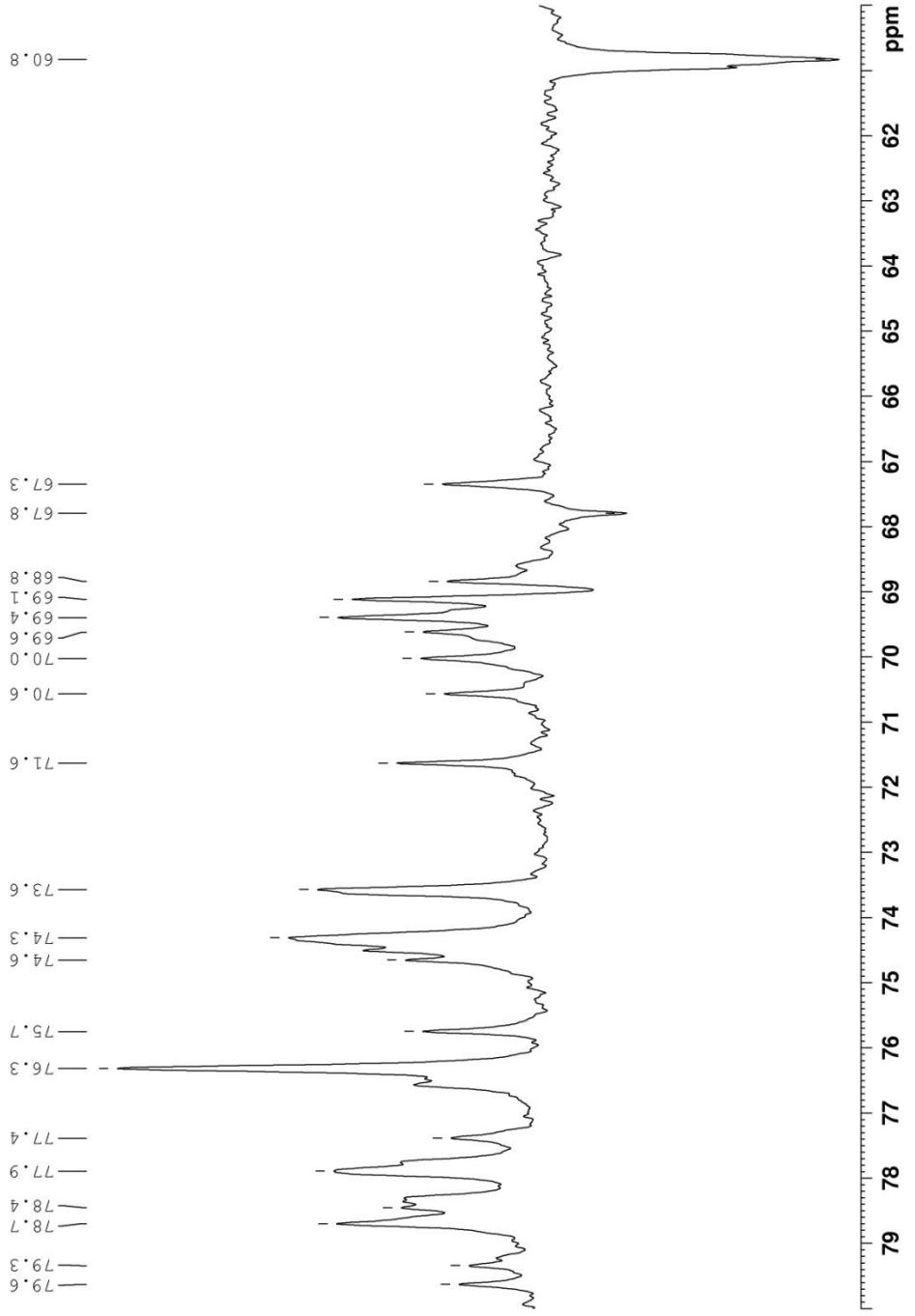
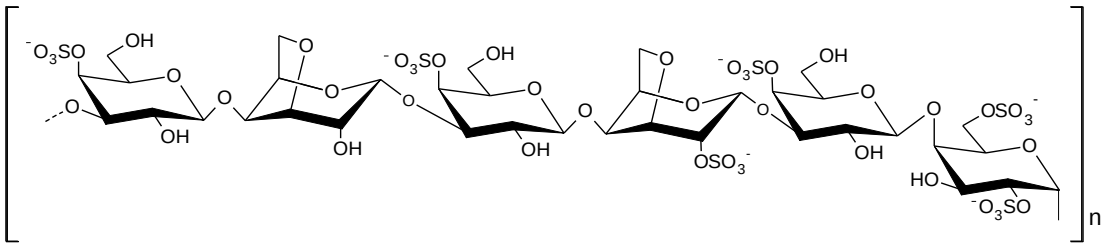


FIGURA 19 – ESPECTRO DE RMN DE DEPT DA FRAÇÃO GS
Solvente: D_2O (70 °C); Padrão interno: acetona (30,2 ppm)

A figura 20 representa o polissacarídeo híbrido hipotético composto pelas díades de *Kappa/Iota/Nu*-carragenanas, presentes na fração GS.



Kappa-caragenana (κ) (G4S→DA)

Iota-carragenana (ι) (G4S→DA2S)

Nu-carragenana (ν) (G4S→D2S,6S)

FIGURA 20 - POLISSACARÍDEO HÍBRIDO HIPOTÉTICO COMPOSTO PELAS DÍADES DE *KAPPA/IOTA/NU*-CARRAGENANAS, PRESENTES NA FRAÇÃO GS.
FONTE: O autor (2014).

A espectroscopia de RMN de ^{1}H mostra na região α-anomérica os sinais referentes ao H-1 das unidades B das galactanas sulfatadas.

Na região anomérica do espectro de RMN de ^{1}H da fração GS (Figura 21) observam-se os sinais referentes ao H-1 das unidades B de *Nu*-carragenana (5,51 ppm), *Iota*-carragenana (5,31 ppm) e *Kappa*-carragenana (5,10 ppm) (CIANCIA *et al*., 1993a). Em 5,25 ppm é observado o sinal referente ao H-1 das unidades B de *Mu*-carragenanas (α-D-galactose 6 sulfato) (CIANCIA *et al*., 1993a). Os sinais correspondentes às unidades de *Mu*-carragenana não foram observados no espectro de RMN de ^{13}C desta fração, devida pequena quantidade dessas díades, mas tendo o espectro de RMN de ^{1}H maior sensibilidade, foi possível observar os sinais referentes à presença destas díades.

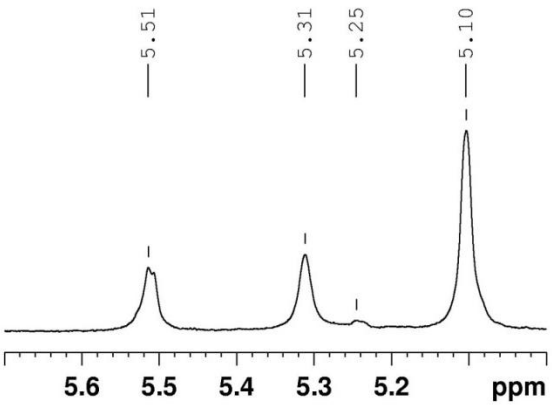


FIGURA 21 – ESPECTRO DE RMN DE ^{1}H DA FRAÇÃO GS
Solvente: D_2O (70 °C); Padrão interno: acetona (2,224 ppm)

Através da integração das áreas dos picos presentes na região α-anomérica do espectro de RMN de ^{1}H foi possível quantificar as díades presentes na fração GS.

A fração GS possui 77,4% de díades em que as unidades B são constituídas por α-D-3,6-anidrogalactose ou α-D-3,6-anidrogalactose 2-sulfato (AG) e 22,6% de díades nas quais as unidades B são constituídas por D-galactose (Gal), com uma relação de 1:0,3 (AG:Gal).

Através da quantificação das áreas dos picos correspondentes aos sinais em 5,10, 5,25, 5,31 e 5,51 ppm, pôde-se verificar que a fração GS é composta 55,5% de *Kappa*, 21,9% de *Iota*, 19,7% de *Nu* e 2,9% de *Mu*-carragenanas.

6.1.4 Análise por HPSEC-MALLS-RID da fração GS

A fração GS foi submetida à análise de homogeneidade em cromatografia de exclusão estérica de alta performance, acoplada a detectores de espalhamento de luz laser multiângulos e detector de índice de refração (HPSEC-MALLS-RID) (Figura 22).

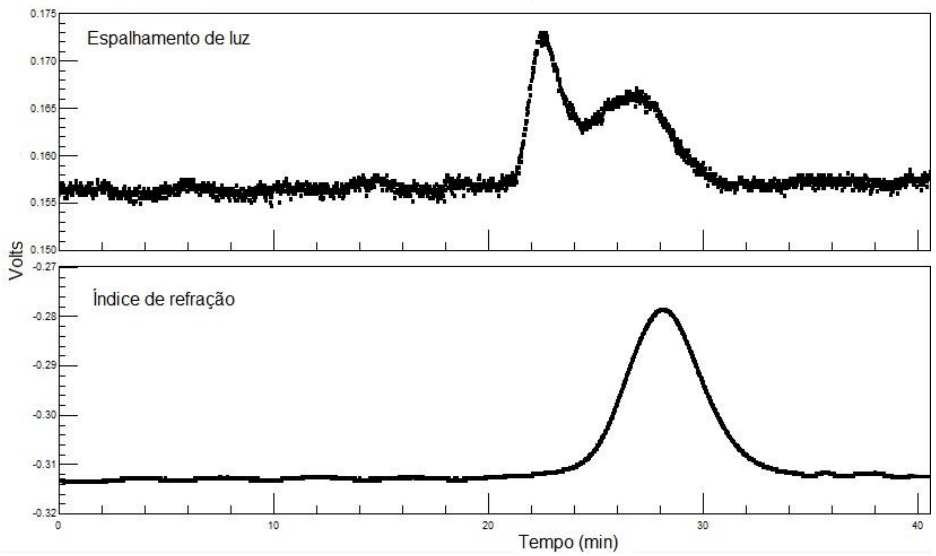


FIGURA 22 - CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO ESTÉRICA DE ALTA PERFORMANCE (HPSEC-MALLS-RID) DA FRAÇÃO GS

Pode-se observar na figura 22 que a fração GS apresenta simetria no pico cromatográfico formado pelo detector RI (índice de refração) e o cromatograma gerado por este detector, de acordo com o tempo de eluição, condiz com moléculas de alta massa molecular. O detector de espalhamento de luz (MALLS) não apresenta simetria no pico cromatográfico.

6.2 MODIFICAÇÕES QUÍMICAS DA FRAÇÃO GS

As características estruturais regulares das carragenanas são fatores que favorecem a realização de modificações químicas, as quais podem fornecer informações estruturais importantes sobre as atividades biológicas desempenhadas por esses biopolímeros (ARAÚJO *et al*., 2013).

Neste contexto a fração GS foi submetida a diferentes tratamentos químicos, com o objetivo de avaliar a capacidade de ligação à enterobactéria *S. typhimurium* exercida por estas galactanas na forma nativa e quimicamente modificadas.

As carragenanas sulfatadas nativas foram denominadas fração GS (fração I, composta por G4S→DA/G4S→DA2S/G4S→D2S,6S/G4S→D6S. Esta fração foi utilizada para a realização dos seguintes tratamentos químicos:

- Dessulfatação: originando a fração II (GS-D, composta principalmente por G→DA+G→D);

- Tratamento alcalino: o qual promove a ciclização de unidades precursoras (α-D-galactose 6 sulfato), originando a fração III (GS-TA, composta majoritariamente por G4S→DA/G4S→DA2S). Ao dessulfatar os polissacarídeos da fração GS-TA, foi originada a fração IV (GS-TA-D, composta majoritariamente por G→DA);

- Tratamento com KCl: na presença de KCl, as carragenanas enriquecidas com 3,6-anidrogalactose (*Kappa/Iota*) são precipitadas por formarem gel, enquanto as carragenanas enriquecidas com α-D-galactose (*Mu/Nu*) ficam no sobrenadante. Deste modo, após o tratamento com KCl 2 M foi obtida a fração precipitada GS-P (fração V, enriquecida com G4S→DA/G4S→DA2S) e a fração sobrenadante GS-S (fração VI, enriquecida com G4S→D2,6S). As frações GS-P e GS-S foram dessulfatadas originando as frações GS-P-D (VII, enriquecida com G→DA) e GS-S-D (VIII, enriquecida com G→D), respectivamente (Figura 23).

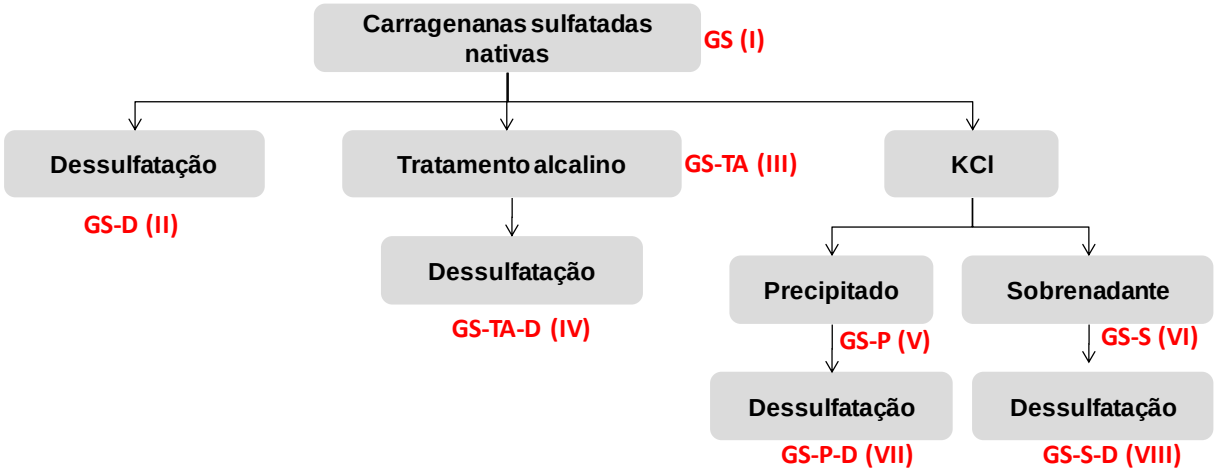


FIGURA 23 – ESQUEMA DE TRATAMENTOS QUÍMICOS REALIZADOS NAS CARRAGENANAS DE *G. skottsbergii*

6.2.1 Dessulfatação da fração GS

A fração GS (I), composta por *Kappa/Iota/Nu/Mu*-carragenanas foi submetida ao processo de dessulfatação solvolítica, pelo método de Nagasawa, Inoue, Tokuyasu (1979), para remoção de grupos sulfato, dando origem à fração GS-D (II) (Figura 24).

A fração GS-D mostrou-se enriquecida com díades de *Beta*-carragenana (β-D-galactose ligadas a 3,6-anidro-α-D-galactose, G→DA) e díades β-D-galactose ligadas a α-D-galactose (G→D).

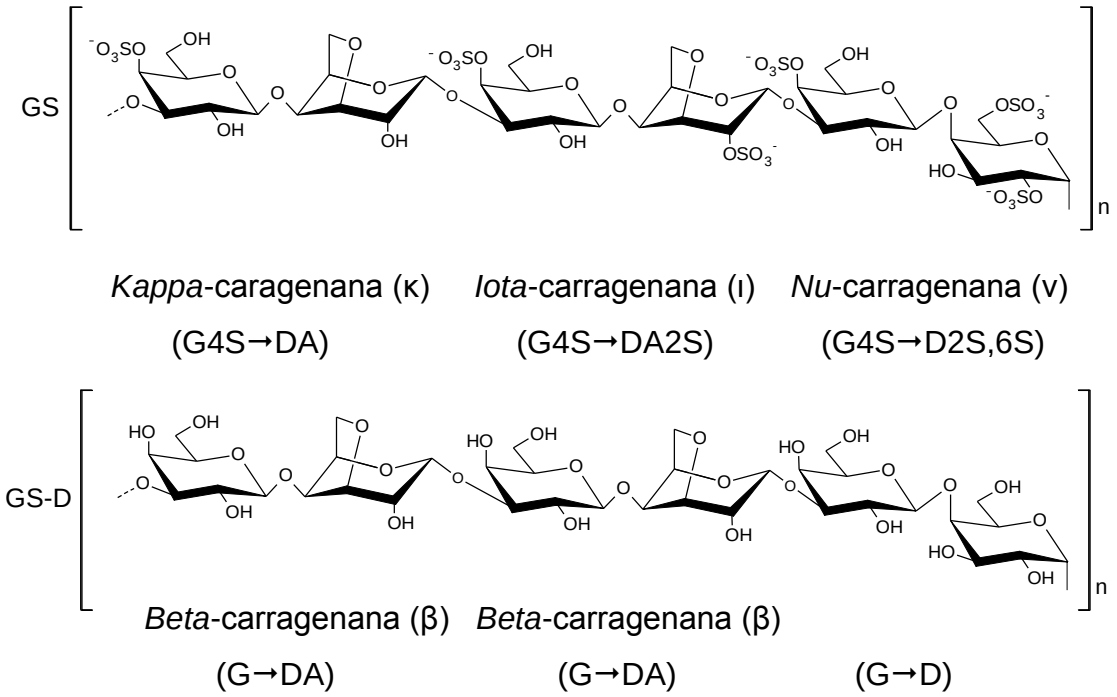


FIGURA 24 – A FRAÇÃO GS FOI SUBMETIDA AO PROCESSO DE DESSULFATAÇÃO PARA REMOÇÃO DOS GRUPOS SULFATO, GERANDO A FRAÇÃO GS-D
NOTA: A díade de *Mu*-carragenana não está representada pela baixa porcentagem em que se apresenta

6.2.1.1 Análises químicas da fração GS-D

Após dessulfatação dos polissacarídeos nativos, o rendimento da fração GS-D foi de 77,0% em relação a GS. Após a dosagem de grupos sulfato, pôde-se verificar que houve 64,3 % de dessulfatação, visto que as carragenanas nativas da fração GS apresentaram 35,9% de grupos sulfato em sua constituição, enquanto a fração dessulfatada GS-D apresentou 12,8% de sulfatação (Tabela 7).

TABELA 7 – RENDIMENTO E PORCENTAGEM DE DESSULFATAÇÃO DA FRAÇÃO GS-D

Fração	Rendimento(%)[a]	Sulfato (%)[b]	Dessulfatação (%)[c]
GS	-	35,9	-
GS-D	77,0	12,8	64,3

[a] Rendimento em relação ao total de polissacarídeos recuperados após dessulfatação dos polissacarídeos nativos; [b] Determinação de acordo com o método de Dodgson, 1961; [c] Dessulfatação em relação ao polissacarídeo nativo.

6.2.1.2 Espectroscopia de RMN da fração GS-D

A análise da região anomérica dos espectros de RMN de ^{13}C das frações GS e GS-D (Figura 25) mostrou a presença de sinais correspondentes às díades de *Kappa*-carragenana (102,0 e 94,8 ppm em GS), sendo que para a fração dessulfatada (GS-D) foi observada uma diminuição da intensidade destes sinais (102,2 e 94,8 ppm em GS-D) (CIANCIA *et al*., 1993a). A presença de sinais de *Kappa*-carragenana em GS-D mostra que o processo de dessulfatação nestas díades ocorreu parcialmente. Os sinais em 102,0 e 91,6 ppm (CIANCIA *et al*., 1993a), presentes no espectro de RMN de C-13 da fração GS, são correspondentes a *Iota*-carragenana. Após dessulfatação houve o desaparecimento destes sinais, concomitante com o aparecimento dos sinais de Alfa-carragenana (102,2 e 94,2 ppm em GS-D) (FALSHAW *et al*., 1996) e *Beta*-carragenana (102,2 e 94,2 ppm em GS-D) (VAN DE VELDE; PEREIRA; ROLLEMA, 2004). Os sinais em 104,3 e 97,7 ppm (GS) são correspondentes a *Nu*-carragenana (CIANCIA *et al*., 1993a). Após dessulfatação foi observada a diminuição da intensidade destes sinais, concomitante ao aparecimento de um novo sinal (95,8 ppm em GS-D) correspondente a β-D-galactose ligada a α-D-galactose (USOV; YAROTSKY; SHASHKOV, 1980). O sinal de baixa intensidade em 97,8 ppm ainda presente na GS-D mostra que a dessulfatação destas díades foi parcial.

Estes resultados estão de acordo com as dosagens de sulfato, 35,9% na fração GS e 12,8% na fração GS-D, mostrando a dessulfatação parcial do polímero.

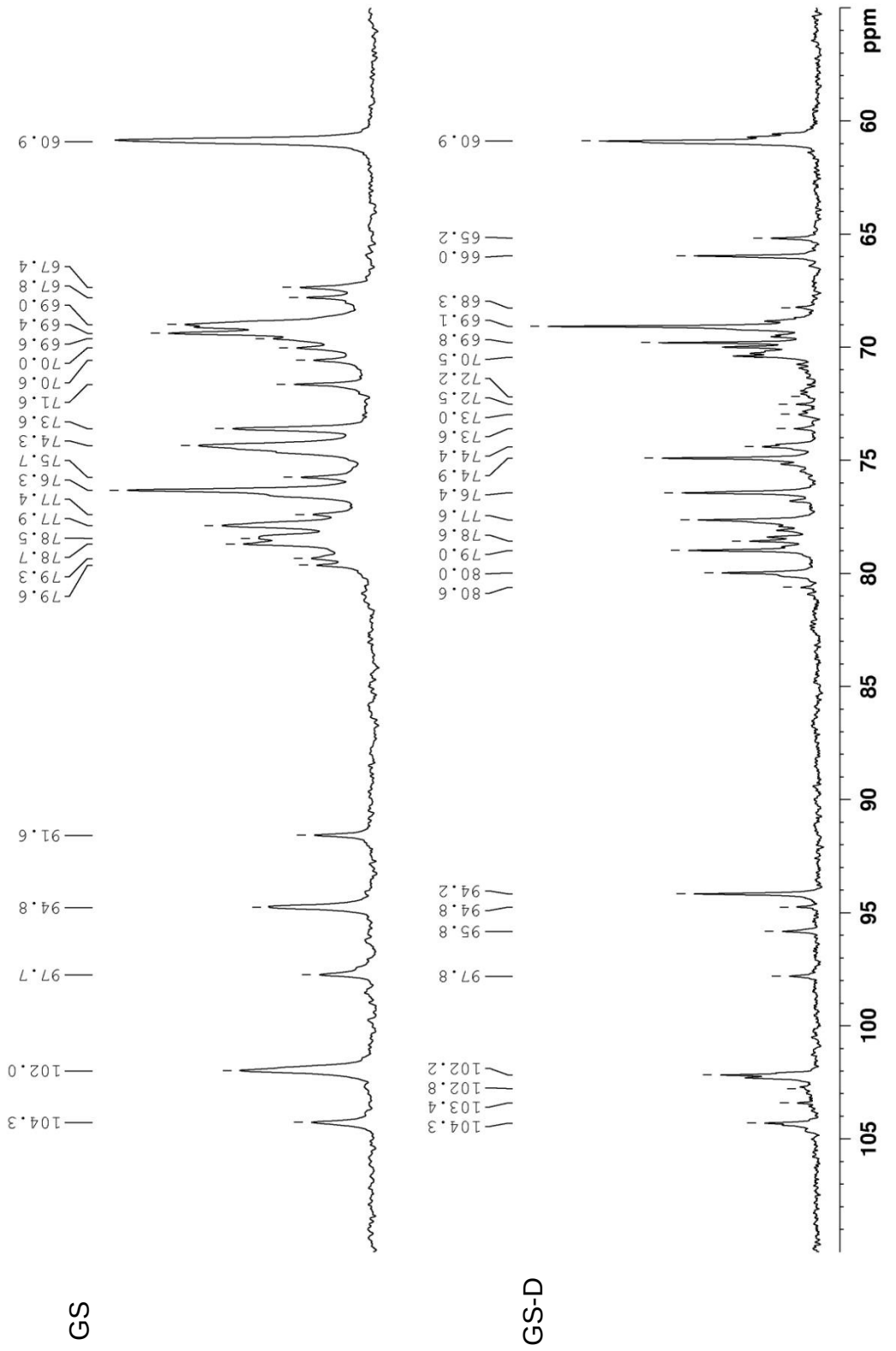


FIGURA 25 – ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DAS FRAÇÕES GS E GS-D

A região α-anomérica do espectro de RMN de ^{1}H de GS-D, quando comparado ao espectro de GS (Figura 26), mostrou a diminuição de *Kappa*-carragenana (5,10 ppm em GS e GS-D) (CIANCIA *et al*., 1993a), corresponde a díades ainda sulfatadas em GS-D. O sinal em 5,31 ppm corresponde ao H-1 das unidades B de *Iota*-carragenana (CIANCIA *et al*., 1993a). Este sinal desaparece no espectro de GS-D, correspondente ao aparecimento do sinal em 5,28 ppm de díades *Alfa*-carragenana (β-D-galactose ligada a 3,6-anidrogalactose 2-sulfato) (FALSHAW *et al*., 1996), bem como o aparecimento do sinal em 5,08 ppm, correspondente ao H-1 da unidade 3,6-anidrogalactose, compondo a díade dessulfatada *Beta*-carragenana (β-D-galactose ligada a 3,6-anidrogalactose) (VAN DE VELDE; PEREIRA; ROLLEMA, 2004). Em 5,25 ppm (GS) correspondente a díades *Mu*-carragenana, observa-se o desaparecimento deste sinal em GS-D. O sinal em 5,51 ppm (GS) corresponde a díades *Nu*-carragenana, em GS-D este sinal desaparece, concomitante com o aparecimento do sinal em 5,21 ppm de díades parcialmente dessulfatadas provenientes de *Nu*-carragenana, correspondente a díades de *Omicron*-carragenana (β-D-galactose 4-sulfato ligada a α-D-galactose 2-sulfato). Em 5,15 ppm observa-se o aparecimento do sinal correspondente a díades dessulfatadas β-D-galactose ligada a α-D-galactose (ZIBETTI *et al*., 2009).

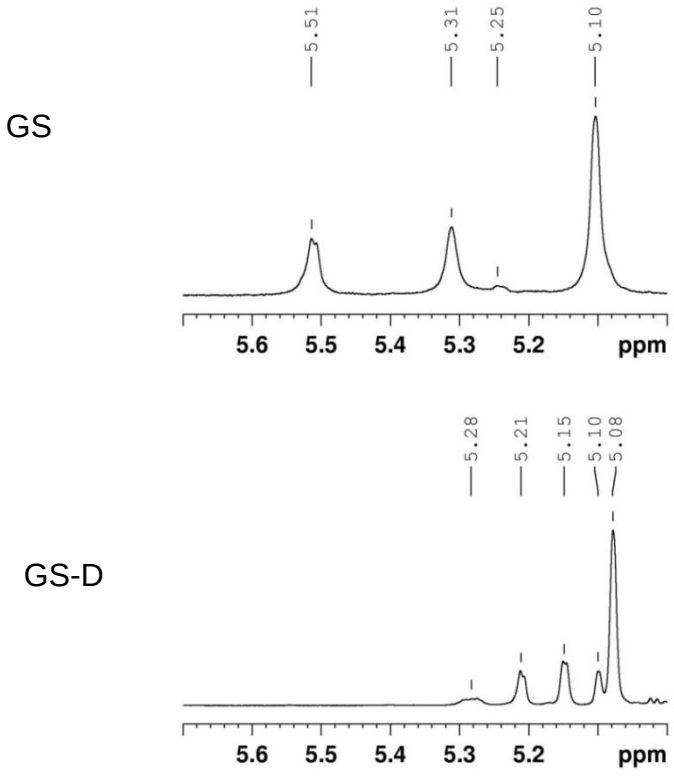


FIGURA 26 – ESPECTRO DE RMN DE ^{1}H DAS FRAÇÕES GS E GS-D

A composição monossacarídica da fração GS-D foi realizada por integração da região α-anomérica das unidades B no RMN de ^{1}H.

Os resultados, comparados à fração GS, mostram que possivelmente não houve degradação das unidades 3,6-anidrogalactose no processo de dessulfatação, pois as porcentagens destas unidades são semelhantes nas frações nativa e dessulfatada e o rendimento deste procedimento foi de 77,0%, corroborando com esta afirmação. A fração nativa (GS) apresenta 61,3% de galactose e 38,7% de unidades 3,6-anidrogalactose (AG). A fração GS-D apresenta 64,7% de galactose e 35,3% de AG (Tabela 8).

TABELA 8 – COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DA FRAÇÃO GS-D

Frações	^{1}H RMN (%)[a]	
	Gal[b]	AG[c]
GS	61,3	38,7
GS-D	64,7	35,3

[a] Determinada a partir da integração da região α-anomérica do RMN de ^{1}H; [b] Gal = Galactose [c] AG = 3,6-anidrogalactose.

Através da integração dos picos da região α-anomérica correspondentes aos H-1 das unidades B das carragenanas da fração GS-D foi possível quantificar as díades que compõem essa fração dessulfatada.

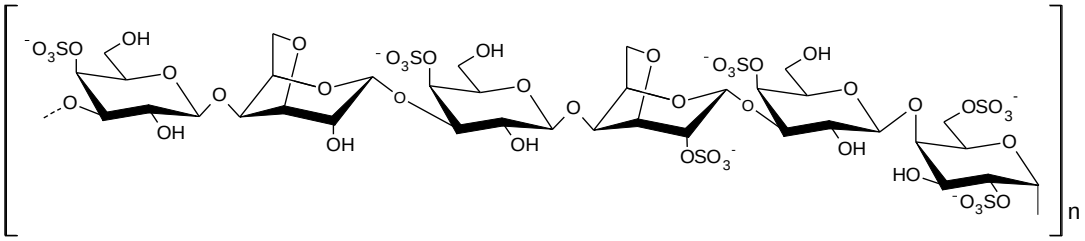
A fração GS-D apresenta 70,6% de díades que apresentam 3,6-anidrogalactose 2 sulfatadas ou não nas unidades B e 29,4% de díades que apresentam D-galactose nas unidades B. Parte destas unidades galactosídicas são sulfatadas no C-2.

Na fração GS-D a relação de díades contendo 3,6-anidrogalactose e galactose nas unidades B é de 1:0,4. A porcentagem total das díades presentes na fração GS-D é: *Beta*-carragenana (55,4%), *Kappa*-carragenana (9,9%), β-D-galactose ligada a α-D-galactose (16,8%), *Omicron*-carragenana (12,6%) e *Alfa*-carragenana (5,3%).

6.2.2 Tratamento alcalino da fração GS

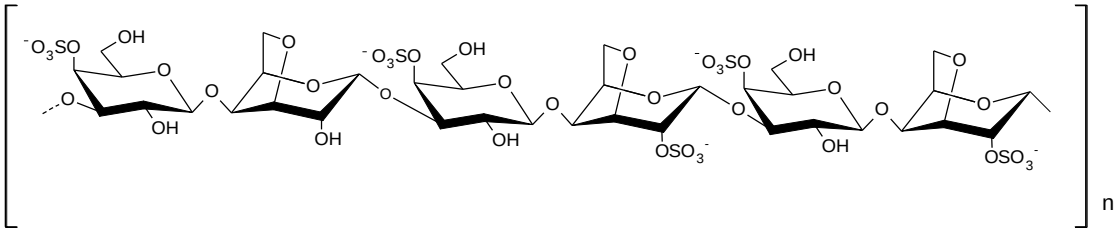
A fração GS (I) foi submetida ao tratamento alcalino. Esta modificação é capaz de remover os grupos sulfato de maneira seletiva em C-6 das unidades α-D-galactose 6-sulfato ou 2,6-dissulfato, convertendo estas unidades precursoras em seus derivados 3,6-anidro-α-D-galactose (NOSEDA; CEREZO, 1995). Após o tratamento alcalino de GS, foi originada a fração GS-TA (III) (Figura 27), que é composta basicamente por díades de *Kappa* (β-D-galactose 4-sulfato ligada a 3,6-anidrogalactose) e *Iota*-carragenana (β-D-galactose 4-sulfato ligada a 3,6-anidrogalactose 2-sulfato).

GS



Kappa-caragenana (κ) (G4S→DA) *Iota*-carragenana (ι) (G4S→DA2S) *Nu*-carragenana (ν) (G4S→D2S,6S)

GS-TA



Kappa-caragenana (κ) (G4S→DA) *Iota*-carragenana (ι) (G4S→DA2S) *Iota*-carragenana (ι) (G4S→DA2S)

FIGURA 27 – ESQUEMA DAS CARRAGENANAS DE *G. skottsbergii* NA FORMA NATIVA (GS) E APÓS TRATAMENTO ALCALINO (GS-TA)

6.2.2.1 Análises químicas da fração GS-TA

A fração GS-TA apresentou rendimento de 81,8% em relação a GS, e 34,4% de grupos sulfato. Estes resultados mostram que houve remoção de grupos sulfato no C-6, para ciclização das unidades B, visto que as carragenanas nativas mostraram 35,9% de grupos sulfato.

6.2.2.2 Espectroscopia de RMN da fração GS-TA

A análise da região anomérica dos espectros de RMN de ^{13}C das frações GS e GS-TA (Figura 28) mostrou que houve ciclização das unidades B na fração GS-TA. Os sinais das díades de *Nu*-carragenana (104,3 e 97,7 ppm) presentes em GS, na fração GS-TA apresentaram uma redução significativa, com o respectivo aumento dos sinais de *Iota*-carragenana (102,0 e 91,6 ppm), mostrando que as unidades precursoras *Nu*-carragenanas, formaram seus derivados 3,6-anidrogalactose. A intensidade dos sinais de *Kappa*-carragenana (102,0 e 94,8 ppm) mantiveram-se após o tratamento alcalino (CIANCIA *et al*., 1993a; CIANCIA; MATULEWICZ; CEREZO, 1997).

Através do experimento de RMN de ^{13}C-DEPT (Figura 29) foi possível identificar os C-6 presentes no polissacarídeo. Deste modo, foi possível localizar o C-6 sulfatado da unidade B de *Nu*-carragenana na fração GS (67,8 ppm), e após o tratamento alcalino houve o desaparecimento deste sinal, mostrando que estas unidades de α-D-galactose 2,6-dissulfato foram convertidas a α-D-3,6-anidrogalactose 2-sulfato.

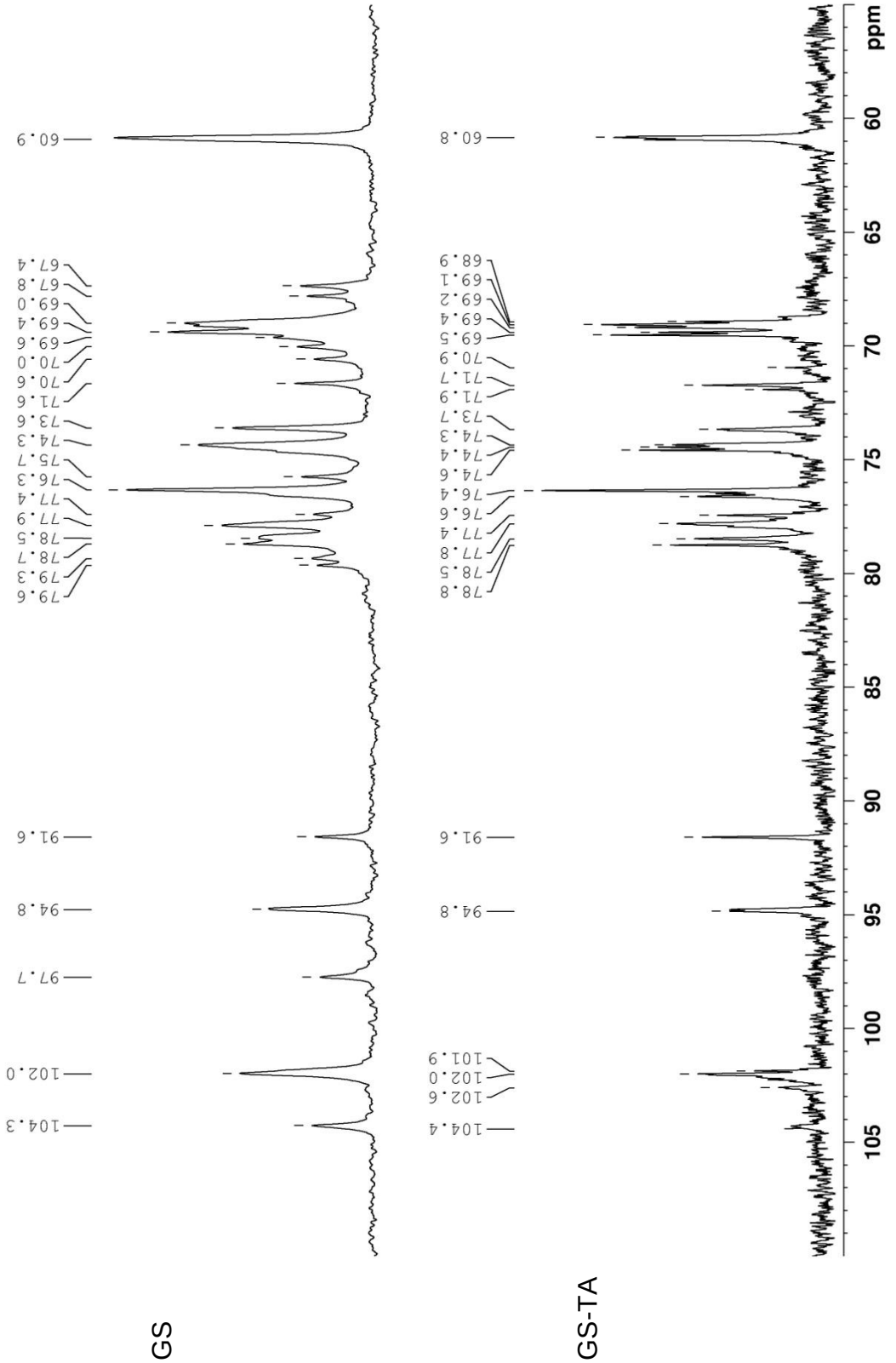
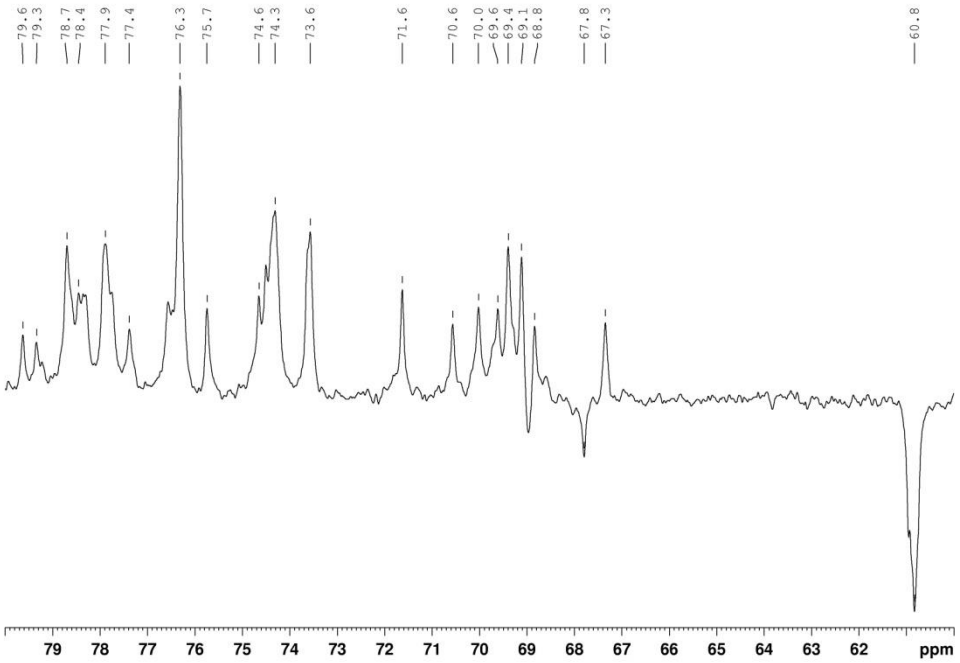


FIGURA 28 – ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DAS FRAÇÕES GS E GS-TA

GS



GS-TA

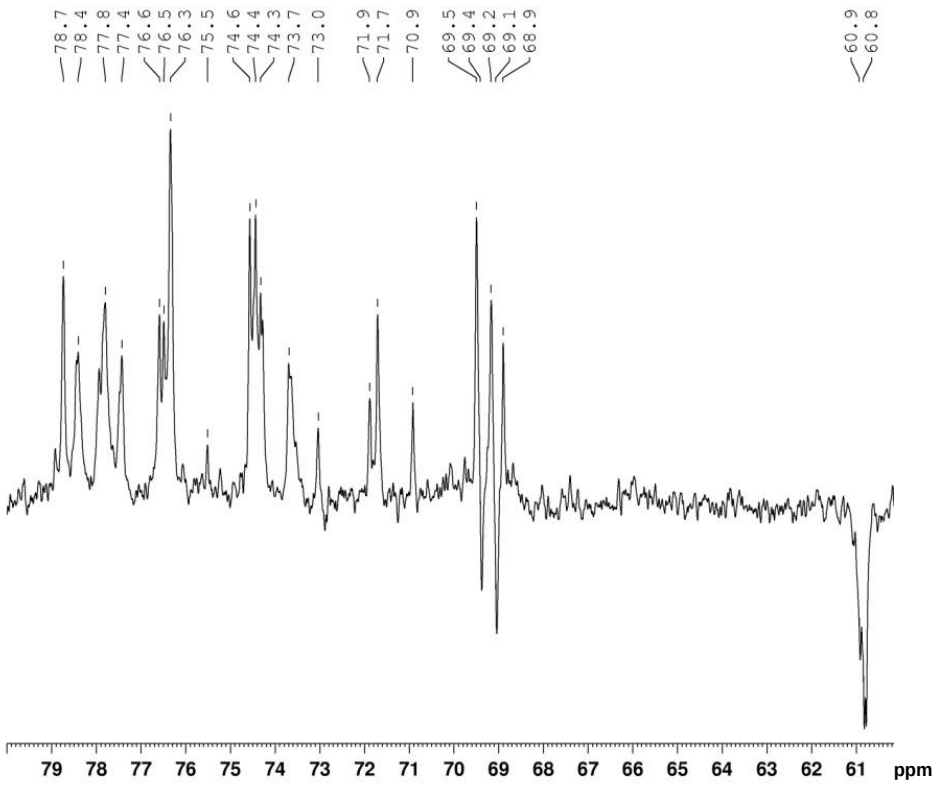


FIGURA 29 – ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C-DEPT DAS FRAÇÕES GS E GS-TA

O espectro de RMN de ^{1}H, região α-anomérica, da fração GS-TA, quando comparado ao da fração GS (Figura 30), mostrou a diminuição do sinal de *Nu*-carragenana (5,51 ppm) com o respectivo aumento da intensidade do sinal de *Iota*-carragenana (5,31 ppm). O RMN de ^{1}H é um método mais sensível do que o RMN de ^{13}C, deste modo foi possível observar os sinais de *Nu*-carragenana ainda presentes na fração GS-TA. *Mu* e *Kappa*-carragenana permanecem na fração GS-TA em 5,25-5,23 e 5,10 ppm, respectivamente. No espectro de GS-TA é possível observar o sinal em 5,08 ppm correspondente a *Beta*-carragenana (CIANCIA *et al*., 1993a; VAN DE VELDE; PEREIRA; ROLLEMA, 2004).

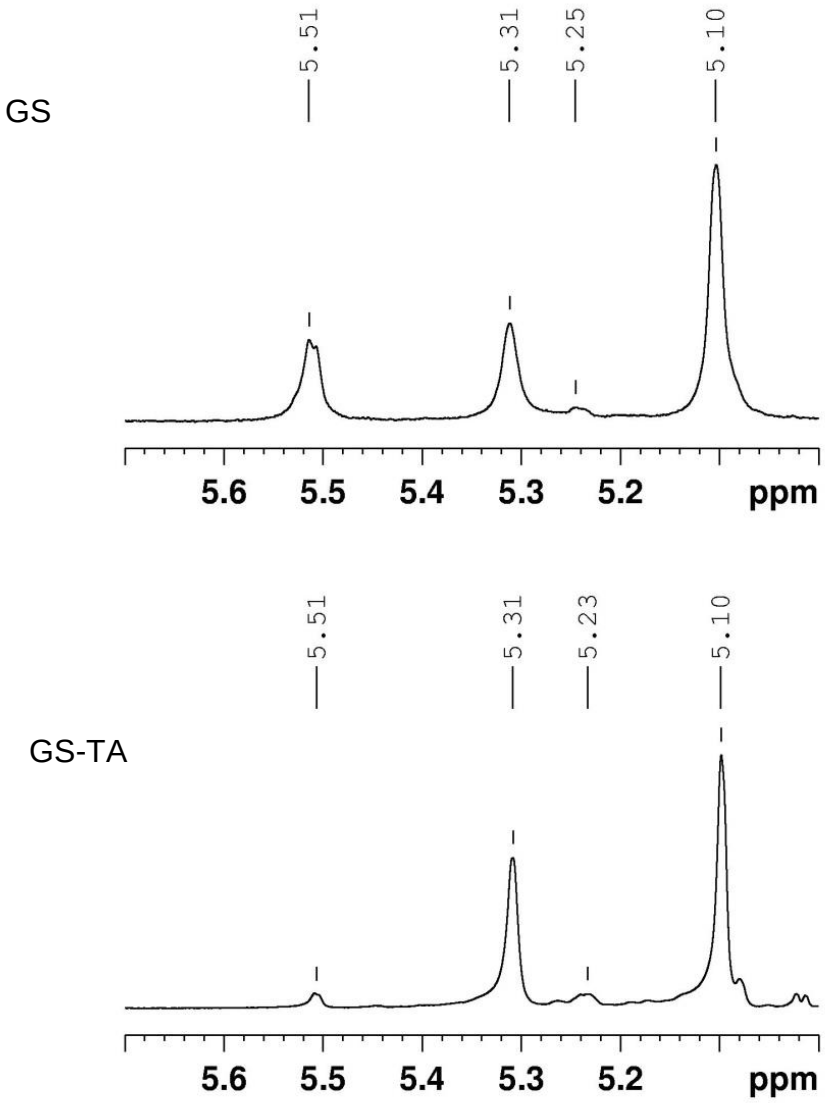


FIGURA 30 – ESPECTRO DE RMN DE ^{1}H DAS FRAÇÕES GS E GS-TA

A integração dos sinais correspondentes aos H-1 no espectro de próton da fração GS-TA, comparada à fração GS, demonstrou que a composição monossacarídica desta fração após o tratamento alcalino mostrou um aumento de 7,6% de unidades 3,6-anidrogalactose (38,7% em GS e 46,3% em GS-TA) concomitante à diminuição das unidades de galactose (61,3% em GS e 53,7% em GS-TA) (Tabela 9). Este resultado demonstra que 7,6% das unidades α-galactose 6 e 2,6-sulfato, foram convertidas a 3,6-anidrogalactose e 3,6-anidrogalactose 2 sulfato.

TABELA 9 – COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES GS E GS-TA

Frações	^{1}H RMN (%)[a]	
	Gal[b]	AG[c]
GS	61,3	38,7
GS-TA	53,7	46,3

[a] Determinada a partir da integração da região α-anomérica do RMN de ^{1}H; [b] Gal = Galactose; [c] AG = 3,6-anidrogalactose.

Através da integração dos picos da região α-anomérica correspondentes aos H-1 das unidades B no espectro de RMN de ^{1}H da fração GS-TA foi possível quantificar as díades que compõem essa fração do tratamento alcalino.

A fração GS-TA apresenta-se composta por 92,6% de díades constituídas por unidades 3,6-anidrogalactose 2 sulfatadas ou não nas unidades B e 7,4% das díades são constituídos por D-galactose nas unidades B. Algumas destas unidades galactosídicas são sulfatadas no C-2.

A fração GS-TA mostrou uma relação, de díades contendo 3,6-anidrogalactose e galactose nas unidades B, de 1:0,1 (AG:Gal).

Através da porcentagem total das díades presentes na fração GS-TA, comparada à fração GS, observa-se a redução de 16,7% de díades *Nu*-carragenana (3,0% em GS-TA e 19,7% em GS), concomitante com o aumento de 12,0% de díades *Iota*-carragenana (33,9% em GS-TA e 21,9% em GS). A porcentagem das demais díades presentes na fração GS-TA é: *Kappa*-carragenana (53,5%), *Mu*-carragenana (4,4%) e *Beta*-carragenana (5,2%).

6.2.3 Dessulfatação da fração GS-TA

A fração GS-TA (III) foi submetida ao processo de dessulfatação solvolítica, pelo método de Nagasawa, Inoue, Tokuyasu (1979), para remoção de grupos sulfato, gerando a fração GS-TA-D (IV) (Figura 31).

A fração GS-TA-D mostrou-se composta majoritariamente por díades *Beta*-carragenana (β-D-galactose ligadas a 3,6-anidro-α-D-galactose).

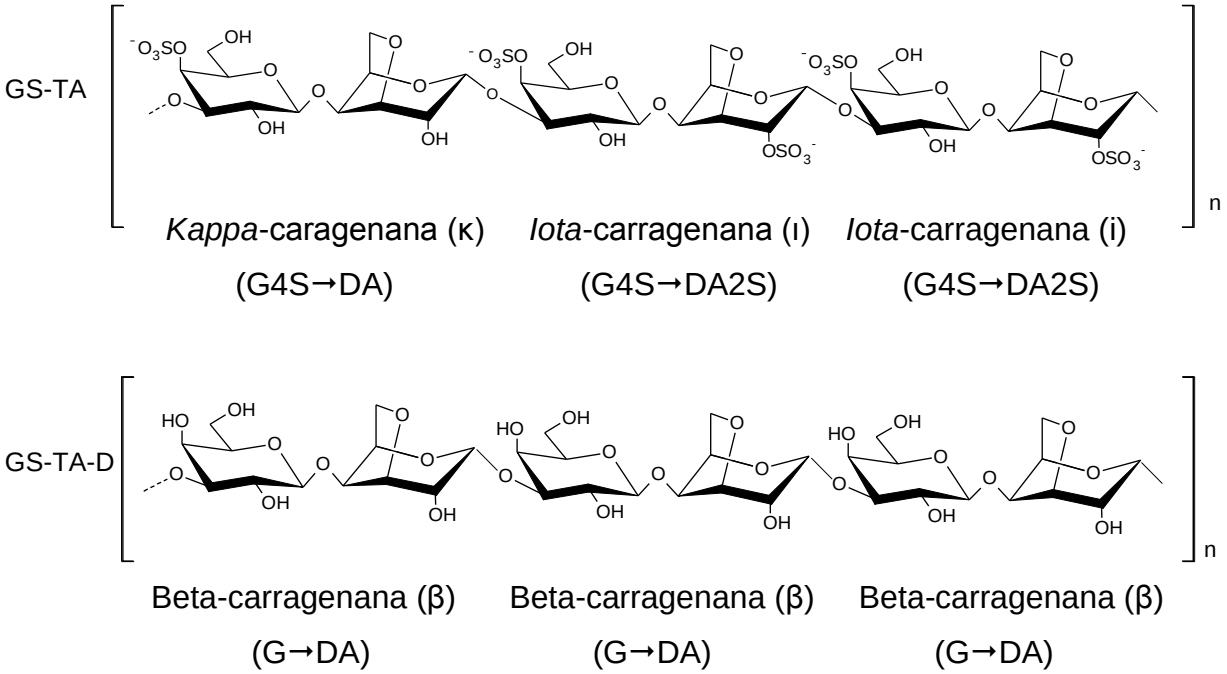


FIGURA 31 – ESQUEMA DAS CARRAGENANAS DE *G. skottsbergii* SUBMETIDAS A TRATAMENTO ALCALINO (GS-TA) SEGUIDO DE DESSULFATAÇÃO (GS-TA-D)

6.2.3.1 Análises químicas da fração GS-TA-D

A fração GS-TA-D apresentou rendimento de 83,0% em relação a GS-TA (34,4% de grupos sulfato) e dessulfatação de 60,2%. Deste modo a fração GS-TA-D apresenta 13,7% de grupos sulfato em sua composição (Tabela 10).

TABELA 10 – RENDIMENTO E PORCENTAGEM DE DESSULFATAÇÃO DA FRAÇÃO GS-TA-D

Fração	Rendimento (%)[a]	Sulfato (%)[b]	Dessulfatação (%)[c]
GS-TA	-	34,4	-
GS-TA-D	83,0	13,7	60,2

[a] Rendimento em relação ao total de polissacarídeos recuperados após dessulfatação da fração GS-TA; [b] Determinação de acordo com o método de Dodgson, 1961; [c] Dessulfatação em relação a fração GS-TA.

6.2.3.2 Espectroscopia de RMN da fração GS-TA-D

A análise da região anomérica dos espectros de RMN de ^{13}C das frações GS-TA e GS-TA-D (Figura 32) mostrou a presença dos sinais correspondentes às díades de *Kappa*-carragenana (102,0 e 94,8 ppm em GS-TA), para estes sinais na fração dessulfatada (GS-TA-D) foi observada a diminuição da intensidade (102,2 e 94,7 ppm) (CIANCIA *et al*., 1993a). Os sinais de *Kappa*-carragenena, ainda presentes na fração GS-TA-D, correspondem a um processo de dessulfatação parcial destas díades. Os sinais correspondentes a *Iota*-carragenana (102,0 e 91,6 ppm em GS-TA) (CIANCIA *et al*., 1993a), após dessulfatação desaparecem, concomitante com o aparecimento dos sinais de *Beta*-carragenana (102,2 e 94,1 ppm em GS-TA-D) (VAN DE VELDE; PEREIRA; ROLLEMA, 2004). Os sinais em 104,3 e 97,8 ppm, presentes no espectro de GS-TA-D, são correspondentes a díades de *Nu*-carragenana (CIANCIA *et al*., 1993a). Após dessulfatação estas díades são convertidas em β-D-galactose ligada a α-D-galactose, as quais são verificadas pela presença dos sinais em 104,3 e 95,8 ppm em GS-TA-D (USOV; YAROTSKY; SHASHKOV, 1980).

Estes resultados estão de acordo com os teores de sulfato obtidos nestas frações, que mostraram uma dessulfatação parcial do polímero. O teor de sulfato da fração GS-TA foi 34,4% e a fração GS-TA-D 13,7%.

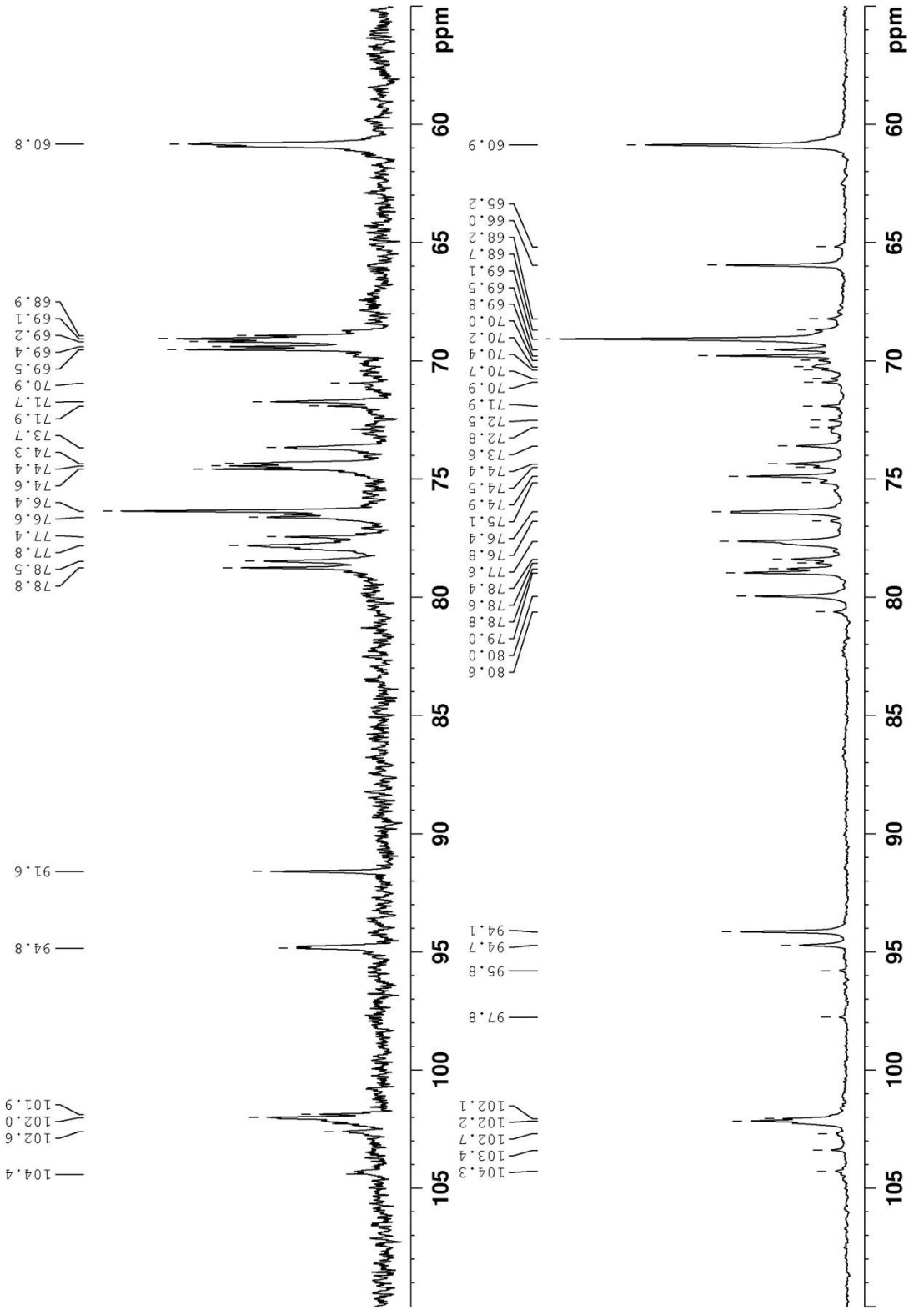


FIGURA 32 – ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DAS FRAÇÕES GS-TA E GS-TA-D

Comparando a região α-anomérica dos espectros de RMN de ^{1}H de GS-TA e GS-TA-D (Figura 33), pôde-se observar o sinal correspondente ao H-1 das unidades B de *Kappa*-carragenana em 5,10 ppm (GS-TA), este sinal diminuiu no espectro de GS-TA-D, correspondente a díades ainda sulfatadas de *Kappa*-carragenana (CIANCIA *et al*., 1993a). O sinal da unidade 3,6-anidrogalactose 2-sulfato de *Iota*-carragenana (5,31 ppm em GS-TA) (CIANCIA *et al*., 1993a) desapareceu no espectro de GS-TA-D, correspondente ao aparecimento do sinal em 5,28 ppm de unidades 3,6-anidrogalactose 2-sulfato de díades *Alfa*-carragenana (FALSHAW *et al*., 1996), bem como o aparecimento do sinal em 5,08 ppm, correspondente a unidades 3,6-anidrogalactose sem sulfato de *Beta*-carragenana (VAN DE VELDE; PEREIRA; ROLLEMA, 2004). Os sinais em 5,51 e 5,23 ppm (GS-TA), correspondem a díades de *Nu* e *Mu*-carragenana, respectivamente (CIANCIA *et al*., 1993a). Estes sinais desaparecem no espectro de GS-TA-D, concomitante com o aparecimento do sinal em 5,15 ppm da díade β-D-galactose ligada a α-D-galactose (ZIBETTI *et al*., 2009) bem como o sinal em 5,21 ppm, corresponde a díades *Omicron*-carragenana.

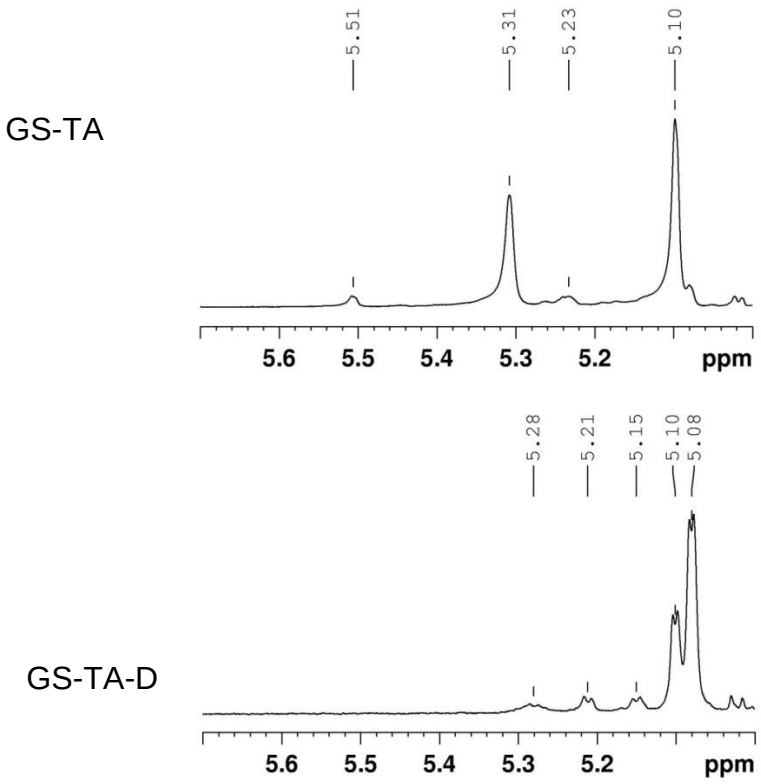


FIGURA 33 – ESPECTRO DE RMN DE ^{1}H DAS FRAÇÕES GS-TA E GS-TA-D

A composição monossacarídica da fração GS-TA-D, comparada à fração GS-TA, mostra que possivelmente não houve degradação das unidades 3,6-anidrogalactose no processo de dessulfatação, pois as porcentagens destas unidades são semelhantes na fração de origem e dessulfatada, ainda devido ao rendimento de 83,0%, esta afirmação pode ser auxiliada. Na fração GS-TA foi observado 53,7% de galactose e 46,3% de unidades 3,6-anidrogalactose, enquanto GS-TA-D apresenta 55,0% e 45,0% de galactose e unidades 3,6-anidrogalactose, respectivamente (Tabela 11).

TABELA 11 – COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DA FRAÇÃO GS-TA-D

Frações	^{1}H RMN (%)[a]	
	Gal[b]	AG[c]
GS-TA	53,7	46,3
GS-TA-D	55,0	45,0

[a] Determinada a partir da integração da região α-anomérica do RMN de ^{1}H; [b] Gal = Galactose [c] AG = 3,6-anidrogalactose.

Através da integração dos picos da região α-anomérica correspondentes aos H-1 das unidades B no espectro de RMN de ^{1}H da fração GS-TA-D foi possível quantificar as díades presentes na fração dessulfatada.

A fração GS-TA-D mostrou 90,0% de díades constituídas por unidades 3,6-anidrogalactose 2 sulfatadas ou não nas unidades B e 10,0% de díades constituídas por D-galactose nas unidades B, uma baixa porcentagem destas díades apresenta-se sulfatada no C-2.

A relação de díades contendo 3,6-anidrogalactose e galactose nas unidades B é de 1:0,1 (AG:Gal) na fração GS-TA-D. A porcentagem total das díades presentes na fração GS-TA-D, comparadas à GS-TA, mostra que houve uma redução 25,3% nas díades de *Kappa*-carragenana (de 53,5% em GS-TA para 28,2% em GS-TA-D). As díades de *Beta* carragenana aumentaram em 53,3% (de 5,2% em GS-TA para 58,5% em GS-TA-D). A dessulfatação resultou no aparecimento de β-D-galactose ligada a α-D-galactose (5,1%), *Omicron*-carragenana (4,9%) e *Alfa*-carragenana (3,3%).

6.2.4 Precipitação com KCl da fração GS

A fração GS (I) foi submetida à precipitação com cloreto de potássio (KCl) 2 M. Conforme resultados obtidos por Matulewicz *et al*., (1989), nesta concentração obtem-se maior rendimento, sendo que a precipitação resulta no fracionamento por conteúdo de sulfato e também unidadades 3,6-anidrogalactosídicas (MATULEWICZ *et al*., 1989). A precipitação foi realizada durante 3 horas sob agitação magnética, posteriormente a solução foi armazenada a 4 °C durante 16 horas para precipitação de alguns tipos de polissacarídeos.

Em precipitação com KCl, Matulewicz *et al*., (1989) fracionou as carragenanas de *Gigartina skottsbergii*, resultando em uma fração precipitada, composta por *Kappa*/*Iota*-carragenanas, e uma fração solúvel composta por *Mu*/*Nu*-carragenanas.

Os grupos sulfato têm maior caráter hidrofílico em relação a 3,6-anidrogalactose. Em solução aquosa, na presença de íons potássio, *Kappa* e *Iota*-carragenana formam uma rede molecular tridimensional, suspendendo a água ao formar um gel, isto acontece quando as carragenanas são aquecidas e na sequencia resfriadas. Em *Kappa* e *Iota*, verifica-se a ausência de grupos sulfato no C-6 das unidades B, pois apresentam unidades 3,6-anidrogalactose, favorecendo a formação helicoidal (dupla hélice) para formação de géis. As unidades B 6-sulfatadas, presentes em *Mu* e *Nu*-carragenana auxiliam na solubilidade em KCl.

O fracionamento de GS com KCl 2 M gerou duas frações:

- GS-P (V), precipitada em KCl e enriquecida com *Kappa* e *Iota*-carragenanas;

- GS-S (VI), solúvel em KCl, enriquecida com *Nu*-carragenanas (Figura 34).

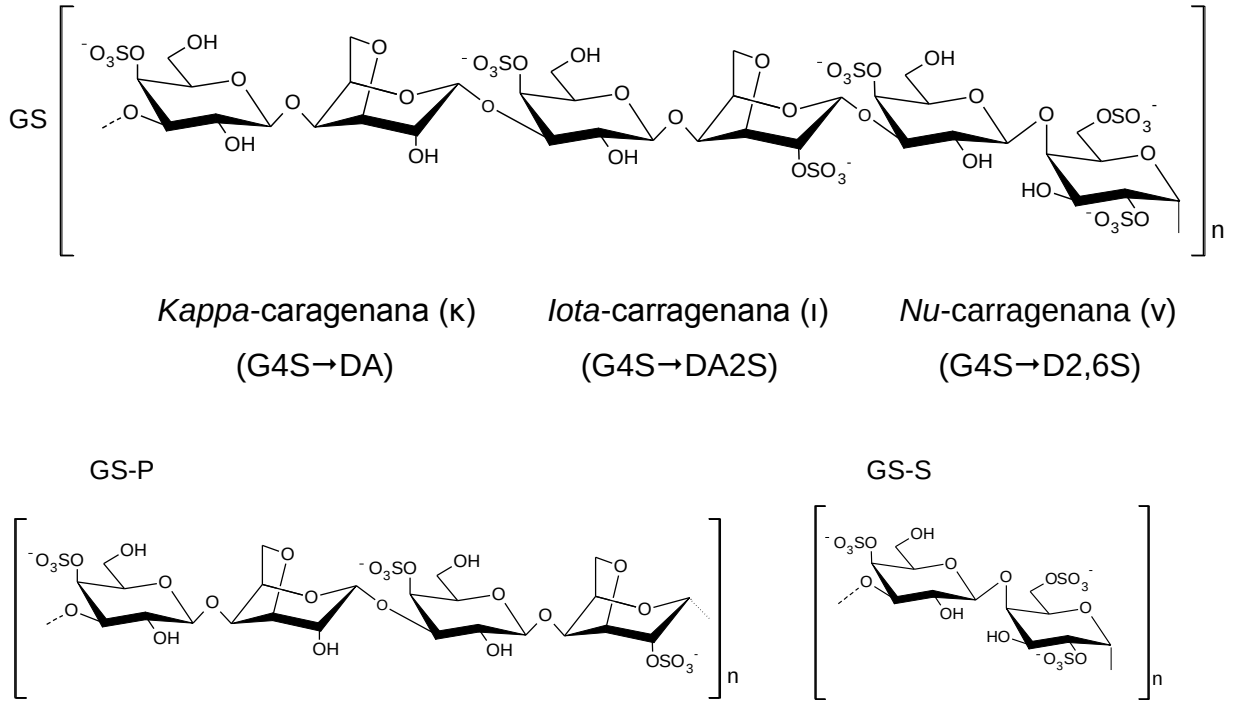


FIGURA 34 – ESQUEMA DAS CARRAGENANAS DE *G. skottsbergii* NA FORMA NATIVA (GS) E PRECIPITADAS EM KCl 2 M (GS-P) E SOLÚVEIS EM KCl 2 M (GS-S)

6.2.4.1 Análises químicas das frações GS-P e GS-S

As frações GS-P e GS-S apresentaram rendimentos de 44,9% e 14,4%, respectivamente, em relação a GS. O teor de sulfato da fração GS é de 35,9%, enquanto a fração GS-P apresentou um aumento no teor de sulfatação (38,2%) e a fração GS-S apresentou uma redução na sulfatação (33,0%). Estes resultados estão de acordo com os previamente descritos (CARLUCCI *et al*., 1997), sendo que a fração GS-P apresenta grande quantidade de díades sulfatadas na unidade A (*Kappa*/*Iota*-carragenana) e na unidade B (*Iota*-carragenena), esta fração apresenta também menores porcentagens de *Nu* e *Mu* -carragenana, que são sulfatadas nas unidades A e B. A fração GS-S apresenta maiores quantidades de díades *Nu* e *Mu*-carragenana, mas as demais díades sulfatadas estão em menores porcentagens, condizente com a redução na sulfatação (Tabela 12).

TABELA 12 – RENDIMENTO E TEOR DE GRUPOS SULFATO DAS FRAÇÕES GS-P E GS-S

Fração	Rendimento (%)[a]	Sulfato (%)[b]
GS-P	44,9	38,2
GS-S	14,4	33,0

[a] Rendimento em relação ao total de polissacarídeos recuperados após precipitação com KCl 2,0 M; [b] Determinação de acordo com o método de Dodgson (1961).

6.2.4.2 Espectroscopia de RMN das frações GS-P e GS-S

Comparando os espectros de GS, GS-P e GS-S através da região anomérica do RMN de ^{13}C (Figura 35), foi possível observar que as porções do polissacarídeo ricas em *Kappa*-carragenana (102,0 e 94,7-94,8 ppm) e *Iota*-carragenana (102,0 e 91,6 ppm) precipitaram, os sinais correspondentes a essas díades tiveram um leve aumento de intensidade na fração GS-P e os sinais correspondentes a díades de *Nu*-carragenana (104,2-104,3 e 97,7 ppm) reduziram em relação à *Kappa* e *Iota*. O espectro de GS-S mostra os sinais correspondentes às díades de *Nu*-carragenana, os quais aumentaram sua intensidade nesta fração, deste modo foi possível observar que as porções do polissacarídeo ricas em *Nu*-carragenana apresentam-se solúveis em KCl. Os sinais de *Kappa* tiveram sua intensidade reduzida em GS-S e os sinais de *Iota*-carragenana diminuíram significativamente, em relação a GS (CIANCIA *et al*., 1993a; CIANCIA; MATULEWICZ; CEREZO, 1997).

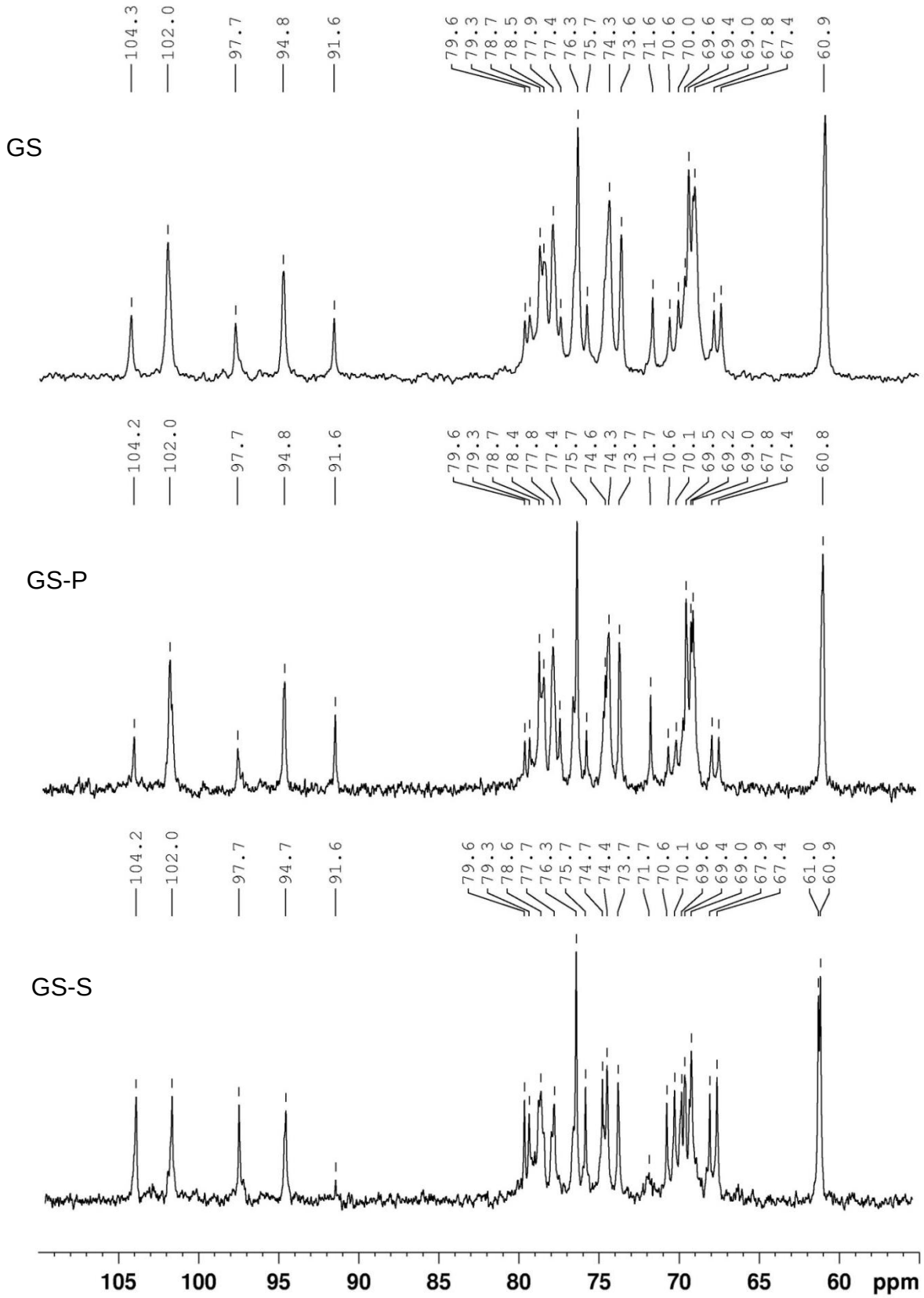


FIGURA 35 – ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DAS FRAÇÕES GS, GS-P E GS-S

Os espectros de RMN de ^{1}H, região α-anomérica, das frações GS, GS-P e GS-S são mostrados na Figura 36. Comparando o espectro de GS-P e GS, pôde-se

observar em GS-P um pequeno aumento na intensidade do sinal correspondente a *Kappa* e *Iota*-carragenana (5,10 e 5,31 ppm, respectivamente). Os sinais correspondentes a *Nu* e *Mu*-carragenana (5,51 e 5,24-5,25 ppm, respectivamente) mostraram uma redução na intensidade em relação às demais díades. Isto demonstra que a fração GS-P é enriquecida com díades *Kappa* e *Iota*-carragenana, em relação a GS. A fração GS-S, comparada a GS, mostra que as díades de *Nu* e *Mu*-carragenana tiveram um aumento na intensidade do sinal. Os sinais correspondentes a *Kappa* e *Iota*-carragenana diminuíram em relação a *Nu* e *Mu*. Estes resultados indicam que a fração GS-S é enriquecida com díades *Nu* e *Mu*-carragenana, em relação a GS (CIANCIA *et al*., 1993a).

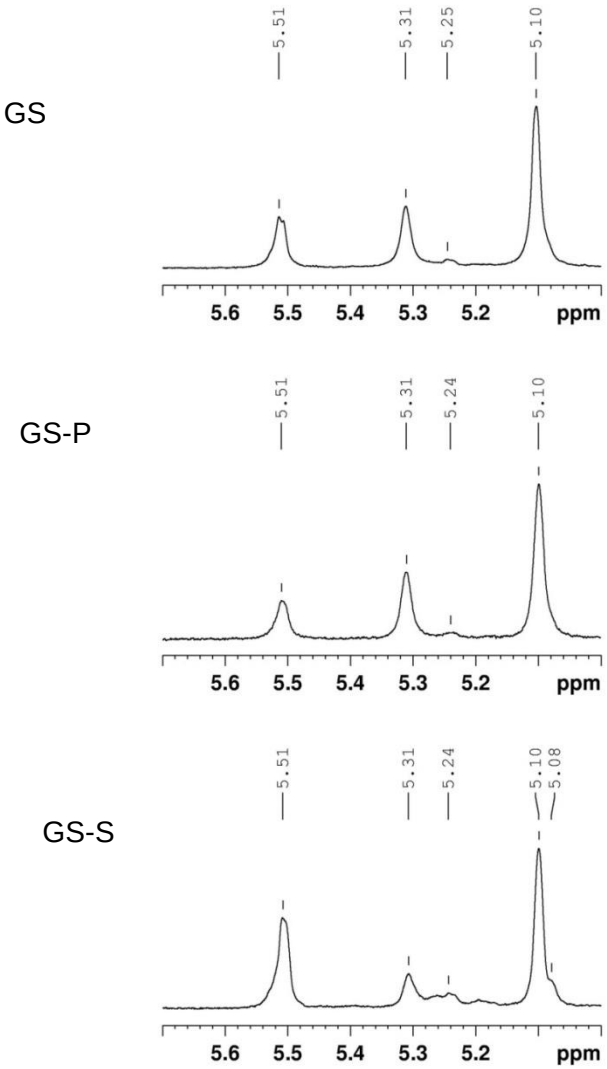


FIGURA 36 – ESPECTRO DE RMN DE ^{1}H DAS FRAÇÕES GS, GS-P E GS-S

Os dados de composição monossacarídica das frações GS-P e GS-S confirmam o procedimento de KCl. A fração nativa (GS) apresentou 38,7% de

unidades 3,6-anidrogalactose e 61,3% de galactose. Após fracionamento com KCl a fração precipitada (GS-P) é enriquecida com as díades *Kappa* e *Iota*, que possuem a unidade B ciclizada na forma de 3,6-anidrogalactose, deste modo houve um aumento da porcentagem destas unidades para 40,8% em GS-P, a qual possui 59,2% de galactose. A fração solúvel (GS-S) é enriquecida com as díades *Nu* e *Mu*-carragenana, comparada com a fração GS, estas díades possuem a unidade B na forma de α-D-galactose 2,6-dissulfato e 6- sulfato, respectivamente, estes resultados foram visualizados através da redução de unidades 3,6-anidrogalactose para 30,4% e um aumento de unidades galactose para 69,6% (Tabela 13).

TABELA 13 – COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES GS, GS-P E GS-S

Frações	^{1}H RMN (%)[a]	
	Gal[b]	AG[c]
GS	61,3	38,7
GS-P	59,2	40,8
GS-S	69,6	30,4

[a] Determinada a partir da integração da região α-anomérica do RMN de ^{1}H; [b] Gal = Galactose; [c] = 3,6-anidrogalactose.

A quantificação das díades que compõem as frações GS-P e GS-S foi realizada através da integração dos picos correspondentes aos H-1 das unidades B, região α-anomérica, do espectro de RMN de ^{1}H.

A fração GS-P apresenta 81,7% de díades que apresentam unidades 3,6-anidrogalactose, podendo estar 2 sulfatadas, nas unidades B e 18,3% das díades apresentam D-galactose, podendo estar sulfatadas em C-6 ou C-2 e C-6. A relação de díades contendo AG e Gal nas unidades B é de 1:0,2 (AG:Gal).

Em relação a GS, a fração GS-P teve um aumento de 1,1% nas díades de *Kappa*-carragenana (de 55,5% para 56,6%) e 3,2% em *Iota*-carragenana (de 21,9% para 25,1%). As díades de *Nu*-carragenana reduziram 4,1% (de 19,7% para 15,6%) e *Mu*-carragenana reduziu 0,2% (de 2,9% para 2,7%).

A fração GS-S apresenta 60,9% de díades com 3,6-anidrogalactose 2 sulfatadas ou não, nas unidades B e 39,1% constituídas por D-galactose, com uma relação 1:0,6 (AG:Gal).

A fração GS-S, em relação a GS, teve um aumento de 14,2% nas díades de *Nu*-carragenena (de 19,7% para 33,9%) e 2,3% em *Mu*-carragenana (de 2,9% para 5,2%). Houve ainda uma redução das díades de *Kappa*-carragenana de 12,8% (de

55,5 para 42,7%) e 9,8% de *Iota*-carragenana (de 21,9% para 12,1%). Esta fração apresentou díades de *Beta*-carragenana (6,1%).

6.2.5 Dessulfatação das frações GS-P e GS-S

As frações GS-P (V) e GS-S (VI), foram submetidas ao processo de dessulfatação solvolítica, pelo método de Nagasawa, Inoue, Tokuyasu (1979), para remoção de grupos sulfato, gerando as frações GS-P-D (VII) e GS-S-D (VIII) (Figura 37a e 37b).

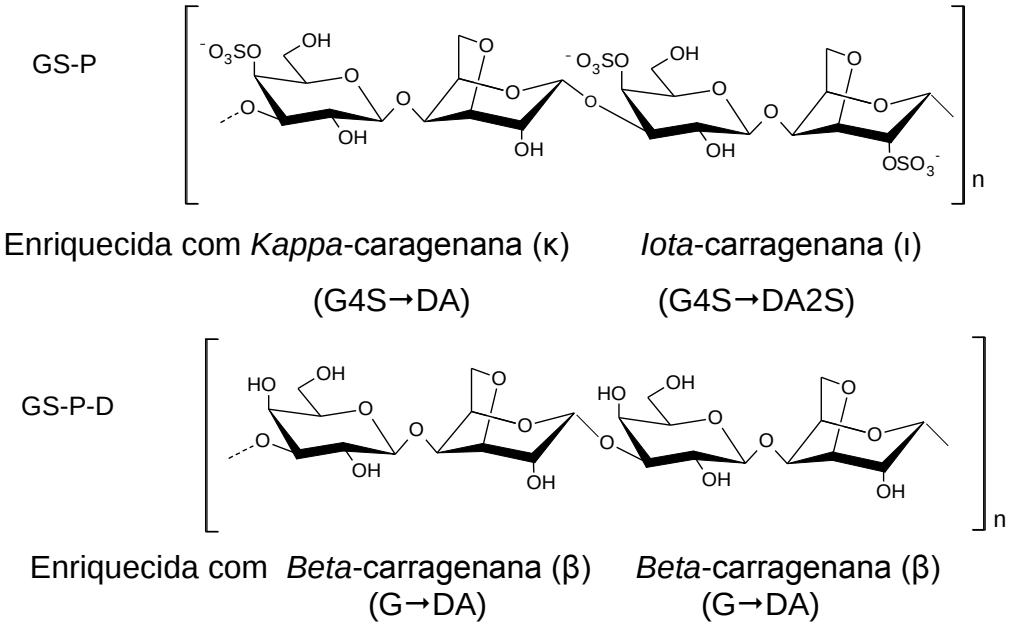


FIGURA 37a – ESQUEMA DAS CARRAGENANAS DE *G. skottsbergii* PRECIPITADAS EM KCl 2 M (GS-P) SEGUIDO DE DESSULFATAÇÃO SOLVOLÍTICA (GS-P-D)

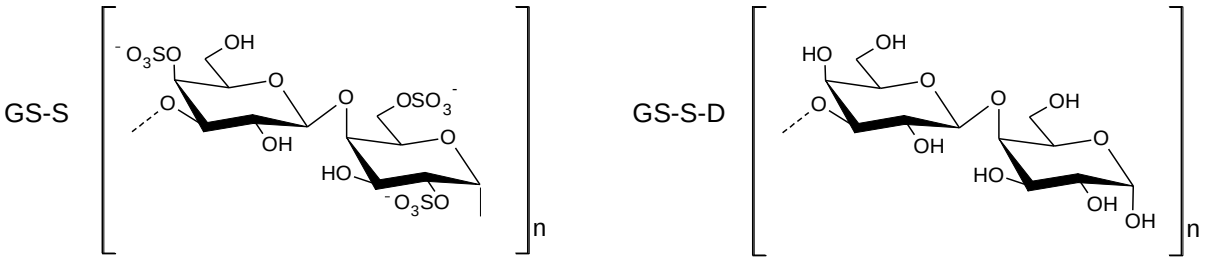


FIGURA 37b – ESQUEMA DAS CARRAGENANAS DE *G. skottsbergii* SOLÚVEIS EM KCl 2 M SEGUIDO DE DESSULFATAÇÃO SOLVOLÍTICA (GS-S-D)

Após o processo de remoção dos grupos sulfato, a fração GS-P, que era enriquecida com *Kappa* e *Iota*-carragenanas, deu origem à fração GS-P-D, enriquecida com díades de *Beta*-carragenana. A fração GS-S, enriquecida com *Nu*-carragenana, deu origem à fração GS-S-D que se mostrou enriquecida com díades parcialmente dessulfatadas e β-D-galactose ligadas a α-D-galactose.

6.2.5.1 Análises químicas das frações GS-P-D e GS-S-D

A fração GS-P-D mostrou um rendimento de 88,9% em relação a GS-P. Após dosagem de grupos sulfato pode-se verificar que houve dessulfatação de 77,0%, sendo que os polissacarídeos de GS-P apresentavam 38,2% de grupos sulfato e GS-P-D apresentou 8,8%.

A fração GS-S-D resultou em um rendimento de 72,7% e apresentou 61,2% de dessulfatação, a partir da fração GS-S, que continha 33,0% de sulfato e GS-S-D 12,8% (Tabela 14).

TABELA 14 – RENDIMENTO E PORCENTAGEM DE DESSULFATAÇÃO DAS FRAÇÕES GS-P-D E GS-S-D

Fração	Rendimento (%)[a]	Sulfato (%)[b]	Dessulfatação (%)[c]
GS-P-D	88,9	8,8	77,0
GS-S-D	72,7	12,8	61,2

[a] Rendimento em relação ao total de polissacarídeos recuperados após dessulfatação de GS-P e GS-S; [b] Determinação de acordo com o método de Dodgson, 1961; [c] Dessulfatação em relação às frações GS-P e GS-S.

6.2.5.2 Espectroscopia de RMN das frações GS-P-D e GS-S-D

Através dos espectros de RMN de ^{13}C da fração GS-P-D, quando comparada à fração GS-P, através da região anomérica (Figura 38), foi possível verificar que nos sinais correspondentes às díades de *Kappa*-carragenana (102,0-102,2 e 94,7-94,8 ppm) (CIANCIA *et al*., 1993a) apresentaram diminuição da intensidade no espectro de GS-P-D, correspondente a uma dessulfatação parcial

destas díades. Os grupos sulfato em C-4 das unidades de β-D-galactose 4-sulfato e em C-2 das unidades de α-D-3,6-anidrogalactose 2-sulfato, constituintes das díades de *Iota*-carragenana, foram substancialmente removidos, visto que houve desaparecimento dos sinais correspondentes a estas unidades (102,0 e 91,6 ppm, respectivamente) (CIANCIA *et al*., 1993a) na fração GS-P-D. Adicionalmente, a fração dessulfatada apresentou os sinais correspondentes a díades de *Beta*-carragenana (102,2 e 94,2 ppm) (VAN DE VELDE; PEREIRA; ROLLEMA, 2004), sendo parte destas provenientes da dessulfatação das díades de *Iota*-carragenana. Os sinais correspondentes às díades de *Nu*-carragenana (104,2 e 97,7 ppm) (CIANCIA *et al*., 1993a) são observadas na fração GS-P, esta quando dessulfatada mostrou redução da intensidade destes sinais em 104,3 e 97,8 ppm (GS-P-D), correspondendo a uma dessulfatação parcial destas díades. Quando dessulfatadas geram β-D-galactose ligada a α-D-galactose, podendo ser verificado através do aparecimento do sinal em 95,9 ppm na fração GS-P-D (USOV; YAROTSKY; SHASHKOV, 1980).

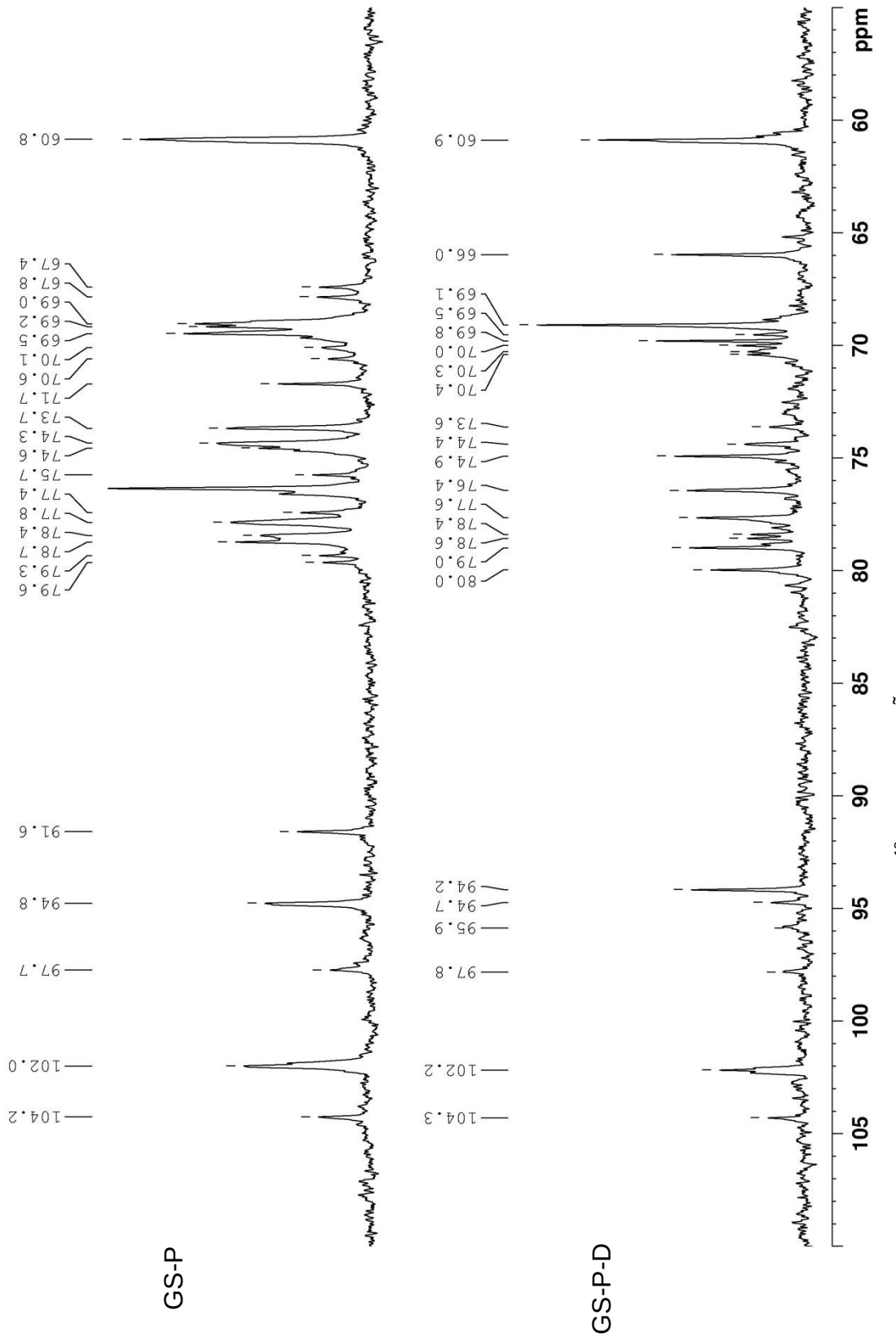
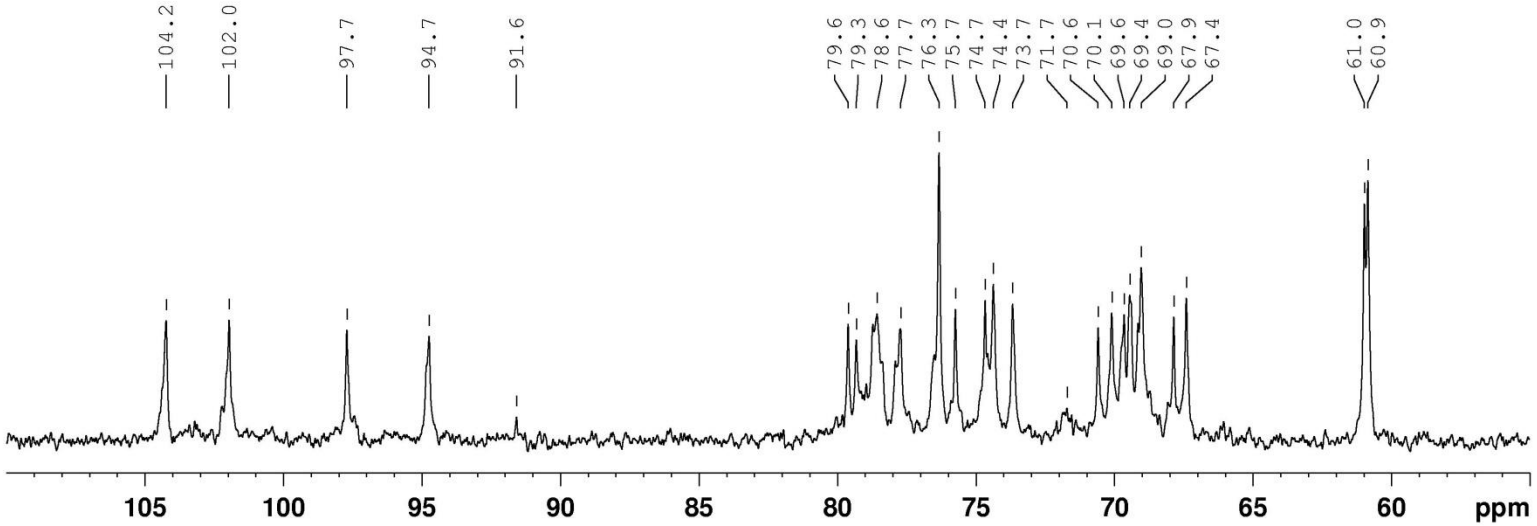


FIGURA 38 – ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DAS FRAÇÕES GS-P E GS-P-D

Nos espectros de GS-S e GS-S-D (Figura 39), os sinais correspondentes às unidades de β-D-galactose 4-sulfato e α-D-galactose 2,6-dissulfato, que constituem as díades de *Nu*-carragenana (104,2 e 97,7 ppm em GS-S) (CIANCIA *et al*., 1993a), tiveram uma diminuição da intensidade na fração GS-S-D. As díades dessulfatadas geram unidades β-D-galactose e α-D-galactose, constituintes da díade G→D, visualizada pelos sinais em 104,2 e 95,7 ppm (GS-S-D) (USOV; YAROTSKY; SHASHKOV, 1980). As díades de *Kappa*-carragenana dessulfataram parcialmente, este dado pôde ser verificado através dos sinais em 102,0 e 94,7 ppm no espectro de GS-S, os quais tiveram uma redução na intensidade na fração dessulfatada GS-S-D (102,2 e 94,7 ppm) (CIANCIA *et al*., 1993a). As díades de *Iota*-carragenana, correspondem aos sinais em 102,0 e 91,6 ppm (GS-S) (CIANCIA *et al*., 1993a). Após dessulfatação estes sinais desaparecem, isto indica que as díades de *Iota*-carragenana foram totalmente dessulfatadas e convertidas em *Beta*-carragenana (102,2 e 94,1 ppm em GS-S-D) (VAN DE VELDE; PEREIRA; ROLLEMA, 2004).

GS-S



GS-S-D

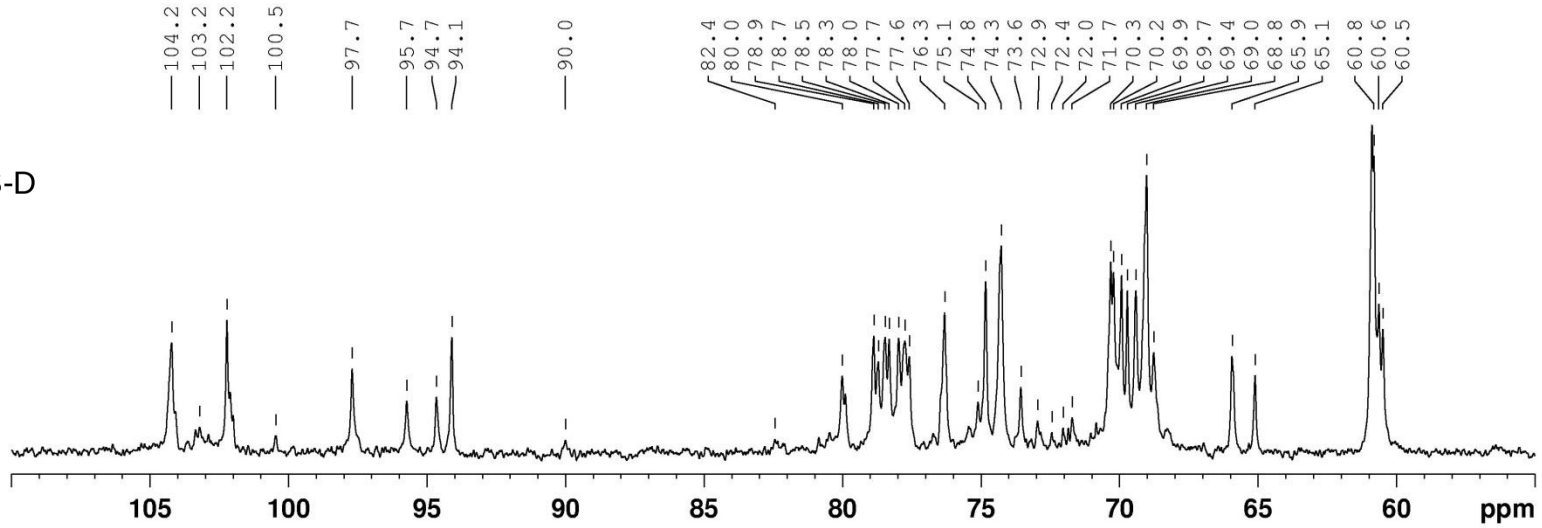


FIGURA 39 – ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DAS FRAÇÕES GS-S E GS-S-D

O espectro de RMN de ^{1}H, região α-anomérica, representa os sinais correspondentes ao H-1 das unidades B das frações GS-P e GS-S, comparados a suas frações dessulfatadas GS-P-D e GS-S-D, respectivamente.

Os espectros de GS-P e GS-S mostram o sinal em 5,10 ppm, correspondente a *Kappa*-carragenana. Este sinal nas frações dessulfatadas (GS-P-D e GS-S-D) corresponde a díades que não tiveram remoção de sulfato. *Iota*-carragenana corresponde ao sinal em 5,31 ppm (GS-P e GS-S) (CIANCIA *et al*., 1993a), pôde-se observar nos espectros de GS-P-D e GS-S-D o desaparecimento deste sinal que demonstra a remoção dos grupos sulfato nas unidades β-D-galactose 4-sulfato, correspondente ao aparecimento do sinal em 5,28-5,29 ppm de *Alfa*-carragenana (β-D-galactose ligada a α-D-3,6anidrogalactose 2-sulfato) (FALSHAW *et al*., 1996), bem como a remoção do sulfato nas unidades β-D-galactose 4-sulfato e α-D-anidrogalactose 2-sulfato, correspondente ao aparecimento do sinal em 5,08 ppm de *Beta*-carragenana (β-D-galactose ligada a α-D-3,6-anidrogalactose) (VAN DE VELDE; PEREIRA; ROLLEMA, 2004). O sinal em 5,24 ppm (GS-P e GS-S) corresponde a *Mu*-carragenana (CIANCIA *et al*., 1993a), que é totalmente dessulfatada, desaparecendo os sinais em GS-P-D e GS-S-D. *Nu*-carragenana (5,51 ppm) (CIANCIA *et al*., 1993a), quando dessulfatada na unidade α-D-galactose 2,6-dissulfato, corresponde ao aparecimento do sinal em 5,21-5,22 ppm de *Omicron*-carragenana (β-D-galactose 4-sulfato ligada a α-D-galactose 2-sulfato), quando *Nu*-carragenana é dessulfatada também na unidade β-D-galactose 4-sulfato, em 5,15 ppm observa-se o aparecimento do sinal de β-D-galactose ligada a α-D-galactose (ZIBETTI *et al*., 2009) (Figura 40).

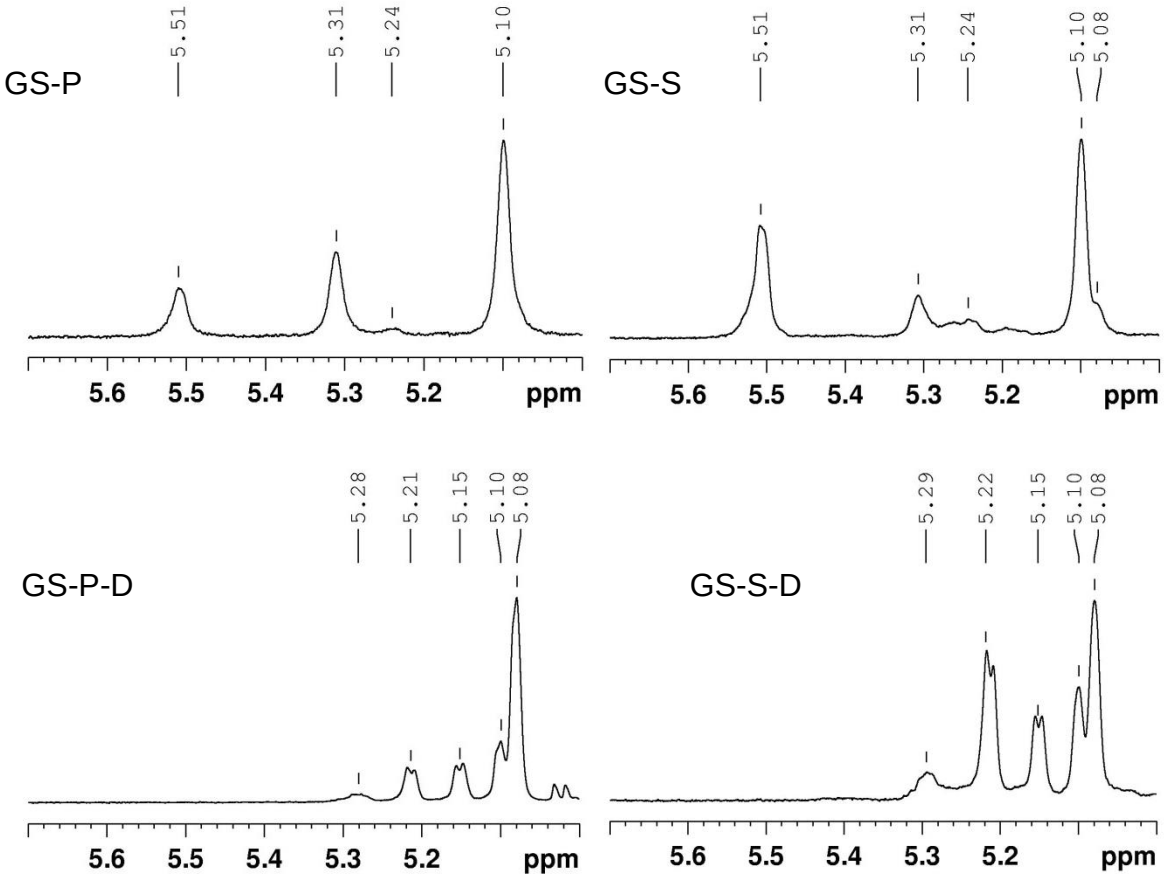


FIGURA 40 – ESPECTRO DE RMN DE ^{1}H DAS FRAÇÕES GS-P, GS-S, GS-P-D E GS-S-D

A composição monossacarídica das frações GS-P e GS-P-D foram semelhantes. A fração GS-P apresentou 59,2% de unidades de galactose (Gal) e 40,8% de unidades 3,6-anidrogalactose (AG) e a fração GS-P-D apresentou 62,5% de Gal e 37,5% de AG. As frações GS-S e GS-S-D também foram semelhantes, pois GS-S apresentou 69,6% de Gal e 30,4% de AG e GS-S-D apresentou 73,1% de Gal e 26,9% de AG. Estes resultados demonstram que o processo de dessulfatação não degradou as unidades 3,6-anidrogalactose (Tabela 15).

TABELA 15 – COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES GS-P-D E GS-S-D

Frações	1H RMN (%)[a]	
	Gal[b]	AG[c]
GS-P	59,2	40,8
GS-P-D	62,5	37,5
GS-S	69,6	30,4
GS-S-D	73,1	26,9

[a] Determinada a partir da integração da região α-anomérica do RMN de ^{1}H; [b] Gal = Galactose; [c] = 3,6-anidrogalactose.

A integração dos picos da região α-anomérica das unidades B no espectro de RMN de ^{1}H possibilitou a quantificação das díades que compõem as frações GS-P-D e GS-S-D.

A porcentagem de díades que apresentam 3,6-anidrogalactose e D-galactose na fração GS-P-D é de 75,0% e 25,0%, respectivamente. Estas unidades podem encontrar-se sulfatadas no C-2. A relação de díades AG e Gal nas unidades B que compõem a fração GS-P-D é de 1:0,3 (AG:Gal).

As díades *Kappa* e *Iota*-carragenana (GS-P) originaram *Beta*-carragenana (56,2%) e *Alfa*-carragenana (3,4%) em GS-P-D, observa-se a presença de 15,4% de *Kappa*-carragenana nesta fração. As díades *Nu* e *Mu*-carragenana originaram G→D (13,1%) e Omicron-carragenana (11,9%).

A fração GS-S-D apresenta 53,9% de díades que são constituídas por unidades 3,6-anidrogalactose e 46,1% por D-galactose. Podendo estas unidades apresentarem-se 2-sulfatadas. As díades AG e Gal que compõem a fração GS-S-D nas unidades B apresentam uma relação de 1:0,9 (AG:Gal).

As díades de *Mu* e *Nu*-carragenana, presentes na fração GS-S, quando dessulfatadas originaram as díades *Omicron*-carragenana (29,7%) e G→D (16,4%). *Kappa*-carragenana ainda encontra-se presente na fração GS-S-D (16,9%). A dessulfatação das díades de *Kappa* e *Iota*-carragenana, originaram as díades *Beta*-carragenana (27,7%) e Alfa-carragenana (9,3%).

6.2.6 Porcentagem de díades presentes nos polissacarídeos nativos e modificados quimicamente

A tabela 16 representa a porcentagem das díades, realizada através da integração da área dos picos no RMN de ^{1}H, presentes na fração GS, comparada a todas as modificações químicas realizadas no polissacarídeo nativo.

TABELA 16 – PORCENTAGEM DE DÍADES PRESENTES NOS POLISSACARÍDEOS NATIVOS DA FRAÇÃO GS, BEM COMO NAS MODIFICAÇÕES QUÍMICAS

H-1 da unidade B (ppm)	Tipo de carragenana	Díades	Fração (%)							
			GS	GS-D	GS-P	GS-S	GS-P-D	GS-S-D	GS-TA	GS-TA-D
5,08	*Beta*	G→DA	-	55,4	-	6,1	27,7	56,2	5,2	58,5
5,10	*Kappa*	G4S→DA	55,5	9,9	56,6	42,7	16,9	15,4	53,5	28,2
5,15		G→D	-	16,8	-	-	16,4	13,1	-	5,1
5,21	*Omicron*	G4S→D2S	-	12,6	-	-	29,7	11,9	-	4,9
5,25	*Mu*	G4S→D6S	2,9	-	2,7	5,2	-	-	4,4	-
5,28	*Alfa*	G→DA2S	-	5,3	-	-	9,3	3,4	-	3,3
5,31	*Iota*	G4S→DA2S	21,9	-	25,1	12,1	-	-	33,9	-
5,51	*Nu*	G4S→D2,6S	19,7	-	15,6	33,9	-	-	3,0	-

6.3 ESTUDOS BIOLÓGICOS *In vitro*

6.3.1 Ensaios de capacidade de ligação

Os ensaios de capacidade de ligação a bactérias enteropatogênicas foram realizados segundo as metodologias propostas por Becker *et al*., (2007) e Ganner *et al*., (2010), que tem por objetivo ensaios de quantificação da densidade óptica como parâmetro de crescimento e adesão bacteriana. O princípio dos testes foi baseado na relação inversa entre densidade celular inicial e o surgimento do crescimento: quanto maior o número de células que aderem, menor o tempo de detecção de crescimento. Quanto maior o número de ligações (bactérias aderidas), mais rápido é o crescimento, deste modo as bactérias entram mais cedo na fase exponencial de crescimento.

As etapas principais dos ensaios de capacidade de ligação são: incubação da solução das amostras (polissacarídeos); adição de BSA para bloqueio dos espaços não ocupados pelas amostras e a prevenção de ligações inespecíficas; incubação da bactéria em OD 0,01 e adição do meio de cultura para crescimento bacteriano, com posterior leitura das densidades ópticas.

Os testes foram realizados com a adição das amostras e dos controles em triplicata, sendo estes:

- Controle negativo de ligação: consistiu em poços bloqueados com BSA, adicionados da bactéria e meio de cultivo, sem que houvesse adição das amostras testadas, a fim de eliminar os sítios de ligação inespecífica. Espera-se um crescimento mais lento comparado às frações testadas;

- Controle de crescimento: consistiu da adição de suspensão bacteriana (*Salmonella* sp.) com OD 0,01, previamente bloqueados com BSA. Este controle possibilita acompanhar eventuais problemas durante o crescimento das bactérias;

- Branco das amostras: consiste em poços bloqueados com BSA, contendo a amostra a ser testada, sem a adição da bactéria, incluindo todas as etapas do teste, para que possam ser identificadas possíveis contaminações da amostra por outras bactérias;

- Controle do meio de cultura: consiste apenas da adição do meio de cultura, a fim de detectar possíveis contaminações;

- Controle comercial: consiste na adição do produto comercial BiMos®, incluindo todas as etapas do teste. É verificado o crescimento do controle comercial comparado às amostras testadas.

A concentração das amostras (1%) escolhida para realização dos ensaios é devida baixa afinidade de sacarídeos para lectinas bacterianas, deste modo a concentração de carboidratos requerida para inibição de adesão é alta, necessitando de uma maior concentração da amostra a ser testada (OFEK; HASTY; SHARON, 2003; RODRIGUES, 2012).

As placas utilizadas no teste apresentam superfície de poliestireno de alta ligação, o que possibilita a ligação de moléculas. Como as matrizes alternativas de adesão para o epitélio do intestino consistem principalmente de compostos glicosilados, as placas de poliestireno de alta ligação hidrofilizadas medeiam a ligação de produtos via ligações de hidrogênio (BECKER *et al*., 2007).

6.3.2 Curva de cresimento

Os dados de crescimento bacteriano obtidos através do leitor de microplacas resultam em curvas sigmoidais através de equações e suas derivadas, que analisam diferentes parâmetros. Através dos dados de crescimento da bactéria são verificados os parâmetros: A, que é a assíntota da densidade óptica na fase estacionária; B, tempo necessário para alcançar metade do rendimento máximo (tempo de meia-vida do parâmetro A); C, constante que determina a curva; t_{pi} é o tempo de coordenada ou ponto de inflexão da curva; t_{det} que é a determinação da fase lag aparente ou tempo de detecção e $t_{OD\ =\ 0,1}$ determinado como um segundo tempo de detecção, o qual representa o tempo no qual a OD_{690} de 0,1 foi obtida (Figura 41) (BECKER *et al*., 2007).

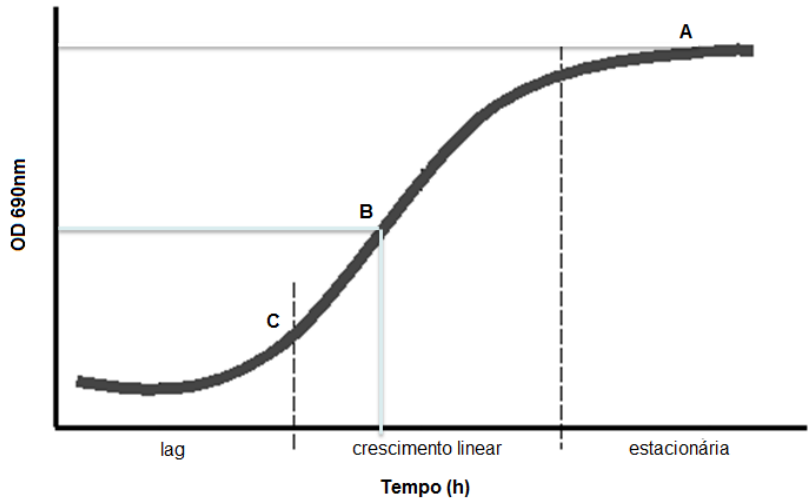


FIGURA 41 – CURVA SIGMOIDAL DE CRESCIMENTO BACTERIANO

O principal resultado utilizado para comparar as amostras é o $t_{OD=0,1}$, este parâmetro resulta de uma equação onde é verificado o crescimento da bactéria da OD 0,01 (OD da diluição da bactéria incubada na placa) até OD 0,1. Quanto menor o t_{OD}, maior a adesão da bactéria ao polissacarídeo.

6.3.3 Avaliação da capacidade de ligação de polissacarídeos a bactéria enteropatogênica *Salmonella typhimurium*

Galactanas de diferentes espécies de macroalgas marinhas foram avaliadas em testes de ligação (*in vitro*) à bactéria enteropatogênica *Salmonella typhimurium.* Este *screening* foi realizado com polissacarídeos estudados no laboratório de química de carboidratos de algas marinhas (UFPR), os quais apresentam estruturas químicas elucidadas. As amostras testadas foram comparadas ao produto comercial BioMos®. Na tabela 17 são apresentados os resultados do teste de ligação. Avaliando o t_{OD}, podemos comparar a capacidade de ligação dos diferentes tipos de polissacarídeos à bactéria, considerando que quanto menor o t_{OD}, maior a atividade, obtivemos apenas um tipo de polissacarídeo diferente estatisticamente, quando comparado ao controle comercial BioMos®, são estes, os polissacarídeos da alga *Gigartina skottsbergii*.

TABELA 17 – *SCREENING* DE POLISSACARÍDEOS DE DIFERENTES ESPÉCIES DE ALGAS NO TESTE DE CAPACIDADE DE LIGAÇÃO À *Salmonella entérica* sv. Typhimurium

Espécies de algas e produtos comerciais	Tipo de polissacarídeo	A (OD)[1]	B (h)[2]	C[3]	t_{det} (h)[4]	t_{pi} (h)[5]	$t_{OD=0,1}$ (h)[6]
Gigartina skottsbergii	*Kappa/Iota/ Mu/Nu*-carragenana	0,47 (±0,03)	6,10 (±0,42)	8,80 (±1,12)	4,43 (±0,48)	5,94 (±0,44)	5,26 (±0,39)[e]
Laurencia filiformis	Agaranas	0,44 (±0,05)	6,10 (±0,28)	9,87 (±3,19)	4,49 (±0,43)	5,95 (±0,28)	5,35 (±0,32)[b,e]
Eucheuma denticulatum	*Iota*-carragenana	0,45 (±0,02)	6,22 (±0,28)	8,82 (±1,43)	4,49 (±0,30)	6,05 (±0,27)	5,38 (±0,24)[b,e]
Kappaphycus alvarezii	*Kappa*-carragenana	0,46 (±0,04)	6,04 (±0,34)	11,87 (±3,83)	4,73 (±0,38)	5,94 (±0,33)	5,38 (±0,29)[b,e]
BioMos®	**β-glucanas e mananas**	**0,44 (±0,03)**	**6,46 (±0,31)**	**9,92 (±0,94)**	**4,86 (±0,15)**	**6,32 (±0,29)**	**5,71 (±0,21)[b,c,d]**
Gigartina skottsbergii	*Theta*-carragenana	0,44 (±0,02)	6,44 (±0,39)	15,86 (±4,31)	5,36 (±0,17)	6,38 (±0,34)	5,91 (±0,22)[a,d]
Porphyra spiralis	Agaranas	0,45 (±0,03)	6,46 (±0,42)	19,04 (±8,00)	5,40 (±0,23)	6,39 (±0,35)	5,93 (±0,13)[a,d]
Gigartina skottsbergii	*Lambda*-carragenana	0,47 (±0,05)	6,74 (±0,40)	10,61 (±2,42)	5,16 (±0,34)	6,61 (±0,38)	5,94 (±0,27)[a,c]
Laurencia aldingensis	Agaranas	0,45 (±0,02)	6,60 (±0,32)	14,42 (±9,63)	5,27 (±0,24)	6,50 (±0,27)	5,94 (±0,17)[a,c]
BSA		0,45 (±0,02)	6,67 (±0,23)	23,73 (±11,99)	5,86 (±0,34)	6,63 (±0,23)	6,27 (±0,27)[a]

[1] = representa o valor da assíntota da densidade óptica no estado estacionário; [2] = representa o tempo necessário para alcançar metade do rendimento máximo; [3] = é uma constante que determina a curva; [4] = é a determinação da fase lag aparente ou tempo de detecção; [5] = é o tempo correspondente ao ponto de inflexão da curva; [6] = determinado como um segundo tempo de detecção, representa o tempo em que OD_{690} de 0,1 foi obtida (BECKER *et al.*, 2007; GANNER *et al.*, 2010). BioMos®, controle comercial; BSA: controle de crescimento.[a-e] Valores médios dentro de uma coluna seguidos de letras diferentes indicam diferença significativa (Teste de *Tukey*: p<0,05); *Valores entre parênteses representam o desvio padrão de cada amostra.

Os polissacarídeos da alga *Gigartina skottsbergii* foram escolhidos para dar continuidade aos estudos. Esta alga é produzida em escala comercial, deste modo há uma facilidade de obtenção e seus polissacarídeos do tipo carragenanas apresentam uma estrutura regular e repetitiva, possibilitando a realização de modificações químicas. Estas modificações químicas visam determinar se há ou não um único padrão estrutural das carragenanas responsáveis pela atividade biológica em estudo (ARAÚJO *et al*., 2013; GELYMAR, 2014).

Os resultados dos testes de ligação das carragenanas obtidas de *G. skottsbergii*, nativas e modificadas quimicamente estão apresentados na Tabela 18.

TABELA 18 – POLISSACARÍDEO NATIVO E QUIMICAMENTE MODIFICADO PARA TESTE DE CAPACIDADE DE LIGAÇÃO A BACTÉRIAS ENTEROPATOGÊNICAS

Fração	A (OD)[1]	B (h)[2]	C[3]	t_{det} (h)[4]	t_{pi} (h)[5]	$t_{OD=0,1}$ (h)[6]
GS	0,48 (±0,01)^{b,c}	7,05 (±0,21)$^{b-c}$	12,09 (±0,96)^{a,c}	5,64 (±0,22)^{b,c}	6,95 (±0,25)$^{b-c}$	6,31 (±0,25)^{b,c}
GS-D	0,48 (<0,01)^{b}	7,05 (±0,19)^{c}	12,69 (±0,93)$^{a-c}$	5,72 (±0,20)^{c,g}	6,97 (±0,23)^{c}	6,34 (±0,20)^{c,g}
GS-TA	0,49 (±0,01)^{b}	7,10 (±0,29)^{c}	12,19 (±1,08)^{a,c}	5,69 (±0,28)^{c,i}	7,00 (±0,24)^{c}	6,34 (±0,25)^{c,i}
GS-P-D	0,48 (±0,01)^{b}	7,15 (±0,30)$^{b-c,e}$	12,34 (±0,61)^{a,c}	5,76 (±0,30)$^{b-c,h}$	7,06 (±0,25)$^{b-c,e}$	6,41 (±0,25)^{b,c,h}
GS-S-D	0,49 (±0,02)^{b}	7,32 (±0,29)^{d,e}	11,99 (±1,49)^{c}	5,85 (±0,28)$^{e-i}$	7,22 (±0,23)^{d,e}	6,53 (±0,22)$^{e-i}$
GS-S	0,47 (<0,01)^{b,c}	7,35 (±0,22)^{d}	13,53 (±0,99)^{a,d}	6,04 (±0,22)$^{d-e}$	7,27 (±0,26)^{d}	6,67 (±0,24)^{d,e}
GS-TA-D	0,46 (<0,01)^{c}	7,31 (±0,26)^{d,e}	13,84 (±0,90)^{b,d}	6,02 (±0,26)^{d,f}	7,24 (±0,24)^{d,e}	6,67 (±0,25)^{d,f}
MOS	**0,48 (±0,02)^{b}**	**7,41 (±0,37)^{d}**	**12,76 (±0,94)$^{a-c}$**	**6,01 (±0,37)^{d,f}**	**7,32 (±0,38)^{d}**	**6,68 (±0,35)^{d,f}**
GS-P	0,48 (±0,02)^{b}	7,48 (±0,28)^{d}	12,62 (±0,82)$^{a-c}$	6,06 (±0,27)^{d,e}	7,39 (±0,25)^{d}	6,73 (±0,26)^{d}
BSA	0,52 (±0,02)^{a}	8,12 (±0,24)^{a}	12,70 (±0,89)$^{a-c}$	6,61 (±0,25)^{a}	8,02 (±0,26)^{a}	7,25 (±0,22)^{a}

[1] = representa o valor da assíntota da densidade óptica no estado estacionário; [2] = representa o tempo necessário para alcançar metade do rendimento máximo; [3] = é uma constante que determina a curva; [4] = é a determinação da fase lag aparente ou tempo de detecção; [5] = é o tempo correspondente ao ponto de inflexão da curva; [6] = determinado como um segundo tempo de detecção, representa o tempo em que OD_{690} de 0,1 foi obtida (BECKER *et al.*, 2007; GANNER *et al.*, 2010). GS: polissacarídeos nativos; GS-P, GS-S: polissacarídeos precipitados e solúveis em KCl, respectivamente; GS-TA: polissacarídeo com tratamento alcalino; GS-D, GS-P-D, GS-S-D, GS-TA-D: polissacarídeos modificados quimicamente e dessulfatados; MOS: BioMos®, controle comercial; BSA: controle de crescimento.

[a-i] Valores médios dentro de uma coluna seguidos de letras diferentes indicam diferença significativa (Teste de *Tukey*: p<0,05); *Valores entre parênteses representam o desvio padrão de cada amostra.

A fração GS e seus produtos quimicamente modificados apresentaram elevada capacidade de ligação à enterobactéria *S. typhimurium*, como observado

pelos resultados de t_{OD} destas frações quando comparadas ao controle comercial BioMos®. Os valores de t_{OD} para as frações GS, GS-D, GS-TA e GS-P-D foram estatisticamente semelhantes entre si, mas inferiores ao t_{OD} para o BioMos®. Este resultado demonstra que estas frações polissacarídicas apresentam capacidade de ligação à *S. tiphymurium* superior à do BioMos®. As frações GS-S-D, GS-S, GS-TA-D e GS-P, bem como o BioMos, apresentaram valores de t_{OD} estatisticamente semelhantes entre si. Deste modo pode-se observar que tanto a fração GS como seus produtos modificados quimicamente são compostos com potencial igual ou superior ao BioMos® e portanto podem representar uma alternativa e/ou uso conjunto com o produto comercial.

Lindhost, Kieburg, Wenzel (1998), Wilson *et al*. (2002) e Moran, 2014, sugerem que lectinas presentes nas fímbrias do tipo I de *Salmonella* spp. são manose específicas. Deste modo as unidades de manose constituintes das mananas presentes no produto BioMos® seriam um alvo de ligacão da bactéria ao polissacarídeo. Destaca-s, no entanto, que outros tipos estruturais de polissacarídeos também são alvo de ligação de bactérias enteropatogênicas como as glucanas obtidas da microalga *Pavlova gyrans*, as quais apresentaram alta atividade na capacidade de ligação à bactéria enteropatogênica *Salmonella* sp. (MACHADO, 2012).

Considerando que tanto a fração GS contendo carragenanas nativas, bem como seus produtos modificados quimicamente apresentaram atividade, é possível sugerir que outros tipos de lectinas presentes na superfície bacteriana sejam responsáveis pela atividade destas carragenanas.

Infecções por *Salmonella enterica* requer adesão a várias superfícies celulares do hospedeiro, e um largo número de estruturas adesivas podem ser encontradas. Dependedo do sorotipo de *S. enterica*, genes para vários tipos de adesinas fimbriais já foram identificados (WAGNER; HENSEL, 2011).

Portanto a partir dos resultados obtidos algumas considerações são propostas:

1-As frações GS-P e GS-S (provenientes do fracionamento de GS com KCl) apresentaram menor atividade que GS indicando um possível sinergismo;

2- Tanto as carragenanas nativas como as modificadas quimicamente, seja por dessulfatação solvolítica ou tratamento alcalino, apresentam díades constituídas pela unidade B sulfatada em C-2 (DA2S, D2,6S e/ou D2S). A presença de grupos

sulfato em C-2 nas unidades de 3,6-anidro-α-D-galactose constituindo as díades de *Iota*-carragenana (33,9-12,1%) e de *Alfa*- carragenanas (3,3-9,3%) e em C-2 das unidades α-D-galactose constituindo as díades de *Nu*-carragenana (33,9-3,0 %) e *Omicron*-carragenana (29,7-4,9%) podem ser um dos importantes fatores estruturais nas carragenanas de *G. skottsbergii* que são responsáveis pela adesão ao enteropatógeno *S. tiphymurium;*

3- A presença de sulfato em C-4 nas unidades A, pode ser um fator importante na capacidade de ligação, sendo que, duas das frações que demonstraram bons resultados quando comparadas ao produto comercial, são compostas pelas díades de *Kappa*-carragenana (G4S→DA) e *Iota*-carragenana (G4S→DA2S). A fração GS é composta por 55,5% de *Kappa* e 21,9% de *Iota*-carragenana e a fração GS-TA é composta por 53,5% de *Kappa* e 33,9% de *Iota*-carragenana;

4- A presença de grupos sulfato em C-6 não é um fator essencial para o desempenho da atividade, desde que a fração gerada após tratamento alcalino apresenta alta atividade;

5- As carragenanas de *G. skottsbergii* representam uma alternativa como agentes anti-adesão da bactéria *S. tiphymurium* e é menos provável que ocasione a propagação e difusão de estirpes resistentes, quando comparado ao uso (indesejável) de antibióticos na profilaxia de infecções ocasionadas por enterropatógenos (OFEK; HASTY; SHARON, 2003);

6- Os resultados obtidos no presente trabalho demonstram que as caragenanas nativas apresentam alta atividade e que para um possível produto industrial não seria necessário realizar modificações químicas para que ocorra a adesão de *S. tiphymurium*. No entanto, vale a pena destacar que sem estes tratamentos químicos, possíveis delineamentos sobre a relação atividade e estrutura não poderiam ter sido realizados. Além disto, como os mecanismos de ação não foram investigados não se pode afirmar se as carragenanas nativas e modificadas quimicamente estão atuando através de um único ou de múltiplos mecanismos de ação;

7- A presença de unidades anidrogalactosidicas não sulfatadas (G→DA, G4S→DA) ou α-D-galactose não sulfatada (G→D) podem gerar regiões mais hidrofóbicas quando comparadas a díades sulfatadas. A interação das carragenanas de *G. skottsbergii* nativas e/ou modificadas quimicamente com *S. tiphymurium* pode

também requerer a presença destes tipos de unidades. A presença de grupos sulfato em posições específicas juntamente com regiões mais hidrofóbicas, podem ser fatores conjuntos responsáveis pela alta atividade das carragenanas investigadas no presente trabalho. Além disto, a massa molecular destes polímeros também pode ter influencia sobre a atividade.

Considerando ainda que o uso de polissacarídeos sulfatados pode estimular o sistema imune não específico dos organismos tratados (GUZMAN-MURILLO; ASCENCIO, 2000) a utilização das carragenanas investigadas no presente trabalho poderiam ter um efeito benéfico adicional quando usada como agente anti-adesão contra enterobactérias.

7.1 CARACTERIZAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS DA ALGA *Chondria littoralis*

Devida grande utilização de algas marinhas em diversos ramos da indústria, como alimentícia, de cosméticos, farmacêutica, para microbiologia e biotecnologia (WIJESEKARA; PANGESTUTI; KIM, 2011; WIJESINGHE; JEON, 2012), é de grande interesse o estudo destes organismos.

As algas também produzem compostos biologicamente ativos, dentre estes, podemos destacar os polissacarídeos, que apresentam significativa variabilidade de atividades biológicas, sendo que as atividades dos polissacarídeos das macroalgas marinhas dependem da estrutura química (MEISSEN *et al*., 2009). Deste modo, o conhecimento da estrutura química fina dos polissacarídeos é impressíndível para que possa estabelecer possíveis correlações entre estrutura química e atividade biológica. Neste trabalho estudou-se a estrutura química da alga vermelha *Chondria littoralis*.

7.1.1 Extração das galactanas sulfatadas de *Chondria littoralis*

Exemplares de *C. littoralis*, secos e moídos, foram submetidos a extrações aquosas (1,0 % p/v) sob agitação mecânica, a 25 °C por 3 horas. O resíduo obtido

após esta etapa foi submetido a extração aquosa a 80 °C nas mesmas condições descritas acima. Os extratos obtidos foram centrifugados (8.000 rpm, por 20 min., 4 °C). Aos sobrenadantes foram adicionados 3 volumes de etanol absoluto, para precipitação dos polissacarídeos. Os polissacarídeos precipitados foram ressolubilizados em água, dialisados contra água destilada e liofilizados.

Os processos de extração a 25 °C e 80 °C foram realizados três vezes em cada temperatura, as três frações originadas foram reunidas e denominadas CF (8,3% de rendimento) e CQ (16,4% de rendimento), obtidas das extrações de 25 ºC e 80 ºC, respectivamente (Figura 42).

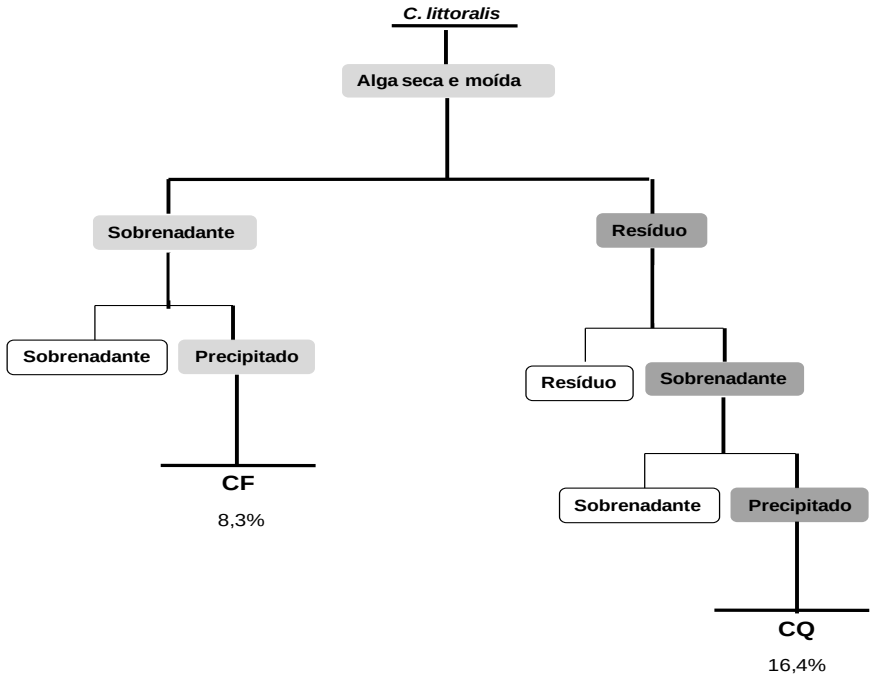


FIGURA 42 – EXTRAÇÃO AQUOSA A 25 °C e 80 °C DA ALGA *Chondria littoralis*

7.2 TRATAMENTO COM KCl 2 M DAS FRAÇÕES CF E CQ

Análises químicas e espectroscópicas (dados não mostrados) demonstraram que os polissacarídeos obtidos das extrações aquosas CF (421,2 mg) e CQ (834,0 mg) eram semelhantes, deste modo foram reunidas originando a fração CL. Esta fração foi ressolubilizada em água (0,25 % p/v) e em seguida foi adicionado KCl sólido de modo a formar solução 2 M. Após agitação por 2 horas, a solução

permaneceu em repouso por 12 horas a 4 °C e em seguida foi centrifugada (8.000 rpm, 20 min., 4 °C). O sobrenadante teve seu volume reduzido por evaporação a 60 °C sob pressão reduzida, para posterior diálise contra água destilada e liofilização. O precipitado, após ressolubilização em água destilada, foi também dialisado contra água destilada e liofilizado (Figura 43).

Após o tratamento com KCl 2 M foram originadas a fração solúvel (CLs, 64,8% de rendimento) e precipitada (CLp, 9,6% de rendimento) em KCl 2 M.

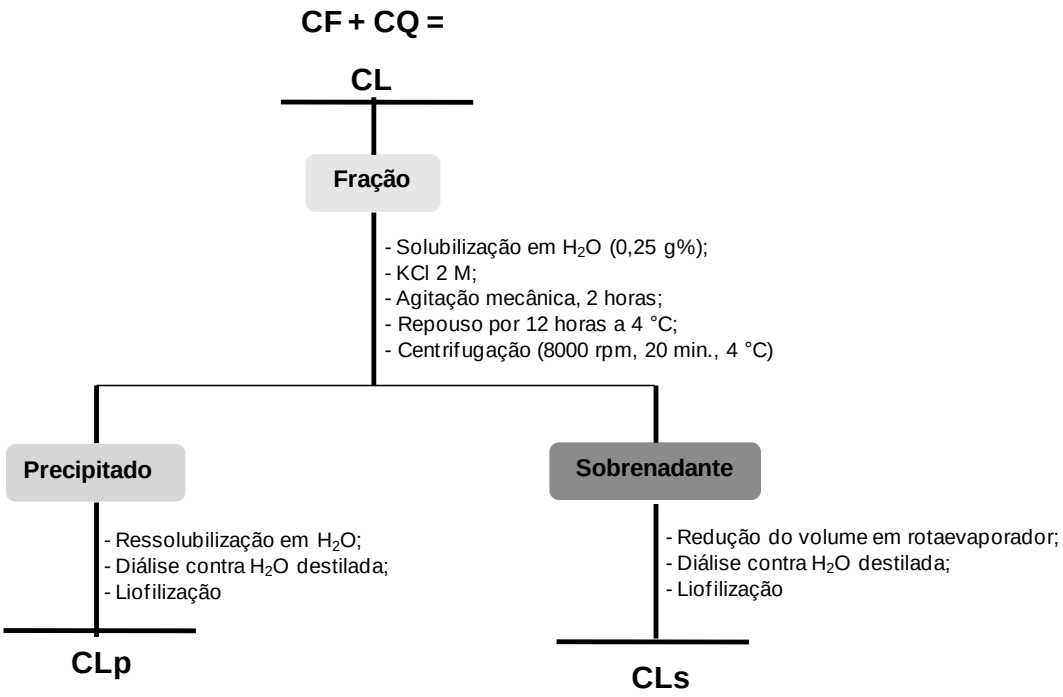


FIGURA 43 – TRATAMENTO COM KCl DA FRAÇÃO CL, RESULTANTE DA UNIÃO DA FRAÇÃO CF E CQ

A fração de maior rendimento (CLs) foi submetida ao processo de purificação por cromatografia de troca iônica em DEAE-Sephacel, para obtenção de moléculas puras que auxiliem na elucidação da estrutura do polissacarídeo.

7.2.1 Fracionamento de CLs por cromatografia de troca iônica em DEAE-Sephacel

A fração CLs foi submetida ao fracionamento por cromatografia de troca iônica em coluna contendo DEAE-Sephacel.

Antes do fracionamento do polissacarídeo a coluna foi eluída com água destilada. Em seguida foram adicionadas concentrações crescentes de cloreto de sódio (NaCl), variando entre 0,25 a 2 M, sendo os conteúdos eluídos monitorados por teste de fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS *et al*., 1956).

Após o fracionamento de CLs as amostras recuperadas, após evaporação à pressão reduzida e diálise em água destilada, foram liofilizadas e as frações de maior rendimento foram denominadas CL-1, CL-2, CL-3 e CL-4. O rendimento destas frações foram CL-1 (10,0%), CL-2 (55,0%), CL-3 (20,0%) e CL-4 (4,0%), as quais foram eluídas nas concentrações de 0,25 M, 0,5 M, 0,75 M e 2,0 M de NaCl, respectivamente (Tabela 19).

TABELA 19 – FRACIONAMENTO DA FRAÇÃO CLs (POLISSACARÍDEOS SOLÚVEIS EM KCl) POR CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA

Eluente	Fração[a]	Rendimento (%)[b]
NaCl 0,25 M	CL-1	10,0
NaCl 0,5 M	CL-2	55,0
NaCl 0,75 M	CL-3	20,0
NaCl 2 M	CL-4	4,0

[a] Frações obtidas a partir do fracionamento de CLs em cromatografia de troca iônica; [b] Rendimentos calculados em relação a fração CLs.

7.2.2 Caracterização química das subfrações obtidas a partir de CLs por cromatografia de troca iônica

Foi realizada a caracterização química das subfrações de maior rendimento obtidas a partir da purificação de CLs por cromatografia de troca iônica (Tabela 20).

Os polissacarídeos destas subfrações (CL-1 a CL-3) são constituídos majoritariamente por carboidratos, variando de 32,7% a 62,9%, com baixas quantidades de proteínas, de 2,7% a 7,9%.

As porcentagens de sulfato variaram acompanhando a concentração em que foram eluídas com NaCl, sendo que as menores concentrações do eluente apresentam menores quantidades de sulfato, crescentemente as maiores concentrações do eluente apresentaram as maiores porcentagens de sulfato, o qual variou de 5,6 a 17,5%.

Todas as amostras apresentaram rotação óptica ($[\alpha]_D$) negativa (-14,4° a -41,9°), os quais indicam que essas galactanas são do tipo agaranas. Galactanas do tipo carragenanas apresentam valores de rotação óptica positivos.

TABELA 20 – CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DAS SUBFRAÇÕES DE CLs OBTIDAS POR CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA

Fração	Carboidrato (%)[a]	Sulfato (%)[b]	Proteína (%)[c]	$[\alpha]_D$(°)[d]
CL-1	32,7	5,6	7,9	-24,3
CL-2	62,9	12,6	2,7	-41,9
CL-3	55,7	17,5	4,5	-14,4

[a,b,c] Determinações de acordo com os métodos de Dubois *et al*. (1956), Dodgson (1961) e Lowry *et al*. (1951), respectivamente; [d] Rotação óptica específica, determinada a 25 °C em soluções aquosas 0,2% (p/v).

7.2.3 Composição monossacarídica das subfrações obtidas a partir de CLs por cromatografia de troca iônica

A análise de composição monossacarídica foi realizada por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa, visando análise quantitativa dos acetatos de alditol (SLONEKER, 1972). A tabela 21 mostra a composição monossacarídica das subfrações obtidas após fracionamento de CLs.

Todas as subfrações apresentaram galactose como principal monossacarídeo (38,9 a 65,3%), seguido de seu derivado 6-*O*-metil-galactose (6,8 a 17,3%), 3,6-anidrogalactose (6,7 a 10,0%) e xilose (5,1 a 20,4%). Em menores porcentagens é observada também a presença de 2-*O*-metil-galactose (7,5 a 8,0%), 2-*O*-metil-3,6-anidrogalactose (2,1 a 7,6%).

Nas frações CL-1 e CL-3 observa-se a presença dos monossacarídeos manose (14,1% e 1,9%, respectivamente) e glucose (6,5 e 1,9%, respectivamente). A presença de manose pode indicar a presença de xilomananas sulfatadas (CARDOSO *et al*., 2007), enquanto a presença de glucose pode ser atribuída ao amido das florídeas, que é o polissacarídeo de reserva das algas vermelhas (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2007) (Tabela 21).

TABELA 21 – COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS SUBFRAÇÕES DE CLs (SOLÚVEIS EM KCl 2 M) POR CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA

Monossacarídeo [a]	Frações (mol%)		
	CL-1	CL-2	CL-3
2-Me-AG[b]	3,3	7,6	2,1
3,6-AG	10,0	6,7	7,3
Gal	38,9	55,8	65,3
6-Me-Gal	6,8	17,3	8,0
2-Me-Gal	-	7,5	8,0
Xyl	20,4	5,1	5,6
Glc	6,5	-	1,9
Man	14,1	-	1,9

[a] = Monossacarídeos analisados por CG-EM na forma de acetatos de alditóis de acordo com o método de Jol *et al*. (1999); [b] 2-Me-AG = 2-*O*-metil-3,6-anidrogalactose, 3,6-AG = 3,6-anidrogalactose, Gal = galactose, 6-Me-Gal = 6-*O*-metil-galactose, 2-Me-Gal = 2-*O*-metil-galactose, Xyl = xilose; Glc = glucose, Man = manose.

A fração de maior rendimento (CL-2) apresentou-se constituída principalmente por galactose (55,8%) além de menores percentagens de 6-*O*-metil-galactose (17,3%), 2-*O*-metil-3,6-anidrogalactose (7,6%), 2-*O*-metil-galactose (7,5%) 3,6-anidrogalactose (6,7%), xilose (5,1%) e livre de glucose e manose. Esta fração foi selecionada para dar continuidade aos estudos de estrutura química fina das galactanas sulfatadas produzidas por *C. littoralis.*

7.2.4 Análise de massa molecular por HPSEC-MALLS-RID da subfração CL-2 obtida por cromatografia de troca iônica

A fração CL-2 (55,0% de rendimento), obtida por fracionamento de CLs através de cromatografia de troca iônica e eluída com NaCl 0,5 M, foi submetida à análise de homogeneidade por HPSEC-MALLS-RID (Figura 44).

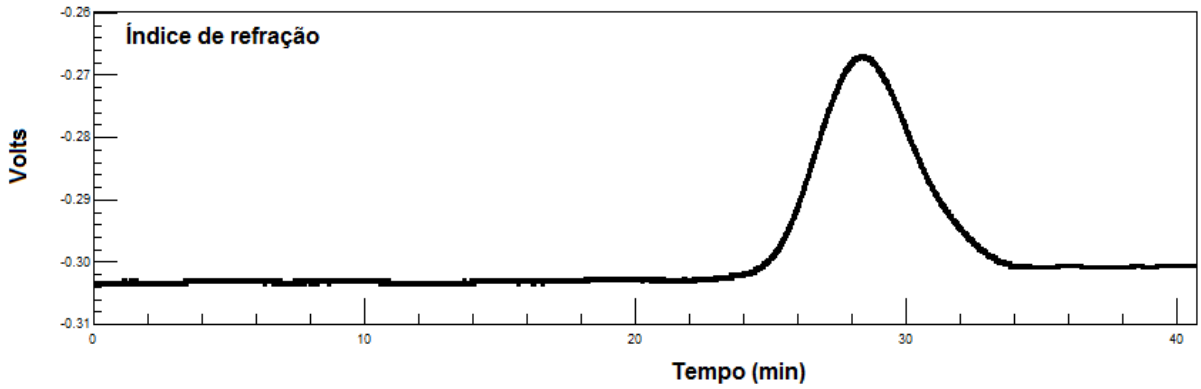


FIGURA 44 – CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO ESTÉRICA DE ALTA PERFORMANCE (HPSEC-MALLS-RID) DA FRAÇÃO CL-2

A fração CL-2 apresenta um perfil homogêneo pelo detector de índice de refração. A determinação da massa molecular média para esta fração foi de 304 kDa (*dn/dc* = 0,0873).

7.2.5 Dessulfatação solvolítica da fração CL-2

A dessulfatação solvolítica foi conduzida pelo método de Nagasawa, Inoue, Tokuyasu (1979). Este método foi realizado com o objetivo de determinação da posição dos grupos sulfato no polissacarídeo original, o qual foi realizado de modo parcial por análises de RMN.

Este procedimento gerou a fração dessulfatada CL-2-D, que apresentou um rendimento de 78,5%, em relação a CL-2. Após a dosagem de grupos sulfato, foi possível verificar que houve uma taxa de dessulfatação de 63,5%, visto que o teor de sulfato da fração nativa CL-2 foi de 12,6%, enquanto a fração dessulfatada CL-2-D, apresentou 4,6% de sulfatação.

A análise de composição monossacarídica da fração dessulfatada CL-2-D demonstrou que o processo de dessulfatação solvolítica não ocasionou degradação significativa no polissacarídeo (Tabela 22).

TABELA 22 – COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS GALACTANAS DA FRAÇÃO NATIVA (CL-2) E DESSULFATADA (CL-2-D)

Monossacarídeo [a]	Frações (mol%)	
	CL-2	CL-2-D
2-Me-AG[b]	7,6	5,0
3,6-AG	6,7	4,9
Gal	55,8	57,1
6-Me-Gal	17,3	15,6
2-Me-Gal	7,5	8,7
Xyl	5,1	8,6
Glc	-	-
Man	-	-

[a] = Monossacarídeos analisados por CG-EM na forma de acetatos de alditóis de acordo com o método de Jol *et al*. (1999); [b] 2-Me-AG = 2-*O*-metil-3,6-anidrogalactose, 3,6-AG = 3,6-anidrogalactose, Gal = galactose, 6-Me-Gal = 6-*O*-metil-galactose, 2-Me-Gal = 2-*O*-metil-galactose, Xyl = xilose; Glc = glucose, Man = manose.

7.2.6 Espectroscopia de RMN das frações CL-2 e CL-2-D

O espectro de RMN de ^{13}C da fração CL-2 (Figura 45) se mostrou complexo e com sinais alargados, devido à sobreposição de sinais. O espectro da fração dessulfatada CL-2-D (Figura 45) apresentou uma melhor definição dos sinais quando comparado à fração nativa, mas também apresenta grande número de sinais, indicando a complexidade estrutural das galactanas sulfatadas presentes nesta fração. Nos espectros de RMN de ^{13}C da fração nativa (CL-2) e dessulfatada (CL-2-D) são observados os sinais em 25,1-25,2 ppm correspondentes ao grupo metil de ácido pirúvico e sinais em 56,4-58,6 ppm, correspondentes a grupos metil presentes nas unidades de galactose ou 3,6-anidro-galactose. Na região anomérica do espectro de CL-2 são observados sinais que podem ser atribuídos às díades G(P)(6S)(6R)(6M)→LA em 101,7-102,2 ppm e 97,8-98,0 ppm, respectivamente, G(P)(6S)(6R)(6M)→LA2M 102,7 e 98,2 ppm, respectivamente. O sinal em 103,2 ppm foi atribuído a unidades de G(P)(6S)(6R)(6M), ligadas a unidades de L(3R)(3S) (100,6 ppm), sendo que este último sinal pode ser atribuído também a unidades de β-D-galactose-2 sulfato. O sinal em 101,1 ppm foi atribuido ao C-1 de unidades de β-D-xilose ligadas ao C-3 das unidades de α-L-galactose (USOV; ELASHVILI, 1991; FERREIRA *et al*., 2012). Após dessulfatação na região anomérica do espectro de ^{13}C da fração CL-2-D foram observados sinais correspondentes às díades

G(P)(6R)(6M)→LA (102,8 e 97,8 ppm,respectivamente), G(P)(6R)(6M)→LA2M (102,8 e 98,3 ppm, respectivamente), G(P)(6R)(6M)→L (103,1 e 100,5 ppm, respectivamente). Devido a melhor definição, no espectro da fração dessulfatada (CL-2-D) foi possível observar o grupo de sinais centrado em 176,4 ppm, correspondente a carboxila de ácido pirúvico, bem como os sinais em 104,6 e 103,8 ppm, que podem ser atribuídos a unidades de xilose e/ou galactose, que estão presentes no C-6 de unidades de β-D-galactose (USOV; BILAN; SHASHKOV, 1997, FERREIRA *et al*., 2012). Tanto no espectro de RMN-DEPT da fração nativa quanto da dessulfatada (dados não mostrados) foram observados os seguintes sinais invertidos: 60,8-61,2; 64,8; 65,1; 67,0; 69,0 e 71,3-71,6 ppm, correspondentes a C-6 de galactose, C-6 de acetal de ácido pirúvico, C-5 de xilose, C-6 de galactose 6 sulfato, C-6 de 3,6-anidro-α-L-galactose, C-6 de galactose 6-*O*-metil, respectivamente.

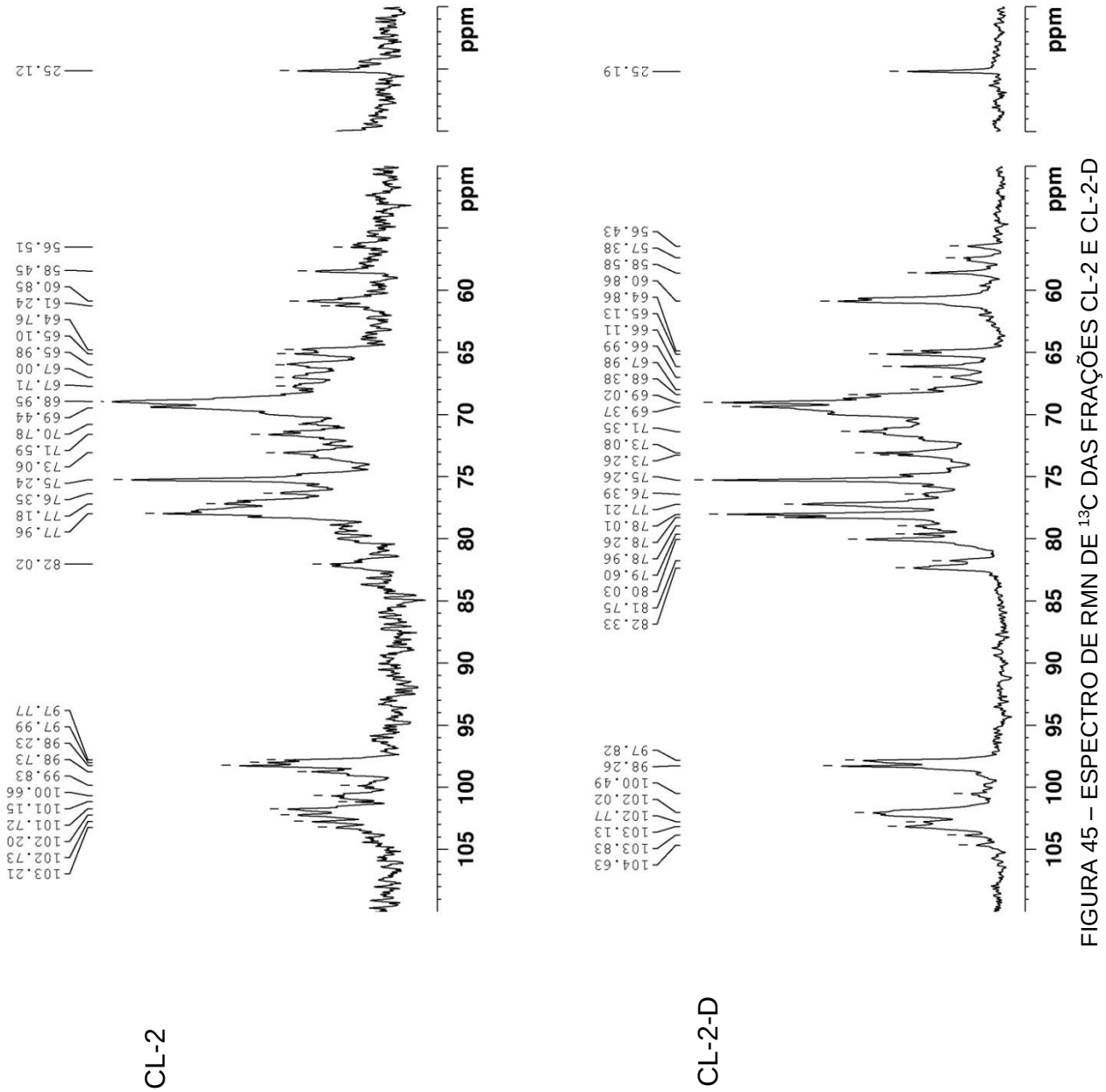


FIGURA 45 – ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DAS FRAÇÕES CL-2 E CL-2-D

Os resultados obtidos no presente trabalho permitem definir que *C. littoralis* sintetiza galactanas dessulfatadas do tipo agaranas. A fração homogênea por HPSEC apresentando massa molecular de 304 kDa é parcialmente piruvatada e constituída principalmente por unidade de β-D-galactose 2-sulfato ligadas a unidades de 3,6-anidrogalactose ou seu derivado naturalmente metilado em C-2.

CONCLUSÕES

Diferentes modificações químicas nas carragenanas sulfatadas de *Gigartina skottsbergii*, resultaram em sete frações, com diferentes porcentagens de díades de carragenanas ou tipos de polissacarídeos distintos.

Os polissacarídeos nativos e quimicamente modificados testados quanto à capacidade de ligação à *Salmonella typhimurium* apresentaram elevada capacidade de adesão.

As frações GS, GS-D, GS-P-D e GS-TA foram semelhantes entre si. A capacidade de ligação destas frações à bactéria foi estatisticamente maior do que o produto comercial BioMos®.

As demais frações (GS-TA-D, GS-P, GS-S e GS-S-D) foram estatisticamente semelhantes entre si e ao produto comercial.

Através destes resultados é possível observar, que algumas características dos polissacarídeos podem auxiliar na adesão da bactéria: a unidade A sulfatada em C-4 ou a unidade B sulfatada em C-2 podem ser responsáveis pela adesão; a interação das carragenanas com a bactéria pode requerer a presença de unidades anidrogalactosídicas não sulfatadas ou α-D-galactose não sulfatadas; a presença de grupos sulfato em posições específicas juntamente com regiões mais hidrofóbicas, podem ser conjuntamente responsáveis pela atividade de adesão.

Todas as frações representam uma alternativa para uso isolado ou conjunto com o produto comercial que poderia evitar infecções causadas por *S. typhimurium*. Sendo que as carragenanas nativas analisadas não necessitam de modificações químicas para compor um produto com potencial anti-adesão.

A alga *Chondria littoralis* sintetiza galactanas do tipo agaranas.

A fração de maior rendimento (CL-2) é constituída majoritariamente por carboidratos, são estes: galactose, 6-*O*-metil-galactose, 2-*O*-metil-3,6-anidrogalactose, 2-*O*-metil-galactose, 3,6-anidrogalactose e xilose.

A fração CL-2 mostrou uma estrutura complexa nos espectros de RMN. Esta fração é constituída principalmente por unidades β-D-galactose 2-sulfato ligadas a unidades de 3,6-anidrogalactose ou seu derivado naturalmente metilado em C-2.

A presença de acetal de ácido pirúvico e de grupos metil de unidades galactose ou 3,6-anidrogalactose, foi observada, bem como unidades

G(P)(6S)(6R)(6M) ligadas a unidades LA, G(P)(6S)(6R)(6M) ligadas a LA2M, G(P)(6S)(6R)(6M) ligadas a unidades de L(3R)(3S) ou β-D-galactose-2 sulfato. As unidades α-L-galactose podem estar ligadas no C-3 por β-D-xilose.

A fração CL-2-D apresentou sinais que correspondem às díades G(P)(6R)(6M) ligadas a unidades LA, unidades G(P)(6R)(6M) ligadas a LA2M e G(P)(6R)(6M) ligadas a L. Sinais correspondentes a carboxila de ácido pirúvico, unidades de xilose e/ou galactose, que estão presentes no C-6 de unidades de β-D-galactose também foram observados.

REFERÊNCIAS

ALGAE BASE, **Taxonomy Browser**. Disponível em: www.algaebase.org/. Acesso em: nov. 2015.

AMIMI, A; MOURADI, A; GIVERNAUD, T; CHIADMI, N.; LAHAYE, M. Structural analysis of *Gigartina pistillata* carrageenans (Gigartinaceae, Rhodophyta). **Carbohydrate Research**, v. 333, p. 271-279, 2001.

ANDERSON, N.S. X-ray diffraction studies of polysaccharides sulphates: double helix models for κ- and ι-carrageenans. **Journal of Molecular Biology**., v. 45, p. 85-99, 1969.

AQUINO, R.S.; GRATIVOL, C.; MOURÃO, P.A.S. Rising from the sea: Correlations between sulfated polysaccharides and salinity in plants. **Plos one**, v. 6, p. 1-7, 2011.

ARAÚJO, C.A.; NOSEDA, M.D.; CIPRIANI, T.R.; GONÇALVES, A.G.; DUARTE, M.E.R.; DUCATTI, D.R.B. Selective sulfation of carrageenans and the influence of sulfate regiochemistry on anticoagulant properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 91, p. 483-491, 2013.

BARAHONA, T.; ENCINAS, M.V.; MANSILLA, A.; MATSUHIRO, B.; ZÚÑIGA, E.A. A sulfated galactan with antioxidant capacity from the green variant of tetrasporic *Gigartina skottsbergii* (Gigartinales, Rhodophyta). **Carbohydrate Research**, v. 347, p. 114-120, 2012.

BARROS, F.C.N.; DA SILVA, D.C.; SOMBRA, V.G.; MACIEL, J.S.; FEITOSA, J.P.A.; FREITAS, A.L.P.; DE PAULA, R.C.M. Structural characterization of polysaccharide obtained from red seaweed Gracilaria caudata (J Agardh). **Carbohydrate Polymers**, v. 92, p. 598-603, 2013.

BECKER, P.M.; GALLETTI, S.; HIL, P.J.R-V.D.; WIKSELAAR, P.G.V. Validation of growth as measurand for bacterial adhesion to food and feed ingredients. **Journal of Applied Microbiology,** v. 103, p. 2686-2696, 2007.

BECKER, P.M.; GALLETTI, S. Food and feed components for gut health-promoting adhesion of *E. coli* and *Salmonella enterica*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 88, p. 2026-2035, 2008.

BERTÉ, S.D. **Heteroramnanas sulfatadas nativas e modificadas quimicamente obtidas da macroalga verde *G. brasiliensis*: estrutura química e atividades biológicas.** Tese (Doutorado em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia), Universidade Federal do Paraná, Curitiba , 2013.

BIGGS, P; PARSONS, C.M.; FAHEY, G.C. The effects of several oligosaccharides on growth performance, nutrient, digestibilities, and cecal microbial populations in young chicks. **Poultry Science**, v. 86, p. 2327-2336, 2007.

BOROWSKY, L.; CORÇÃO, G.; CARDOSO, M. Mannanoligosaccharide agglutination by Salmonella Enterica strains isolated from carrier pigs**. Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, p. 458-464, 2009.

BOSE, J.; MORENO, A.R.; SHABALA, S. ROS homeostasis in halophytes in the context of salinity stress tolerance. **Journal of Experimental Botany**, p. 1-17, 2013.

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

CANELÓN, D.J.; CIANCIA, M. SUÁREZ, A.I.; COMPAGNONE, R.S.; MATULEWICZ, M.C. Structure of highly substituted agarans from the red seaweeds *Laurencia obtuse* and *Laurencia filiformis*. **Carbohydrate Polymers**, v. 101, p. 705-713, 2014.

CARDOSO, M.A.; NOSEDA, M.D.; FUJII, M.T.; ZIBETTI, R.G.M.; DUARTE, M.E.R. Sulfated xylomannans isolated from red seaweeds *Chondrophycus papillosus* and *C. flagelliferus* (Ceramiales) from Brazil. **Carbohydrate Research**, v. 342, p. 2766–2775, 2007.

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

CARLUCCI, M.J.; CIANCIA, M.; MATULEWICZ, M.C.; CEREZO, A.S.; DAMONTE, E.B. Antiherpetic activity and mode of action of natural carrageenans of diverse structural types. **Antiviral Research**, v. 43, p. 93-102, 1999.

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

CDC. **Centro de Controle e Prevenção de Doenças**. Disponível em: http://www.cdc.gov. Acesso em: fev. 2014.

CEREZO, A.S. The carrageenan system of *Gigartina skottsbergii* S. et G. Part I. Studies on a fraction of κ-carrageenan. **Journal of the Chemical Society C: Organic**, p. 992-997, 1967.

CIANCIA, M; MATULEWICZ, M.C.; FINCH, P.; CEREZO, A.S. Determination of the structure of cystocarpic carrageenans from *Gigartina skottsbergii* by methylation analysis and NMR spectroscopy. **Carbohydrate Research**, v. 238, p. 241-248, 1993a.

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

CIANCIA, M.C.; MATULEWICZ, M.C.; CEREZO, A.S. L-galactose containing galactans from the carrageenophyte *Gigartina skottsbergii*. **Phytochemistry**, v. 34, n. 6, p. 1541-1543, 1993.

CIANCIA, M.C.; MATULEWICZ, M.C.; CEREZO, A.S. A L-galactose-containing carrageenan from cystocarpic *Gigartina skottsbergii*. **Phytochemistry**, v. 45, n. 5, p. 1009-1013, 1997.

COLODI, F.G. **Estrutura química e atividade antiviral dos produtos de hidrólise redutiva parcial de galactanas sulfatadas do tipo DL-híbrida isoladas da alga *Cryptonemia seminervis* (Halymeniales, Rhodophyta)**. Dissertação (Mestrado no Departamento de Bioquimica). Universidade Federal do Paraná, 163 p., 2011.

COSTA, L.S.; FIDELIS, G.P.; CORDEIRO, S.L.; OLIVEIRA, R.M.; SABRY, D.A.; CÂMARA, R.B.G.; NOBRE, L.T.D.B.; COSTA, M.S.S.P; ALMEIDA-LIMA, J.; FARIAS, E.H.C.; LEITE, E.L.; ROCHA, H.A.O. Biological activities of sulfated polysaccharides from tropical seaweeds. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 64, p. 21-28, 2010.

DAMONTE, E.B.; MATULEWICZ, M.C.; CEREZO, A.S. Sulfated seaweed polysaccharides as antiviral agents. **Current Medicinal Chemistry,** v. 11, p. 2399-2419, 2004.

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

DODGSON, K.S. Determination of inorganic sulphate in studies on the enzymic and non-enzymic hydrolysis of carbohydrate and other sulphate esters. **Biochemical Journal**, v. 78, p. 312-319, 1961.

DUARTE, M.E.R.; NOSEDA, D.G.; NOSEDA, M.D.; TULIO, S.; PUJOL, C.A.; DAMONTE, E.B. Inhibitory effect of sulfated galactans from the marine alga *Bostrychia montagnei* on herpes simplex virus replication in vitro. **Phytomedicine**, v. 8, n.1, p. 53-58, 2001.

DUARTE, M.E.R.; NOSEDA, M.D.; CARDOSO, M.A.; TULIO, S.; CEREZO, A.S. The structure of a galactan sulfate from the red seaweed *Bostrychia montagnei.* **Carbohydrate Research**, v. 337, p. 1137-1144, 2002.

DUARTE, M.E.R.; CAUDURO, J.P.; NOSEDA, D.G.; NOSEDA, M.D.; GONÇALVES, A.G.; PUJOL, C.A.; DAMONTE, E.B.; CEREZO, A.S. The structure of the agaran sulfate from *Acanthophora spicifera* (Rhodomelaceae, Ceramiales) and its antiviral activity. Relation between structure and antiviral activity in agarans. **Carbohydrate Research**, v. 339, p. 335-347, 2004.

DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry,** v. 28, n. 3, p. 350-356, 1956.

DUCATTI, D.R.B. **Oligossacarideos obtidos por hidrolise redutiva parcial de polissacarideos de algas vermelhas: estudos de ressonancia magnética nuclear**. Dissertação (Mestrado no Departamento de Bioquimica). Universidade Federal do Paraná, 113 p., 2005.

FALSHAW, R.; FURNEAUX, R.H.; WONG, H.; LIAO, M.L.; BACIC, A.; CHANDRKRACHANG, S. Structural analysis of carrageenans from Burmese and Thai samples of *Catanella nipae* Zanardini. **Carbohydrate Research**, v. 285, p. 81-98, 1996.

FARIA, P.C.S. **Estrutura química de carragenanas e galactanas híbridas D/L isoladas de *Gymnogongrus griffithsiae***. Dissertação (Mestrado no Departamento de Bioquímica). Universidade Federal do Paraná, 96 p., 2002.

FARIAS, W.R.; VALENTE, A.P.; PEREIRA, M.S.; MOURÃO, P.A.S. Structure and anticoagulant activity of sulfated galactans. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 38, p. 29299-29307, 2000.

FERNÁNDEZ, L.E; VALIENTE, O.G.; MAINARDI, V.; BELLO, J.L. Isolation and characterization of an antitumor active agar-type polysaccharide of *Gracilaria dominguensis*. **Carbohydrate Research,** v. 190, p. 77-83, 1989.

FERREIRA, L.G. **Estrutura química e atividade antiviral de polissacarídeos sulfatados obtidos de algas do complexo Laurencia (Ceramiales, Rhodophyta).** Tese (Doutorado no Departamento de Bioquimica). Universidade Federal do Paraná, 213 p., 2011.

FERREIRA, L.G.; NOSEDA, M.D.; GONÇALVES, A.G.; DUCATTI, D.R.B; FUJII, M.T.; DUARTE, M. E. R. Chemical structure of the complex pyruvylated and sulfated agaran from the red seaweed *Palisada flagellifera* (Ceramiales, Rhodophyta). **Carbohydrate Research**. v. 347, p. 83–94, 2012.

FREILE-PELEGRÍN, Y.; MURANO, E. Agars from three species of *Gracilaria* (Rhodophyta) from Yucatán Peninsula. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 295-302, 2005.

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

GANNER, A.; STOIBER, C.; WIEDER, D.,SCHATZMAYR, G. Quantitative *in vitro* assay to evaluate the capability of yeast cell wall fractions from *Trichosporom mycotoxinivorans* to selectively bind gram negative pathogens. **Journal of Microbiological Methods**, v. 83, p. 168-174, 2010.

GANNER, A; SCHATZMAYR, G. Capability of yeast derivatives to adhere enteropathogenic bacteria and to modulate cells of the innate immune system. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 95, p. 289-297, 2012.

GAREGG, P.J.; LINDBERG, B.; KONRADSSON, P.; KVARNSTRÖM, I. Hydrolysis of glycosides under reducing conditions. **Carbohydrate Research**, v. 176, p. 145-148, 1988.

GELYMAR. **Carrageninas**. www.gelymar.com/. Acesso em: fev. 2014.

GONÇALVES, A.G.; DUCATTI, D.R.B.; DUARTE, M.E.R.; NOSEDA, M.D. Sulfated and pyruvylated disaccharide alditols obtained from a red seaweed galactan: ESIMS and NMR approaches. **Carbohydrate Research**, v. 337, p. 2443-2453, 2002.

GURBUZ, E.; INAL, F.; ATA, S.U.; ÇITIL, O.B.; KAV, K.; KUÇUKKAYA, F. Effects of supplemental fructo-oligosaccaride and mannan-oligosaccharide on nutrient digestibilities, volatile fatty acid concentrations, and immune function in horses. **Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences**, v. 34, p. 39-44, 2010.

GUZMAN-MURILLO, M.A.; ASCENCIO, F. Anti-adhesive activity of sulfhated exopolysaccharides of micralagae on attachment of red sore disease-associated bacteria and *Helicobacter pylori* to tissue culture cells. **Letters in Applied Microbiology,** v. 30, p. 473-478, 2000.

HASLIN, C.; LAHAYE, M.; PELLEGRINI, M., CHERMANN, J.C. *In vitro* anti-HIV activity of sulfated cell-wall polysaccharides from gametic, carposporic and tetrasporic stages of the Mediterranean red alga *Asparagopsis armata*. **Planta medica**, v, 67, p. 301-305, 2001.

JANSSON, P.–E.; KENNE, L.; LIEDGREN, H.; LINDBERG, B.; LONNGREN, J. A practical guide to the methylation analysis of carbohydrates. **Chemical Communications**, v. 8, p. 1-71, 1976.

JOL, C.N.; NEISS, T.G.; PENNINKHOF, B.; RUDOLPH, B.; De Ruiter, G. A. Novel high-performance anion exchange chromatograph method for the analysis of carrageenan and agars containing 3,6-anhydrogalatose. **Analytical Biochemistry,** 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. **Oceanography and Marine Biology Annual Review,** v. 26, p. 259-315, 1988.

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

KOCHER, A.; TUCKER, L. **The 'gut health' response to dietary Bio-Mos®: effects on gut microbiology, intestinal morphology and immune response.** Alltech Biotechnology Centre, Dunboyne, Co. Meath, Ireland, p. 1-6, 2005.

KOYANAGI, S.; TANIGAWA, N.; NAKAGAWA, H.; SOEDA, S.; SHIMENO, H. Oversulfation of fucoidan enhances its anti-angiogenic and antitumor activities. **Biochemical Pharmacology,** v. 65, p. 173-179, 2003.

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

LIANG, W.; MAO, X; PENG, X.; TANG, S. Effects of sulfate group in red seaweed polysaccharides on anticoagulant activity and cytotoxicity. **Carbohydrate Polymers**, v. 101, p. 776-785, 2014.

LIN, C.F. Interaction of sulfated polysaccharides with proteins. In: **Food Colloids**, Westport, Avi, 1977, p. 320-346.

LINDHORST, T.K.; KIEBURG, C.; WENZEL, U.K. Inhibition of the type 1 fimbriae-mediated adhesion of *Escherichia coli* to erythrocytes by multiantennary *α*-mannosyl clusters: The effect of multivalency. **Glycoconjugate Journal**, v. 15, p. 605-613, 1998.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265, 275, 1951.

MACHADO, T.W.M. *et al*. **Extrato de microalgas marinhas com capacidade de aderência a bactérias patogênicas.** BR1020120130289, 2012.

MATSUHIRO, B.; CONTE, A.F; DAMONTE, E.B.; KOLENDER, A.A.; MATULEWICZ, M.C.; MEJÍAS, E.G.; PUJOL, C.A.; ZÚÑIGA, E.A. Structural analysis and antiviral activity of a sulfated galactan from the red seaweed *Schizymenia binderi* (Gigartinalses, Rhodophyta). **Carbohydrate Research**, v. 340, p. 2392-2402, 2005.

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

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). **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 31, p. 87-95, 2002.

MEDINA, M.B. Binding of collagen I to *Escherichia coli* O157:H7 and inhibition by carrageenans. **Internationa Journal of Food Microbiology,** v. 69, p. 199–208, 2001.

MEISSEN, J.K.; SWEENEY, M.D.; GIRARDI, M.; LAWRENCE, R.; ESKO, J.D.; LEARY , J.A. Differentiation of 3-O-Sulfated Heparin Disaccharide Isomers: Identification of Structural Aspects of the Heparin CCL2 Binding Motif. **Journal American Society for Mass Spectrometry**, v. 20, p. 652-657, 2009.

MENDES, G.S.; DUARTE, M.E.R.; COLODI, F.G., NOSEDA, M.D.; FERREIRA, L.G.; BERTÉ, S.D.; CAVALCANTI, J.F.; SANTOS, N; ROMANOS, M.T.V. Structure and anti-metapneumovirus activity of sulfated galactans from the red seaweed *Cryptonemia seminervis*. **Carbohydrate Polymers**, v. 101, p. 313-323, 2014.

MILLER, I.J.; BLUNT, J.W. Evaluation of the structure of the polysaccharides from *Chondria macrocarpa* and *Ceramium rubrum* as determined by ^{13}C NMR spectroscopy. **Botanica Marina**, v. 45, p. 1-8, 2002.

MORAN, C.A. **Nutritional approaches to controlling Salmonella**. Disponível em: http://www.pigprogress.net/Health-Diseases/Health/2009/4/Nutritional-approaches-to-controlling-Salmonella-PP005919W/. Acesso em: fev. 2014.

NAGASAWA, K.; INOUE, Y.; TOKUYASU, T. An improved method for the preparation of chondroitin by solvolytic desulfation of chondroitin sulfates. **Journal of Biochemistry**, v. 86, p. 1323-1329, 1979.

NAKAZATO, G.; PAGANELLI, F.L.; LAGO, J.C.; AOKI, F.H.; MOBILON, C.; BROCCHI, M.; STEHLING, E.G.; SILVEIRA, W.D. *Lactobacillus acidophilus* decreases *Salmonella typhimurium* invasion *in vivo*. **Journal of Food Safety,** v. 31, p. 284-289, 2011.

NAVARRO, D.A.; STORTZ, C.A. Microwave-assisted alkaline modification of red seaweed galactans. **Carbohydrate Polymers**, v. 62, p. 187-191, 2005.

NOSEDA, M.D.; CEREZO, A.S. Room temperature, low-field ^{13}C-n.m.r. spectra of degraded carrageenans: Part III. Autohydrolysis of a lambda carrageenan and of its alkali-treated derivative. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 15, p. 177-181, 1993.

NOSEDA, M.D. **Polissacarídeos sulfatados isolados da fase tetraesporofítica de *Gigartina skottsbergii* (Rhodophyta, Gigartinales).** Tese (Doutorado no Departamento de Bioquímica), Universidade Federal do Paraná, 180 p. 1994.

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

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

O'DOHERTY, J.V.; DILLON, S.; FIGAT, S.; CALLAN, J.J.; SWEENEY, T. The effects of lactose inclusion and seaweed extract derived from *Laminaria* spp. on performance, digestibility of diet components and microbial populations in newly weaned pigs. **Animal Feed Science and Technology**, v. 157, p. 173–180, 2010.

OFEK, I.; HASTY, D.L.; SHARON, N. Anti-adhesion therapy of bacterial diseases: prospects and problems. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 38, p. 181-191, 2003.

OLD, D.C.; DUGUID, J.P. Selective outgrowth of fimbriate bacteria in static liquid medium. **Journal of bacteriology**, v. 103, n.2, p. 447-456, 1970.

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

PATON, A. W.; MORONA, R.; PATON, J. C. Designer probiotics for prevention of enteric infections. **Nature**, v. 4, p. 193-200, 2006.

PEREIRA, L. **Extracção, caracterização e utilização das carragenanas**. Disponível em: www.cienciaviva.pt/. Acesso em: mar. 2014.

PIRIZ, M.L.; CEREZO, A.S. Seasonal variation of carrageenans in tetrasporic, cystocarpic and 'sterile' stages of *Gigartina skottsbergii* S. et G. (Rodophyta, Gigartinales). **Hydrobiologia**, v. 226, p. 65-69, 1991.

PRADO, H.J.; CIANCIA, M.; MATULEWICZ, M.C. Agarans from the red seaweed *Polysiphonia nigrescens* (Rhodomelaceae, Ceramiales). **Carbohydrate Research**, v. 343, p. 711-718, 2008.

PUJOL, C.A.; ERREA, M.I.; MATULEWICZ, M.C.; DAMONTE, E.B. Antiherpetic activity of S1, an algal derived sulphated falactan. **Phytotherapy Research**, v. 10, p. 410-413, 1996.

RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E. In: **Biologia vegetal**, 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara/Koogan, 2007, p. 249-254.

REES, D.A. The carrageenan system of polysaccharides. Part I. The relation between the kappa and the lambda components. **Journal of Chemical Society**, p. 1821-1832, 1963.

REES, D.A. Structure, conformation and mechanism in the formation of polysaccharide gels and networks. **Advances in Carbohydrate Chemistry**, v. 24, p. 267-332, 1969.

REES, D.A. **Polysaccharide Shapes**, Ed. Chapman & Hall Ltd., p. 1-80, 1977.

RODRIGUES, J.M. **Capacidade de ligação *in vitro* à bactérias enteropatogênicas dos extratos isolados de farelo de soja.** Dissertação (Mestrado em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia), Universidade Federal do Paraná, 63p., 2012.

SÁNCHEZ, M.D.R.S.; SÁNCHEZ, R.A.S. Aspectos ecológicos y distribucion geográfica de carrangenophytas. **Luna Azul**, v.35, p. 266-281, 2012.

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

SEAGRI. **Cultivo de algas**. Disponível em: http://www3.seagri.ba.gov.br/. Acesso em: jan. 2014.

SILVA, I.B. **Diversidade de algas marinhas.** Programa de Capacitação de Monitores e Educadores (Pós-Graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente), São Paulo, 2010.

SLONEKER, J.H. Gas-liquid chromatography of alditol acetates. **Methods in Carbohydrate Chemistry**, v. 6, p. 20-24, 1972.

SNELLINGS, N.J.; TALL, B.D.; VENKATESAN, M.M. Characterization of *Shigella* type 1 fimbriae: expression, fimA sequence, and phase variation. **Infection and Immunity**, v. 65, n. 6, p. 2462-2467, 1997.

SOUZA, B.W.S.; CERQUEIRA, M.A.; BOURDON, A.I.; PINHEIRO, A.C.; MARTINS, J.T.; TEIXEIRA, J.A.; COIMBRA, M.A.; VICENTE, A.A. Chemical characterization and antioxidant activity of sulfated polysaccharide from the red seaweed *Gracilaria birdiae*. **Food Hydrocolloid**, v. 27, p. 287-292, 2012.

SOUZA, L.A.R.; DORE, C.M.P.G.; CASTRO, A.J.G.; AZEVEDO, T.C.G.; OLIVEIRA, M.T.B.; MOURA, M.F.V.; BENEVIDES, N.M.B.; LEITE, E.L. Galactanas from the red seaweed Amansia multifida and their effects on inflammation, angiogenesis, coagulation and cell viability. **Biomedicine & Preventive Nutrition**, v. 2, p. 154-162, 2012.

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

STORTZ, C.A.; CEREZO, A.S. The systems of carrageenans from cystocarpic and tetrasporic stages from *Iridea undulosa*: fractionation with potassium chloride and methylation analysis of the fractions. **Carbonydrate Research**, v. 242, p. 217-227, 1993.

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

STORTZ, C.A.; CEREZO, A.S. Novel findings in carrageenans, agaroids and “hybrid” red seaweed galactans. **Current Topics in Phytochemistry**, v. 4, p. 121-134, 2000.

SUN, Z.; HUANG, L.; KONG, J.; HU, S.; ZHANG, X.; KONG, W. In vitro evaluation of *Lactobacillus crispatus* K313 e K243: High-adhesion activity and anti-inflammatory effect on *Salmonella braenderup* infected intestinal epithelial cell. **Veterinary Microbiology**, v. 159, p. 212-220, 2012.

SVS. **Secretaria de Vigilância em Saúde**. Disponível em: www.svs.gov.br- Apresentação Rejane Alves, Coordenadora de Doenças Alimentares. Acesso em: dez. 2013.

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 vírus activity of sulfated galactans from the red seaweeds *Gymnogongrus griffithsiae* and *Cryptonemia crenulata*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 34, p. 63-71, 2004.

TALARICO, L.B.; PUJOL, C.A.; ZIBETTI, R.G.M.; FARIA, P.C.S.; NOSEDA, M.D.; DUARTE, M. E. R.; DAMONTE, E. B. The antiviral activity of sulfated polysaccharides against dengue virus is dependent on virus serotype and host cell. **Antiviral Res**., v. 66, p. 103-110, 2005.

TEODORO, J. **Desenvolvimento de bioprocesso para a obtenção de ribonucleotídeos, manooligossacarídeos e β-glucanas a partir de leveduras utilizadas na indústria sucroalcooleira**. Dissertação (Mestrado no Departamento de Bioquímica), Universidade Federal do Paraná, 126 p. 2012.

USOV, A.I.; YAROTSKY, S.V.; SHASHKOV, A.S. ^{13}C-NMR Spectroscopy of Red Algal Galactans. **Biopolymers**, v.19, p. 977-990, 1980.

USOV, A.I.; IVANOVA, E.G.; SHASHKOV, A.S. Polysaccharides of Algae. XXXIII: Isolation and ^{13}C-NMR spectral study of some new gel-formin polysaccharides from Japan sea red seaweeds. **Botanica Marina**, v. 26, p. 285-294, 1983.

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

USOV, A. I.; ELASHVILI, M. Y. Polysaccharides of algae 44. Investigation of sulfated galactan from *Laurencia nipponica* Yamada (Rhodophyta, Rhodomelaceae)., using partial reductive hydrolysis. **Botanica Marina,** v. 34, p. 553-560, 1991.

USOV, A.I. Sulfated polysaccharides of the red seaweeds. **Food Hydrocolloids**, v. 6, n.1, p. 9-23, 1992.

USOV, A.I.; BILAN, M.I.; SHASHKOV, A.S. Structure of a sulfated xylogalactan from the calcareous red alga *Corallina pilufifera* P. et R. (Rhodophyta, Corallinaceae). **Carbohydrate Research**, v. 303, p. 93-102, 1997.

USOV, A. I. Structural analysis of red seaweed galactans of agar and carrageenam groups. **Food Hydrocolloids,** v. 12, p. 301-308, 1998.

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

VAN DE VELDE, F.; PEREIRA, L.; ROLLEMA, H.S. The revised NMR chemical shift data of carrageenans. **Carbohydrate Research**, v. 339, p. 2309-2313, 2004.

VAN DE VELDE, F. Structure and function of hybrid carrageenans. **Food Hydrocolloids**, v. 22, p. 727-734, 2008.

VIANA A.G.; NOSEDA, M.D.; DUARTE, M.E.R.; CEREZO, A.S. Alkali modification of carrageenans. Part V. The iota-nu hybrid carrageenan from *Eucheuma denticulatum* and its cyclization to iota-carraegenan. **Carbohydrate Polymers**, v. 58, p. 455-460, 2004.

VILLANUEVA, R.D; ROMERO, J.B.; RAGASA, A.L.R.; MONTAÑO, M.N.E. Agar from the red seaweed, *Laurencia flexilis* (Ceramiales, Rhodophyta) from northern Philippines. **Phycological Research**, v. 58, p. 151-156, 2010.

WAGNER, C.; HENSEL, M. Adhesive Mechanisms of *Salmonella entérica*. In: Linke, D.; Goldman, A. **Bacterial adhesion - Chemistry, Biology, Physics (Advances in Experimental Medicine and Biology)**. New York: Springer, 2011. p. 17-34.

WIJESEKARA, I.; PANGESTUTI, R.; KIM S. K. Biological activities and potential health benefits of sulfated polysaccharides derived from marine algae. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, p. 14–21, 2011.

WIJESINGHE, W.A.J.P; JEON, Y-J. Biological activities and potential industrial applications of fucose rich sulfated polysaccharides and fucoidans isolated from brown seaweeds: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 88, p. 13-20, 2012.

WILSON, J. W.; SCHURR, M. J.; LEBLANC, C. L.; RAMAMURTHY, R.; BUCHANAN, K. L.; NICKERSON, C. A. Mechanisms of bacterial pathogenicity. **Postgraduate Medical Journal**, v. 78, p. 216-224, 2002.

WITVROUW, M.; ESTE, J.A.; MATEU, M.Q.; REYMEN, D.; ANDREI, G.; SNOECK, R.; IKEDA, S.; PAUWELS, R.; BIANCHINI, N.V.; DESMYTER, J.; DE CLERCQ, E. Activity of a sulfated polysaccharide extracted from the red seaweed *Aghardhiella tenera* against human immunodeficiency virus and other enveloped viruses. **Antiviral Chemistry & Chemotherapy**, v. 5, p. 297-303, 1994.

YAPHE, W.; ARSENAULT, G.P. Improved resorcinol reagent for the determination of fructose, and of 3,6-anhydrogalactose in polysaccharides. **Analytical Biochemistry**, v, 13, p. 143-148, 1965.

ZHOU, G.; SUN, Y.; XIN, H.; ZHANG, Y.; LI, Z.; XU, Z. In vivo antitumor and immunomodulation activities of different molecular weight lambda-carrageenans from *Chondrus ocellatus.* **Pharmacological Research,** v. 50, p. 47-53, 2004.

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

ZIBETTI, R.G.M.; DUARTE, M.E.R.; NOSEDA, M.D.; COLODI, F.G.; DUCATTI, D.R.B.; FERREIRA, L.G.; CARDOSO, M.A.; CEREZO, A.S. Galactans from *Cryptonemia* species. Part II: Studies on the system of galactans of *Cryptonemia seminervis* (Halymeniales) and on the structure of major fractions. **Carbohydrate Research**, v. 344, p. 2364-2374, 2009.