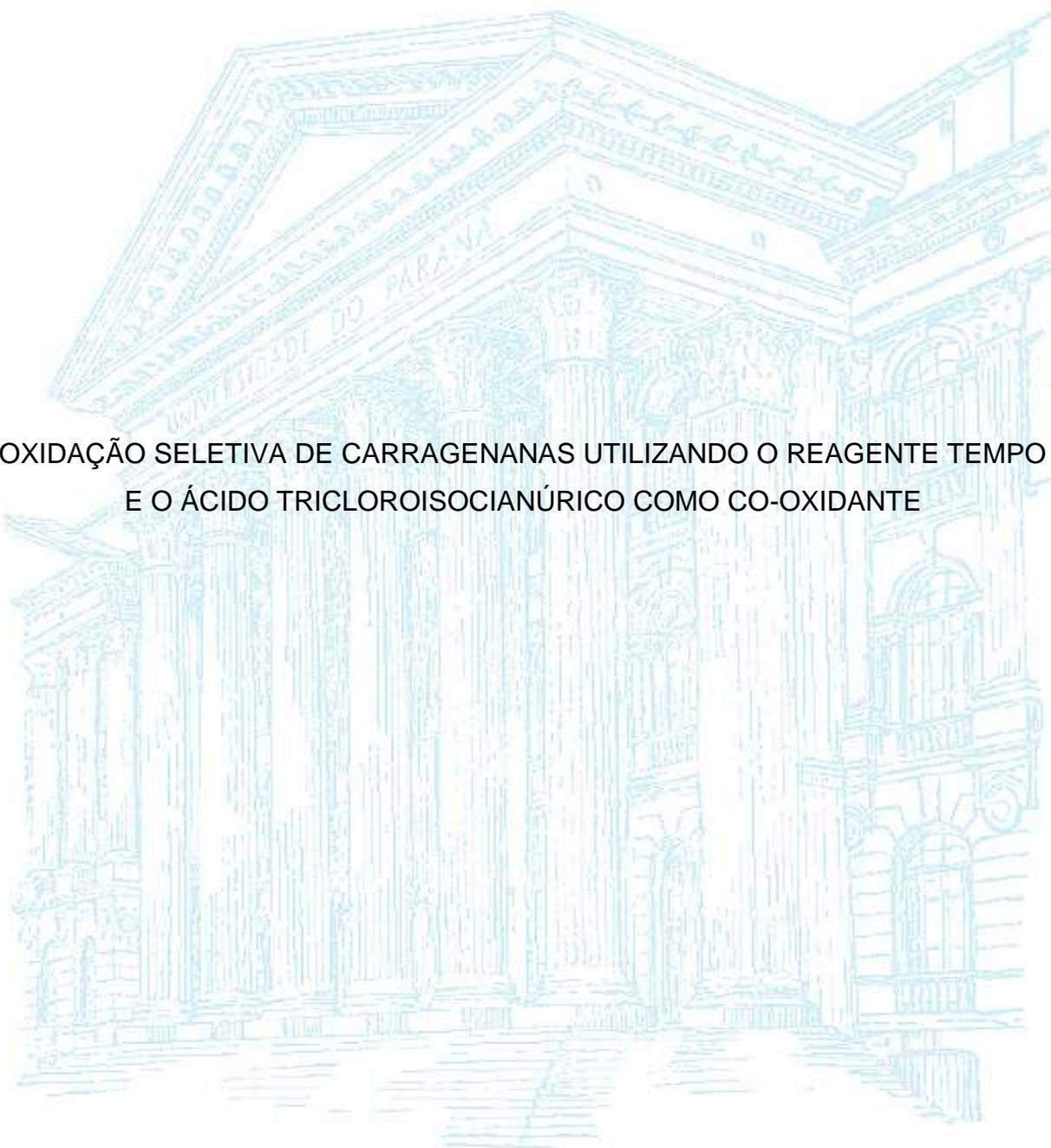


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

GISLAINE CRISTINA DOS SANTOS

OXIDAÇÃO SELETIVA DE CARRAGENANAS UTILIZANDO O REAGENTE TEMPO
E O ÁCIDO TRICLOROISOCIANÚRICO COMO CO-OXIDANTE



CURITIBA

2015

GISLAINE CRISTINA DOS SANTOS

OXIDAÇÃO SELETIVA DE CARRAGENANAS UTILIZANDO O REAGENTE TEMPO
E O ÁCIDO TRICLOROISOCIANÚRICO COMO CO-OXIDANTE

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

Orientador: Prof. Dr. Diogo R. Bazan Ducatti

Co-orientadores: Prof. Dr. Miguel Daniel Nosedá

Prof. Dr. Alan Guilherme
Gonçalves

CURITIBA

2015

Santos, Gislaine Cristina dos

Oxidação seletiva de carragenanas utilizando o reagente Tempo e o ácido tricloroisocianúrico como co-oxidante. / Gislaine Cristina dos Santos. – Curitiba, 2015.

137 f.: il. ; 30cm.

Orientador: Diogo R. Bazan Ducatti

Co-orientadores: Miguel Daniel Nosedá e Alan Guilherme Gonçalves

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

1. Polissacarídeos 2. Galactanas 3. Oxidação I. Título II. Ducatti, Diogo Ricardo Bazan III. Nosedá, Miguel Daniel IV. Gonçalves, Alan Guilherme V. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica.

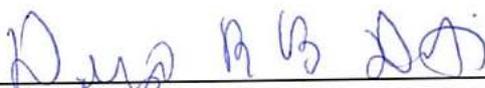
CDD (20. ed.) 574.192

TERMO DE APROVAÇÃO

GISLAINE CRISTINA DOS SANTOS

Oxidação seletiva de carragenanas utilizando o reagente TEMPO e o ácido tricloroisocianúrico como co-oxidante

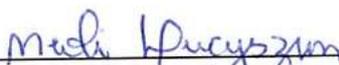
Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no curso de Pós-Graduação em Ciências-Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:



Prof. Dr. Diogo Ricardo Bazan Ducatti - Orientador
Departamento de Bioquímica, UFPR



Profa. Dra. Joana Lea Meira Silveira
Departamento de Bioquímica, UFPR



Profa. Dra. Neoli Lucyszyn - PUC-PR

Curitiba, 20 de março de 2015.

*Aos meus pais, Ivo e Neuza,
por todo amor, fé e incentivo a mim dispensados.*

AGRADECIMENTOS

À Deus! Por sempre me mostrar o caminho a seguir e nunca me desamparar!

À toda minha família!

Ao meu orientador, Prof. Dr. Diogo R. B. Ducatti, por ter me aceito como aluna de mestrado, pelo ótimo acompanhamento e orientação, ensinamentos, conversas e paciência. Pude aprender muito durante todo esse tempo e sua ajuda e direção foram indispensáveis para a conclusão deste trabalho!

Aos Professores Dr. Alan Gonçalves e Dr. Miguel Nosedá, pela co-orientação, colaboração e sugestões no projeto.

Às Professoras Dra. Maria Eugênia pelas contribuições e Dra. Joana L. M. Silveira pelas correções do projeto e sugestões.

À banca examinadora composta pelas Professoras Dra. Joana L. M. Silveira e Dra. Neoli Lucyszyn, pela avaliação do trabalho.

À Profa. Dra. Maria de Lourdes Corradi por me apresentar à bioquímica com tanto amor e pela indicação do PPG em Ciências-Bioquímica da UFPR e ao professor Diogo.

Ao Centro de RMN do Departamento de Bioquímica da UFPR, Prof. Dr. Guilherme Sasaki e alunos que empregam tempo e dedicação nas análises.

As técnicas, Eliz, pelas análises no HPSEC-MALLS, Dona Teresa, Dona Adélia e Fabiana, pelo empréstimo de materiais e fornecimento da água deionizada.

À Profa. Dra. Juliana Maurer pela amizade e disponibilidade de acesso ao laboratório 266 e uso dos equipamentos.

Ao Alexsandro por me ajudar com o aPTT, com o plasma, com a heparina...

Aos laboratórios Anexo E3 e 269, em especial Fran Colodi, Ester, Jenifer, Mariana e Cassiano, por terem me ajudado em algum momento com o desenvolvimento deste trabalho.

Ao laboratório 248, especialmente Juliana, Lais, Stephanie e Marina.

Jaque e Jana, obrigada pelo companheirismo, risadas, conselhos e auxílio no dia-a-dia do laboratório e da vida.

Aos meus amigos de longa data, Nayara, mais do que uma amiga, a irmã que nunca tive... Maicon, Gabriela, Jéssica e Joana pelos ensinamentos e convivência durante tantos anos... As minhas amigas Michele, Luciana e Samara... Sa, você muitas vezes foi quem me deu forças para continuar... Obrigada queridinha!

Aos colegas Yony, Ana Flávia e turma de mestrado 2013, em especial, Helyn por ser a mão que sempre está estendida para ajudar, Cris Colodel pela amizade deste o primeiro dia e conversas no banquinho... Willian Meira pela cumplicidade, amizade e apoio... Glauco Diaz, minha metadinha! Muito mais do que um amigo um irmão... Às vezes acho que me conhece mais do que eu mesma me conheço... Janinha, uma das pessoas que mais me surpreendeu... que sem eu perceber se tornou uma de minhas melhores amigas... Vaninha, uma das minhas primeiras amigas aqui em Curitiba... foram várias situações inesquecíveis ao seu lado!

A minha nova família curitibana que me acolheu: Ilza, Larissa, Luis e Mayra... Um muito obrigado seria pouco para agradecer tudo que fizeram e fazem por mim.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências-Bioquímica, do Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná e toda a coordenação.

Ao CNPq pela minha bolsa e PRONEX - Carboidratos pelo apoio financeiro.

“As nuvens mudam sempre de posição, mas são sempre nuvens no céu. Assim devemos ser todo dia, mutantes, porém leais com o que pensamos e sonhamos; lembre-se, tudo se desmancha no ar, menos os pensamentos”.

Paulo Beleki

“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso bem diante de meus olhos”.

Isaac Newton

RESUMO

As carragenanas são polissacarídeos extraídos da matriz extracelular de algas vermelhas, pertencentes à família das galactanas sulfatadas, muito utilizadas na indústria alimentícia como espessante, gelificante, estabilizadora de viscosidade e textura. A modificação química de polissacarídeos pode alterar características físico-químicas agregando-lhes valor econômico. Dentre essas modificações, a oxidação seletiva é de grande interesse porque gera ácidos poliurônicos com ampla aplicação na indústria como, por exemplo, na geleificação, complexação, antifloculação, adesão, bem como uma série de atividades biológicas, como a atividade anticoagulante. Dessa forma, este trabalho teve como objetivo principal oxidar seletivamente as carragenanas *kappa*-, *iota*-, *theta*-, *lambda*- e o híbrido *iota/nu* em diferentes proporções utilizando o catalisador *N*-oxil-2,2,6,6-tetrametilpiperidina (TEMPO) e o co-oxidante ácido tricloroisocianúrico (TCCA) em solução aquosa tamponada em pH 9,6 para produzir uma carboxila no carbono C6 da unidade monossacarídica (\rightarrow 3)- β -D-galactopiranosose. Inicialmente, foi realizado um estudo da reação de oxidação seletiva utilizando a *kappa*-carragenana como substrato e variando os equivalentes de TCCA (0,2; 0,5; 1; 2 e 3). As reações foram analisadas através de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) ^1H indicando a entrada do grupo carboxila de acordo com o aumento do número de equivalentes. Assim, foram realizadas oxidações com 3 equivalentes de TCCA, por 15 horas ou por 2 horas. Foram obtidas oito frações a partir das carragenanas com diferentes graus de oxidação: κ OT, ι /vOT, ι OP, ι OT, θ OP, θ OT, λ OP e λ OT. Estas frações foram caracterizadas utilizando espectroscopia de infravermelho (FTIR) e RMN (^1H , ^{13}C e HSQC). Com os dados de literatura e mapas de correlação heteronucleares HSQC foi possível realizar o assinalamento de RMN das díades produzidas após a oxidação seletiva C6. A massa molecular relativa das carragenanas nativas e oxidadas foram determinadas utilizando três curvas padrões de calibração. Análises cromatográficas em HPSEC-MALLS/IR foram utilizadas para a determinação de M_w . As análises revelaram diminuições em M_w após as oxidações e um aumento de solubilidade para a *iota*- e *theta*-carragenanas oxidadas, porém com maiores graus de oxidação observa-se diminuição das taxas de recuperação para as frações κ OT, ι /vOT, ι OT, λ OP e λ OT sugerindo formação de agregados. As amostras nativas e oxidadas da *theta*-carragenana (θ N, θ OP e θ OT) foram testadas por aPTT *in vitro* e apresentaram atividade anticoagulante dose-dependente em potências diferentes. Os oxidados apresentaram uma potência maior em relação ao biopolímero nativo, sendo a fração com oxidação parcial (θ OP) (80% de oxidação) a que apresentou maior efeito anticoagulante.

Palavras-chave: Polissacarídeos, galactanas sulfatadas, carragenanas, oxidação seletiva.

ABSTRACT

Carrageenans are polysaccharides extracted from extracellular matrix of red seaweeds that belong to the family of sulfated galactans. They are widely used in food industry as thickening, gelling and stabilizing agents. Chemical modifications of polysaccharides have been reported in order to improve physicochemical properties. The selective oxidation of sulfated polysaccharides can produce polyuronic acids derivatives with defined sulfation pattern and potential biological and technological application. Thus, the aim of this work is the selective oxidation of the *kappa*-, *iota*-, *iota/nu*-, *theta*-, and *lambda*-carrageenan using 2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl (TEMPO) and trichloroisocyanuric acid (TCCA) in a carbonate buffer (pH 9.6). Initially, we performed a study of selective oxidation reaction using the *kappa*-carrageenan as substrate and increased amounts of TCCA (0.2, 0.5, 1, 2 and 3 equivalents). The carboxyl group in the polysaccharide backbone was detected using ^1H NMR. It was observed that the increase of TCCA amount gave higher oxidation rate in the carrageenan backbone. The preparative reactions were performed using 3 equivalents of TCCA for 2 or 15 hours to give the following fractions with different degree of oxidation: κOT (87%) (from *kappa*); $\iota/\nu\text{OT}$ (>95%) (from *iota/nu*-), ιOP (42%) and ιOT (>95%) (from *iota*-); θOP (80%) and θOT (>95%) (from *theta*-) and λOP (83%) and λOT (>95%) (from *lambda*-). All the fractions were characterized by infrared spectroscopy (FTIR), ^1H , ^{13}C and HSQC NMR. The anticoagulant activity of native and oxidized fractions of *theta*-carrageenan (θN , θOP and θOT) were determined by aPTT. The oxidized fractions showed better activity than native polysaccharide, indicating that selective oxidation increased the anticoagulant property.

Keywords: Polysaccharides, sulfated galactans, carrageenans, selective oxidation, TEMPO, TCCA.

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1- ESTRUTURAS DISSACARÍDICAS DE GALACTANAS EXTRAÍDAS DAS ALGAS VERMELHAS. R= H, SO₃⁻26
- FIGURA 2- REPRESENTAÇÃO DO MODELO DE DOMÍNIOS PARA A GELEIFICAÇÃO DE CARRAGENANAS. A estrutura intermediária é estável apenas para a *iota*-carragenana sob condições iônicas (ex. (CH₃)₄N⁺). Para a *kappa*- e *iota*-carragenana na presença de cátions (•) (K⁺, Rb⁺ e Cs⁺, NH₄⁺) ocorre a formação de domínios agregados. Estão sendo mostrados apenas cátions ligados relevantes para o modelo.30
- FIGURA 3- REAÇÃO DE ÓXIDO-REDUÇÃO DO REAGENTE TEMPO36
- FIGURA 4- OXIDAÇÃO DE ÁLCOOIS UTILIZANDO O REAGENTE TEMPO E CO-OXIDANTE36
- FIGURA 5- ESTRUTURA DOS ÁCIDOS TRIHALOISOCIANÚRICOS.....38
- FIGURA 6- MECANISMO DE OXIDAÇÃO SELETIVA UTILIZANDO O REAGENTE TCCA COMO CO-OXIDANTE.....39
- FIGURA 7- VIAS INTRÍNSECA E EXTRÍNSECA DO MODELO CLÁSSICO DA CASCATA DE COAGULAÇÃO.....41
- FIGURA 8- SEQUÊNCIA PENTASSACARÍDICA DA HEPARINA44
- FIGURA 9- FLUXOGRAMA DAS FRAÇÕES OBTIDAS E OXIDADAS SELETIVAMENTE DOS POLISSACARÍDEOS EXTRAÍDOS DAS ALGAS *Kappaphycus alvarezii*, *Eucheuma denticulatum* e *Gigartina skottsbergii*.50
- FIGURA 10- ESPECTRO DE RMN ¹H DAS FRAÇÕES κN (A) E κNP (B). Solvente: D₂O, 70 °C, 400 MHz, acetona como padrão interno (δ = 2,208 ppm)68
- FIGURA 11- ESPECTRO DE RMN ¹H DA FRAÇÃO ι/νN OBTIDA DA EXTRAÇÃO DA ALGA *Eucheuma denticulatum*. Solvente: D₂O, 70 °C, 600 MHz, acetona como padrão interno (δ = 2,208 ppm)69

FIGURA 12- ESPECTROS DE RMN ¹ H DAS FRAÇÕES ι/ν N (A) E ι N (B), 70 °C, 600 MHz, Solvente: D ₂ O, acetona como padrão interno (δ = 2,208 ppm).....	71
FIGURA 13- ESPECTRO DE RMN ¹ H DA FRAÇÃO λ N OBTIDA DA EXTRAÇÃO DA ALGA <i>Gigartina skottsbergii</i> . 55 °C, 400 MHz. Solvente: D ₂ O, acetona como padrão interno (δ = 2,208 ppm)	71
FIGURA 14- ESPECTROS DE RMN ¹ H DAS FRAÇÕES λ N (A), 55°C, 400 MHz E θ N (B), 70 °C, 400 MHz. Solvente: D ₂ O, acetona como padrão interno (δ = 2,208 ppm).....	73
FIGURA 15- ESPECTROS DE RMN ¹ H DAS FRAÇÕES REDUZIDAS κ NR (A), 70°C, 600 MHz, ι/ν NR (B), 70°C, 600 MHz, ι N (C), 70°C, 600 MHz, λ N (D), 55°C, 400 MHz E θ N (E), 70°C, 400 MHz. Solvente: D ₂ O, acetona como padrão interno (δ = 2,208 ppm)	74
FIGURA 16- OXIDAÇÃO DA <i>KAPPA-CARRAGENANA</i>	75
FIGURA 17- VOLUMES DE NaOH UTILIZADO (NaOH _R) E TEÓRICO MÁXIMO (NaOH _T) EM FUNÇÃO DO TEMPO REACIONAL.....	76
FIGURA 18- ESPECTROS DE RMN ¹ H DAS FRAÇÕES κ NP(A) e κ OTT (B). 70 °C, 400 MHz. Solvente D ₂ O, acetona como padrão interno (δ = 2,208 ppm).....	77
FIGURA 19- MAPAS DE CORRELAÇÃO BIDIMENSIONAIS HETERONUCLEARES HSQC DAS FRAÇÕES κ NP (70 °C) E κ OTT (55 °C), 600 MHz. Solvente: D ₂ O, acetona como padrão interno (δ = 2,208 e 32,69 ppm para ¹ H e ¹³ C).....	78
FIGURA 20- ESPECTROS DE RMN ¹ H DAS FRAÇÕES κ NR (NATIVA) (600 MHz, 70 °) E OXIDADAS COM DIFERENTES QUANTIDADES DO REAGENTE TCCA EM 2 HORAS (Entrada 1 e 3: 400 MHz, 55 °C; Entrada 2 e 4: 600 MHz, 50 °C, Entrada 5: 600 MHz, 70 °C). Solvente D ₂ O, acetona como padrão interno (δ = 2,208 ppm).....	81
FIGURA 21- ESPECTROS DE RMN ¹ H DAS FRAÇÕES κ NR (NATIVA) (600 MHz) E OXIDADAS COM DIFERENTES QUANTIDADES DO REAGENTE TCCA EM 15 HORAS (Entrada 6 e 10: 400 MHz; Entrada 7-9: 600 MHz). Solvente D ₂ O, 70 °C, acetona como padrão interno (δ = 2,208 ppm).....	82

FIGURA 22- ESPECTRO DE ^1H DA FRAÇÃO κOCT . 70°C, 600 MHz. Solvente: D_2O , acetona como padrão interno ($\delta = 2,208$ ppm).....	84
FIGURA 23- ESPECTROS DE RMN ^1H DAS FRAÇÕES κNR (A), 600 MHz E κOT (B), 400 MHz. 70°C. Solvente D_2O , acetona como padrão interno ($\delta = 2,208$ ppm)	85
FIGURA 24- ESPECTROS DE RMN ^{13}C DAS FRAÇÕES κN (A), 100 MHz, 60°C, κOT (B), pH 4, 400 MHz, 70°C, κOT (C), TRATADA COM RESINA ÁCIDA E TITULADA, pH 5, 100 MHz, 70°C E κOT (D), TRATADA COM RESINA ÁCIDA, pH 1, 100 MHz, 70°C. Solvente: D_2O ; acetona como padrão interno ($\delta = 32,69$ ppm). O espectro (a) foi obtido por Araújo <i>et al.</i> (2013) sendo o DSS padrão interno $\delta = 0,0$ ppm.....	86
FIGURA 25- ESPECTROS DE RMN ^{13}C DAS FRAÇÕES κOT , pH 4, 400 MHz, 70°C E κOT TRATADA COM RESINA ÁCIDA E TITULADA, pH 5, 100 MHz, 70°C. Solvente: D_2O , acetona como padrão interno ($\delta = 32,69$ ppm).....	87
FIGURA 26- ESPECTROS DE INFRAVERMELHO DAS FRAÇÕES κNR (A) E κOT (B). Região entre 2400 e 400 cm^{-1}	88
FIGURA 27- OXIDAÇÃO DA FRAÇÃO iN	89
FIGURA 28- ESPECTROS DE RMN ^1H DAS FRAÇÕES iN (A), 70 °C, 600 MHz, iOP (B), 400 MHz, 60 °C E iOT (C), 70 °C, 600 MHz. Solvente D_2O , acetona como padrão interno ($\delta = 2,208$ ppm).	90
FIGURA 29- MAPAS DE CORRELAÇÃO BIDIMENSIONAIS HETERONUCLEARES HSQC DAS FRAÇÕES iN , 70 °C E iOT , 55 °C. 400 MHz, pH 5. Solvente D_2O , acetona como padrão interno ($\delta = 2,208$ e 32,69 ppm para ^1H e ^{13}C).....	91
FIGURA 30- ESPECTROS DE RMN ^{13}C DAS FRAÇÕES iN (A) E iOT (B). 100 MHz, 70°C. Solvente D_2O , acetona como padrão interno ($\delta = 32,69$ ppm para ^{13}C - referente ao DSS - $\delta = 0,0$ ppm).....	92
FIGURA 31- ESPECTROS DE INFRAVERMELHO DAS FRAÇÕES iN (A), iOP (B) E iOT (C). Região entre 1400 e 600 cm^{-1}	93
FIGURA 32- REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA OXIDAÇÃO DA FRAÇÃO i/vNR	94

FIGURA 33- ESPECTROS DE RMN ^1H DAS FRAÇÕES $i/v\text{NR}$ (A) E $i\text{OT}$ (B). 600 MHz, 70 °C, Solvente: D_2O , acetona como padrão interno ($\delta = 2,208$ ppm).....	94
FIGURA 34- MAPAS DE CORRELAÇÃO BIDIMENSIONAIS HETERONUCLEARES HSQC EDITADOS DAS FRAÇÕES $i/v\text{NR}$, 400 MHz, 70°C, pH 4 E $i/v\text{OT}$, 600 MHz, 70 °C, pH 7. Solvente D_2O , acetona como padrão interno ($\delta = 2,208$ e 32,69 ppm para ^1H E ^{13}C)	95
FIGURA 35- ESPECTROS DE INFRAVERMELHO DAS FRAÇÕES $i/v\text{NR}$ (A), $i/v\text{OT}$ (B). Região entre 2400 e 400 cm^{-1}	96
FIGURA 36- REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA OXIDAÇÃO DA FRAÇÃO θN	97
FIGURA 37- ESPECTROS DE RMN ^1H DAS FRAÇÕES θN (A), 70 °C, 400 MHz, θOP (B), 70 °C, 600 MHz E θOT (C), 70 °C, 400 MHz. Solvente D_2O , acetona como padrão interno ($\delta = 2,208$ ppm).	98
FIGURA 38- MAPAS DE CORRELAÇÃO BIDIMENSIONAIS HETERONUCLEARES HSQC DAS FRAÇÕES θN , 60 °C E θOT , 70 °C. 400 MHz. Solvente D_2O , acetona como padrão interno ($\delta = 2,208$ e 32,69 ppm para ^1H e ^{13}C).....	99
FIGURA 39- ESPECTROS DE RMN ^{13}C DAS FRAÇÕES θN (A) E θOT (B), pH 5, 100 MHz, 60°C. Solvente: D_2O , acetona como padrão interno ($\delta = 32,69$ ppm para ^{13}C - Referente ao DSS - $\delta = 0,0$ ppm)	100
FIGURA 40- ESPECTROS DE INFRAVERMELHO DAS FRAÇÕES θN (A), θOP (B) E θOT (C). REGIÃO ENTRE 2800 E 400 cm^{-1}	101
FIGURA 41- REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA OXIDAÇÃO DA FRAÇÃO λN	102
FIGURA 42- ESPECTROS DE RMN ^1H DAS FRAÇÕES λN (A), 400 MHz, 55° C, λOP (B), 400 MHz, 70 °C E λOT (C) 400 MHz, 70 °C. Solvente: D_2O , acetona como padrão interno ($\delta = 2,208$ ppm).	102
FIGURA 43- MAPAS DE CORRELAÇÃO BIDIMENSIONAIS HETERONUCLEARES HSQC DAS FRAÇÕES λN E λOT . 70 °C, 400 MHz. Solvente: D_2O , acetona como padrão interno ($\delta = 2,208$ e 32,69 ppm para ^1H e ^{13}C).	103

- FIGURA 44- ESPECTRO DE RMN ^{13}C DA FRAÇÃO λOT , 100 MHz, 70°C . Solvente: D_2O ; acetona como padrão interno ($\delta = 32,69$ ppm para ^{13}C - referente ao DSS - $\delta = 0,0$ ppm)..... 104
- FIGURA 45- ESPECTRO DE INFRAVERMELHO DAS FRAÇÕES λN (A), λOP (B) E λOT (C). Região entre 2600 e 400 cm^{-1} 105
- FIGURA 46- PERFIS DE ELUIÇÃO OBTIDOS POR HPSEC-MALLS (κNR ---- κOT ----) ACOPLADO AO DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO (IR) (κNR — κOT —) EM FUNÇÃO DO TEMPO DE ELUIÇÃO (MIN)..... 110
- FIGURA 47- PERFIS DE ELUIÇÃO OBTIDOS POR HPSEC-MALLS ($i/v\text{NR}$ ---- $i/v\text{OT}$ ----) ACOPLADO AO DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO (IR) ($i/v\text{NR}$ — $i/v\text{OT}$ —) EM FUNÇÃO DO TEMPO DE ELUIÇÃO (MIN)..... 110
- FIGURA 48- PERFIS DE ELUIÇÃO OBTIDOS POR HPSEC-MALLS ($i\text{N}$ ---- $i\text{OP}$ ---- $i\text{OT}$ ----) ACOPLADO AO DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO (IR) ($i\text{N}$ — $i\text{OP}$ — $i\text{OT}$ —) EM FUNÇÃO DO TEMPO DE ELUIÇÃO (MIN)..... 111
- FIGURA 49- TEMPO DE TROMBOPLASTINA PARCIAL ATIVADA (APTT) PARA AS FRAÇÕES θN , θOP E θOT . Plasma ovino com valores normais de aPTT foi incubado com concentrações diferentes dos polissacarídeos. Os resultados foram expressos em tempo de coagulação (s) \pm Erro Padrão Médio ($n=3$) e comparados com o grupo controle negativo (solução salina) e grupo controle positivo (heparina)..... 116

LISTA DE TABELAS

TABELA 1-	CLASSIFICAÇÃO DAS CARRAGENANAS DE ACORDO COM O PADRÃO DE SULFATAÇÃO	28
TABELA 2-	APLICAÇÕES E FUNÇÕES DAS CARRAGENANAS EM DIFERENTES PRODUTOS.....	32
TABELA 3-	OXIDAÇÕES DE POLISSACARÍDEOS UTILIZANDO O REAGENTE TEMPO.	37
TABELA 4-	POLISSACARÍDEOS SULFATADOS COM ATIVIDADES ANTICOAGULANTES EXTRAÍDOS DE ALGAS MARINHAS.....	45
TABELA 5-	MASSAS MOLARES E VOLUMES UTILIZADOS NO ESTUDO DA OXIDAÇÃO SELETIVA COM A <i>KAPPA</i> -CARRAGENANA.....	54
TABELA 6-	TEMPO DE RETENÇÃO, M_w E PARÂMETROS DAS CURVAS PADRÕES DE CALIBRAÇÃO.....	61
TABELA 7-	VALORES DE INTEGRAÇÃO E TEORES DAS CARRAGENANAS OBTIDAS NA EXTRAÇÃO DA ALGA <i>Eucheuma denticulatum</i>	69
TABELA 8-	RENDIMENTOS OBTIDOS NAS ETAPAS DE OBTENÇÃO DAS CARRAGENANAS*	73
TABELA 9-	VOLUMES DE NaOH E VALORES DE pH DURANTE A OXIDAÇÃO SELETIVA C6 DA <i>KAPPA</i> -CARRAGENANA.....	76
TABELA 10-	DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DE 1H E ^{13}C DAS DÍADES DE <i>KAPPA</i> -CARRAGENANA NATIVA (κ NP) E OXIDADA (κ OTT) EM C6.....	79
TABELA 11-	REAÇÕES DE OXIDAÇÃO SELETIVA UTILIZANDO A <i>KAPPA</i> -CARRAGENANA COMO SUBSTRATO	80
TABELA 12-	REAÇÕES TESTE PARA AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DO REAGENTE TEMPO.....	83

TABELA 13- GRAU DE OXIDAÇÃO, PORCENTAGEM DE SULFATO E GRAU DE SULFATAÇÃO DA FRAÇÃO κ OT.....	88
TABELA 14- GRAU DE OXIDAÇÃO, PORCENTAGEM DE SULFATO, GRAU DE SULFATAÇÃO DOS PRODUTOS DE OXIDAÇÃO DA IOTA-CARRAGENANA.....	90
TABELA 15- DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DE ^1H E ^{13}C RMN DAS DÍADES DE IOTA-CARRAGENANA NATIVA (ι N) E OXIDADA (ι OT) EM C6.	92
TABELA 16- GRAU DE OXIDAÇÃO, PORCENTAGEM DE SULFATO E GRAU DE SULFATAÇÃO DAS FRAÇÕES OXIDADAS A PARTIR DE <i>THETA</i> -CARRAGENANA.....	98
TABELA 17- DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DE ^1H E ^{13}C DAS DÍADES DE <i>THETA</i> -CARRAGENANA NATIVA (θ N) E OXIDADA (θ OT) EM C6 ^a	100
TABELA 18- GRAU DE OXIDAÇÃO, PORCENTAGEM DE SULFATO E GRAU DE SULFATAÇÃO DAS FRAÇÕES OXIDADAS A PARTIR DE <i>LAMBDA</i> -CARRAGENANA.....	103
TABELA 19- DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DE ^1H E ^{13}C DAS DÍADES DE <i>LAMBDA</i> -CARRAGENANA NATIVA (λ N) E C6 OXIDADA (λ OT).	105
TABELA 20- RENDIMENTOS OBTIDOS NAS ETAPAS DE OBTENÇÃO DAS CARRAGENANAS*	106
TABELA 21- TEMPOS DE RETENÇÃO (MIN) E MASSA MOLECULAR RELATIVA DAS CARRAGENANAS OBTIDAS ATRAVÉS DAS CURVAS PADRÕES DE CALIBRAÇÃO DE DEXTRANA E ÓXIDO DE POLIETILENO.....	108
TABELA 22- TEMPO DE RETENÇÃO, M_w E PARÂMETROS DA CURVA PADRÃO DE CALIBRAÇÃO DE CARRAGENANAS.	108
TABELA 23- TEMPOS DE RETENÇÃO (MIN) E MASSA MOLECULAR RELATIVA DAS CARRAGENANAS OBTIDAS ATRAVÉS DAS CURVAS PADRÕES DE CARRAGENANAS.....	109
TABELA 24- PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DETERMINADOS POR HPSEC-MALLS/IR DAS CARRAGENANAS NATIVAS E OXIDADAS SELETIVAMENTE EM DIFERENTES PROPORÇÕES.	112

TABELA 25- ENSAIO DE aPTT DAS FRAÇÕES θ_N , θ_{OP} E θ_{OT} OBTIDAS A PARTIR DA *THETA*-CARRAGENANA. 115

TABELA 26- CONCENTRAÇÃO NECESSÁRIA DE CADA FRAÇÃO PARA TRIPLICAR O TEMPO DE aPTT DA SOLUÇÃO SALINA. 116

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

δ	- Deslocamento químico
κ	- <i>Kappa</i> -carragenana
κN	- Fração de <i>kappa</i> -carragenana obtida por Araújo <i>et al.</i> (2013) após extração da <i>Kappaphycus alvarezii</i>
κNP	- Fração de <i>kappa</i> -carragenana obtida após a purificação com KCl da fração κN
κNR	- Fração de <i>kappa</i> -carragenana obtida após a redução da fração κNP
κOTT	- Fração obtida após oxidação seletiva da fração κNP monitorada por titulometria
κOT	- Fração obtida após a oxidação seletiva em 2 horas da fração κNR
ι	- <i>Iota</i> -carragenana
ιN	- Fração de <i>iota</i> -carragenana obtida após o tratamento alcalino da fração $\iota/\nu\text{N}$
ιOP	- Fração obtida após a oxidação seletiva em 2 horas da fração ιN
ιOT	- Fração obtida após a oxidação seletiva em 15 horas da fração ιN
ι/ν	- <i>Iota/nu</i> -carragenana
$\iota/\nu\text{N}$	- Fração de <i>iota/nu</i> -carragenana obtida da extração da alga <i>Eucheuma denticulatum</i>
$\iota/\nu\text{NR}$	- Fração de <i>iota/nu</i> -carragenana obtida após redução da fração $\iota/\nu\text{N}$
$\iota/\nu\text{OT}$	- Fração obtida após a oxidação seletiva em 15 horas da fração $\iota/\nu\text{NR}$
λ	- <i>Lambda</i> -carragenana
λN	- Fração de <i>lambda</i> -carragenana obtida por Araújo <i>et al.</i> (2013) através da separação com KCl da extração da alga <i>Gigartina skottsbergii</i>
λOP	- Fração obtida após a oxidação seletiva em 2 horas da fração λN
λOT	- Fração obtida após a oxidação seletiva em 15 horas da fração λN
θ	- <i>Theta</i> -carragenana
θN	- Fração de <i>theta</i> -carragenana obtida após o tratamento alcalino da fração λN
θOP	- Fração obtida após a oxidação seletiva em 2 horas da fração θN
θOT	- Fração obtida após a oxidação seletiva em 15 horas da fração θN
AT	- Antitrombina
aPTT	- Tempo de tromboplastina parcial ativada
DEN-2	- Vírus da dengue 2
DEPT	- <i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i>
DS _{Oxidação}	- Grau de substituição em porcentagem para oxidação
DS _{Sulfatação}	- Grau de substituição para sulfatação

Equiv	- Equivalentes
FDA	- <i>Food and Drug Administration</i>
HCII	- Cofator II da heparina
HIV	- Vírus da imunodeficiência humana
HPSEC	- Cromatografia de exclusão estérica de alta precisão
HPV	- Papilomavírus humano
HRV	- Rinovírus humano
HSQC	- <i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
HSV-1 e HSV-2	- Vírus da herpes simples 1 e 2
IFAC	- <i>International Food Additives Council</i>
IR	- Índice de refração
JECFA	- <i>Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives</i>
KDa	- Kilodaltons
MALLS	- Espalhamento de luz laser multiângulos
min	- Minuto
M_n	- Massa molecular média ponderal em número
M_w	- Massa molecular média ponderal em peso
nd	- Não detectado
ppm	- Partes por milhão
RMN	- Ressonância Magnética Nuclear
RMN ^1H	- Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio um
RMN ^{13}C	- Ressonância Magnética Nuclear de Carbono treze
RPM	- Rotações por minuto
TNF- α	- Fator de necrose tumoral- α
TFPI	- Inibidor da via do fator tissular
UFH	- <i>Unfractionated Heparin</i>
UFMS	- Universidade Federal de Santa Maria
USAN	- <i>United States Adopted Name</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	22
2 REVISÃO DE LITERATURA	24
2.1 POLISSACARÍDEOS DE ALGAS VERMELHAS	24
2.1.1 Estrutura geral de galactanas.....	25
2.2 CARRAGENANAS	27
2.2.1 Aplicações industriais	30
2.2.2 Aplicações biológicas	33
2.3 OXIDAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS	34
2.3.1 Oxidação seletiva utilizando o reagente TEMPO	35
2.4 ATIVIDADE ANTICOAGULANTE.....	40
2.4.1 Pré-coagulação	40
2.4.2 Sistema anticoagulante	42
2.4.3 Heparina.....	43
3 JUSTIFICATIVA	46
4 OBJETIVOS	48
4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	48
5 MATERIAL E MÉTODOS	49
5.1 EXTRAÇÃO E OBTENÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS	50
5.1.1 <i>Kappa</i> -carragenana (κ NP).....	50
5.1.2 <i>Iota/nu</i> -carragenana (i/vN).....	51
5.1.3 <i>Iota</i> -carragenana (iN)	51
5.1.4 <i>Lamda</i> -carragenana (λ N)	52
5.1.5 <i>Theta</i> -carragenana (θ N).....	52
5.2 REAÇÃO DE OXIDAÇÃO SELETIVA DAS CARRAGENANAS	53
5.2.1 Reduções das frações κ NP e i/vN.....	53
5.2.2 Oxidação seletiva da <i>kappa</i> -carragenana monitorada por titulometria (κ OTT)	53
5.2.3 Estudo da oxidação seletiva utilizando a <i>kappa</i> -carragenana como substrato	54
5.2.4 Oxidação seletiva tamponada da <i>kappa</i> -carragenana (κ OT)	55
5.2.5 Oxidação seletiva tamponada do híbrido <i>iota/nu</i> -carragenana (i/vOT)	56
5.2.6 Oxidação seletiva tamponada total (iOT) e parcial (iOP) da <i>iota</i> -carragenana.....	56

5.2.7 Oxidação seletiva tamponada total (λ OT) e parcial (λ OP) da <i>lambda</i> -carragenana	57
5.2.8 Oxidação seletiva tamponada total (θ OT) e parcial (θ OP) da <i>theta</i> -carragenana	58
5.3 MÉTODOS ANALÍTICOS	58
5.3.1 Determinação de ácido urônico	58
5.3.2 Determinação do grau de sulfatação ($DS_{\text{Sulfatação}}$)	59
5.3.3 Curvas padrão de polissacarídeos para estimação de massa molecular relativa	60
5.3.4 Análise cromatográfica de exclusão estérica de alta precisão acoplada a espalhamento de luz laser em multiângulos (HPSEC-MALLS)	62
5.3.4.1 Determinação da homogeneidade	62
5.3.4.2 Determinação da massa molecular	62
5.4 MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS	63
5.4.1 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	63
5.4.1.1 Obtenção dos espectros de ^1H e ^1H - ^{13}C HSQC	64
5.4.1.2 Obtenção dos espectros de ^{13}C	64
5.4.1.2.1 Tratamento com resina ácida para análise de RMN ^{13}C	64
5.4.2 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)	65
5.5 ENSAIO DA ATIVIDADE ANTICOAGULANTE <i>IN VITRO</i>	65
5.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	66
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	67
6.1 EXTRAÇÃO E OBTENÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS	67
6.1.1 <i>Kappa</i> -carragenana (κ NP)	67
6.1.2 <i>Iota/nu</i> -carragenana (<i>i/v</i> N)	68
6.1.3 <i>Iota</i> -carragenana (<i>i</i> N)	70
6.1.4 <i>Lambda</i> -carragenana (λ N)	71
6.1.5 <i>Theta</i> -carragenana (θ N)	72
6.2 OXIDAÇÕES SELETIVA DAS CARRAGENANAS E CARACTERIZAÇÃO	73
6.2.1 Reduções das frações κ NP e <i>i/v</i> N	73
6.2.2 Oxidação seletiva da <i>kappa</i> -carragenana monitorada por titulometria (κ OTT)	75
6.2.3 Estudo da oxidação seletiva utilizando <i>kappa</i> -carragenana como substrato ...	79
6.2.4 Síntese e caracterização da oxidação seletiva C6 tamponada da <i>kappa</i> -carragenana (κ OT)	85

6.2.5 Síntese e caracterização das frações oxidadas seletivamente ι OT, ι OP e ι / ν OT	89
6.2.6 Síntese e caracterização das frações oxidadas seletivamente θ OP e θ OT	96
6.2.7 Síntese e caracterização das frações oxidadas seletivamente λ OP e λ OT....	101
6.3 DETERMINAÇÃO DA MASSA MOLECULAR.....	107
6.3.1 Curvas padrão de polissacarídeos para estimação de massa molecular relativa	107
6.3.2 Análise cromatográfica de exclusão estérica de alta precisão acoplada a espalhamento de luz laser em multiângulos (HPSEC-MALLS)	109
6.4 ENSAIO DA ATIVIDADE ANTICOAGULANTE <i>IN VITRO</i> DA <i>THETA</i> -CARRAGENANA.....	114
7 CONCLUSÕES.....	118
REFERÊNCIAS.....	120
ANEXOS.....	135
ANEXO 1 – CURVAS PADRÕES DE CALIBRAÇÃO PARA OS PADRÕES DE DEXTRANA E ÓXIDO DE POLIETILENO.....	135
ANEXO 2 – DIFERENTES PERFIS DE ELUIÇÃO OBTIDOS POR HPSEC-MALLS/IR (V) EM FUNÇÃO DO TEMPO DE ELUIÇÃO (MIN)	136
ANEXO 3 – CURVA PADRÃO DE CALIBRAÇÃO DE CARRAGENANAS.	137

1 INTRODUÇÃO

Os polissacarídeos, em razão de sua grande variabilidade estrutural, fonte renovável, disponibilidade, biodegradabilidade e biocompatibilidade têm atraído interesse para diversas aplicações. São considerados ingredientes essenciais para a produção de alimentos, cosméticos (GUO *et al.*, 1998; WANG *et al.*, 2013; PRAJAPATI *et al.*, 2014) e apresentam um grande potencial na química medicinal e terapêutica. Eles podem ser extraídos de diversas fontes como plantas, bactérias, fungos, insetos, crustáceos, animais e algas marinhas (PRAJAPATI *et al.*, 2014).

Nas algas marinhas, há uma grande variedade de biopolímeros que podem ser obtidos, entre outros materiais funcionais, como ácidos graxos, antioxidantes, minerais e vitaminas essenciais. Comercialmente, os três polissacarídeos mais explorados são os alginatos, encontrados em algas marrons (Phaeophyceae), o ágar e as carragenanas que são isolados das algas vermelhas (Rhodophyceae).

O ágar e as carragenanas participam de setores industriais importantes, como a indústria alimentícia e cosmética. As carragenanas devido a presença dos grupos sulfato ainda exibem atividades biológicas como atividades antitumoral, antiviral, antioxidante, anti-hiperlipidêmica e anticoagulante (DUARTE *et al.*, 2001; ROCHA, 2001; PENGZHAN *et al.*, 2003; TALARICO *et al.*, 2004, 2005, 2011; YUAN *et al.*, 2005; S.F-TISCHER *et al.*, 2006; BECKER *et al.*, 2007; SOUZA *et al.*, 2007; INOUE *et al.*, 2009; YUAN *et al.*, 2010; SOUZA *et al.*, 2012; WANG; WANG; GUAN, 2012; ARAÚJO *et al.*, 2013; JIN *et al.*, 2013; WANG *et al.*, 2013; LIANG *et al.*, 2014).

Em nosso grupo de pesquisa, as carragenanas já vem sendo estudadas há mais de 25 anos. Como uma interessante estratégia para melhorar suas propriedades físico-químicas e potencializar suas atividades biológicas, nosso grupo tem utilizado as carragenanas como substratos em modificações químicas. Em um dos trabalhos mais recentes, Araújo e colaboradores (2013) realizaram a sulfatação regioseletiva e persulfatação nas carragenanas *iota*-, *kappa*- e *theta*-, e compararam suas atividades anticoagulantes relacionando-as com as estruturas das frações nativas e modificadas quimicamente. Foram observadas diferenças significativas entre o padrão de sulfatação e a atividade anticoagulante.

Neste contexto, a oxidação seletiva de biopolímeros surge como outra modificação que pode agregar uma nova densidade de carga negativa influenciando

a conformação estrutural da cadeia polissacarídica e assim gerar novas aplicações. Esta estratégia tem sido aplicada à polissacarídeos solúveis e insolúveis como o amido, maltodextrina, celulose, galactomanana, glucana, ácido hialurônico, quitina, quitosana e xantana com intuito de gerar polímeros com potencial aplicação biológica e biotecnológica (NOOY; BESEMER; BEKKUM, 1995; JIANG *et al.*, 2000; TAHIRI; VIGNON, 2000; THABURET *et al.*, 2001; KATO, MATSUO, ISOGAI, 2003; PEREZ, MONTANARI, VIGNON, 2003; BORDENAVE; GRELIER; COMA, 2008; FAN; SAITO; ISOGAI, 2008, 2009; LAVAZZA *et al.*, 2011; DELATTRE *et al.*, 2014).

Dessa forma, dando continuidade ao estudo de Araújo *et al.* (2013) e observando que ainda não há relatos na literatura de oxidação seletiva em carragenanas até o momento, este trabalho teve por objetivo oxidar seletivamente e em diferentes proporções a hidroxila primária (C6) da unidade β -D-galactopiranosose das carragenanas *kappa*-, *iota/nu*-, *iota*-, *lambda*- e *theta*-, que diferem na quantidade e posição de seus substituintes éster sulfatos e no teor de unidades de 3,6-anidro- α -D-galactopiranosose, utilizando o reagente TEMPO (*N*-oxil-2,2,6,6-tetrametilpiperidina) e como co-oxidante o TCCA (ácido tricloroisucianúrico). As frações contendo *theta*-carragenana nativa e quimicamente modificadas foram testadas em relação à atividade anticoagulante *in vitro*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 POLISSACARÍDEOS DE ALGAS VERMELHAS

Existem entre 5000 e 6000 espécies de algas vermelhas (Rhodophyta) encontradas em ambientes de águas frias, como Nova Scotia (Canadá) e sul do Chile; em águas mais temperadas, como a costa do Marrocos e Portugal; e em águas tropicais, como a Indonésia e as Filipinas (McHUGH, 2003; GRAHAM; WILCOX, 2000).

A matriz extracelular é composta por uma rede microfibrilar celulósica associada com uma matriz amorfa. A rede microfibrilar é constituída de celulose e, em alguns casos, substituintes de xilose e carbonato de cálcio. Na porção amorfa encontram-se as mucilagens (polímeros de D-xilose, D-glucose, D-ácido glucorônico e galactose, podendo ocorrer também mananas sulfatadas) e principalmente as galactanas.

Dessa forma, em contraste à maioria das algas, as Rhodophytas são mais emolientes devido à porção da parte amorfa ser muito maior do que o componente fibrilar (celulose) e como biossintetizam uma ampla variedade de galactanas como principal constituinte, são exploradas economicamente (USOV, 2011; GRAHAM; WILCOX, 2000). Em 2009, a produção mundial de hidrocolóides obtidos de algas vermelhas ultrapassou 86 000 toneladas, sendo que 50 mil foram de carragenanas rendendo um valor de US\$ 527 milhões de dólares (BIXLER; PORSE, 2011). Em 2011, as vendas mundiais de carragenanas foram estimadas em US\$ 640 milhões (CARRAGEENAN, 2014).

As principais galactanas extraídas e purificadas são o ágar e as carragenanas (*kappa-*, *iota-* e *lambda-*) que possuem a propriedade de formar géis em solução aquosa (hidrocolóides) e por isso participam ativamente em setores industriais economicamente importantes, como a indústria alimentícia e farmacêutica (LAHAYE, 2001; GRAHAM; WILCOX, 2000; RUITER; RUDOLPH, 1997).

O ágar, ou agarose em sua forma mais purificada (LAHAYE, 2001), é conhecido por possuir um alto poder gelificante (USOV, 2011). Na indústria farmacêutica, é utilizado há muito tempo como um laxante suave. Também é

utilizado em cultivos de microorganismos e géis de eletroforese (McHUGH, 2003). O ágar pode ser encontrado na ordem Gracilariales e constituem esse grupo os gêneros *Gracilaria*, *Gelidiales*, *Gelidium* e *Pterocladia* (GRAHAM; WILCOX, 2000; SOUZA *et al.*, 2012). No Brasil, a espécie *Gracilaria birdiae* é a maior produtora do biopolímero (PLASTINO; URSI; FUJII, 2004). Em relação à nomenclatura, o termo “ágar”, ou “ágar-ágar”, é conhecido há muito tempo, já os termos “agarose” e “agaropectina” foram introduzidos por analogia a amilose e amilopectina.

“Carragenana” é um nome céltico derivado do nome coloquial *carrageen* dado por moradores da costa sul da Irlanda à espécie *Chondrus crispus* que ocorre em ambos os lados do Atlântico Norte, sendo conhecida como musgo irlandês e há muito utilizada para a alimentação, medicina e extração de carragenanas (GRAHAM; WILCOX, 2000; McHUGH, 2003). Os principais gêneros produtores das carragenanas comerciais *Eucheuma*, *Hypnea* e *Chondrus* encontram-se na ordem Gigartinales (GRAHAM; WILCOX, 2000).

2.1.1 Estrutura geral de galactanas

As galactanas são polímeros de cadeias lineares constituídas quimicamente de unidades repetitivas alternadas de (1→3)-β-D-galactopiranosose (unidade A) e (1→4)-α-galactopiranosose (unidade B) (FIGURA 1). As unidades A possuem sempre a estereoquímica D e as unidades B são responsáveis pela classificação geral das galactanas em carragenanas (estereoquímica D) e agaranas (estereoquímica L) (USOV, 1992) formando o arranjo alternado A e B (AB)_n. Um terceiro grupo de galactanas denominados DL-híbridos foram caracterizados. Nestas galactanas são encontradas unidades B tanto na forma enantiomérica L- quanto D- (STORTZ; CERREZO, 2000).

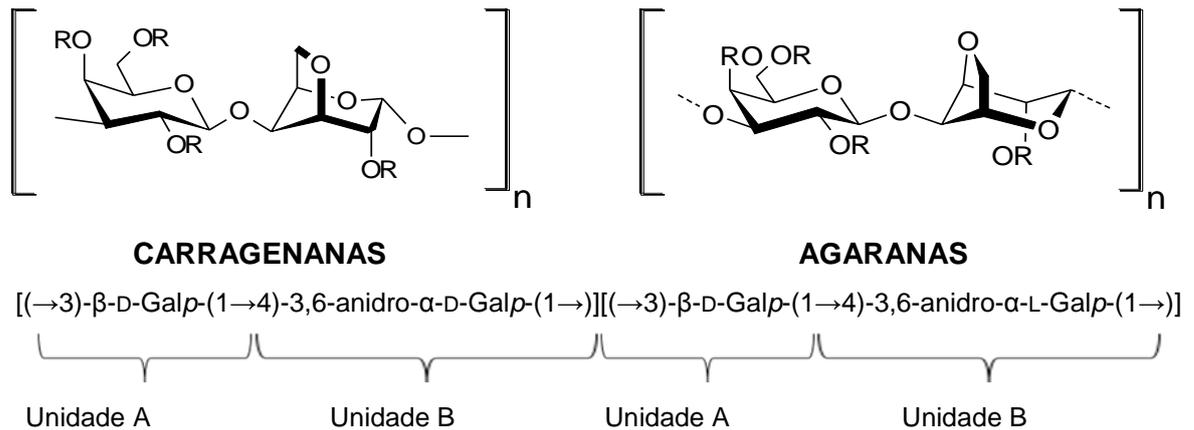


FIGURA 1- ESTRUTURAS DISSACARÍDICAS DE GALACTANAS EXTRAÍDAS DAS ALGAS VERMELHAS. R= H, SO₃⁻
 FONTE: O autor (2015)

Ainda a unidade B pode ser frequentemente encontrada na forma ciclizada como 3,6-anidrogactose. A presença desse anidro-açúcar confere aos polissacarídeos de algas vermelhas propriedades viscosantes ou gelificantes (USOV, 1992, 2011; RENN, 1997) com elevada capacidade de formação de géis, sendo denominados ficocolóides ou hidrocolóides. *In vivo*, a formação das unidades de 3,6-anidrogactose ocorre com a eliminação simultânea de um grupo sulfato em C6 e um próton do grupo hidroxila em C3 do resíduo 4-O-ligado sob ação enzimática (JONES; PEAT, 1942; REES, 1961).

Em relação à nomenclatura das unidades monossacarídicas, Knutsen *et al.* (1994) propuseram uma notação para se referir as estruturas repetitivas do ágar e das carragenanas, onde a letra **G** corresponde a unidade (1→3)-β-D-galactopiranoose, as letras **D** e **L** referem-se respectivamente as unidades 4-O-ligadas α-D-galactopiranoose e α-L-galactopiranoose, e as letras **DA** e **LA**, aos respectivos derivados 3,6-anidro-α-galactopiranoose. Os grupos substituintes foram definidos como **M** para metil éter, **P** para piruvato, **S** para éster sulfato, sendo que a substituição no monossacarídeo é dada pelo número do carbono ao qual o grupo está ligado (KNUTSEN *et al.*, 1994; LAHAYE, 2001).

Vários grupos hidroxil podem estar sulfatados ou metilados, ou ainda substituídos por 4,6-O-(1'-carboxietilideno) e algumas vezes por monossacarídeos adicionais como D-xilose, mono-O-metilgalactoses e D-ácidos glucorônicos. Embora as carragenanas sejam caracterizadas pela presença dos grupos sulfatos, as agaranas também podem apresentá-los. Como resultado, a estrutura das galactanas

pode apresentar uma ampla diversidade estrutural com diferentes unidades repetitivas (USOV, 1992, 1998, 2011).

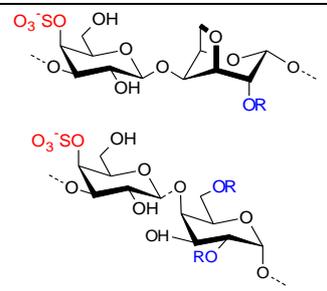
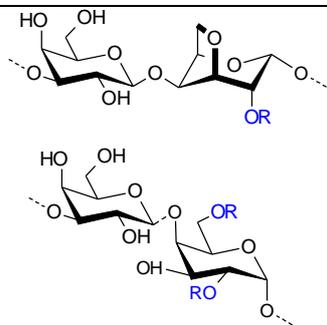
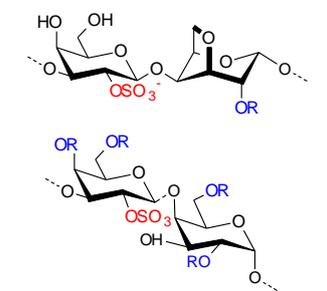
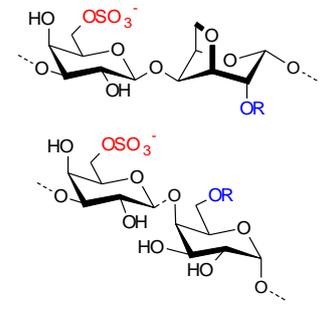
2.2 CARRAGENANAS

A estrutura repetitiva da carragenana é um dissacarídeo composto por uma unidade β -D-galactopiranosose ligado a uma α -D-galactopiranosose ou 3,6-anidro- α -D-galactopiranosose (FIGURA 1). Como principais substituintes, os grupos sulfatos variam de 22 a 38% em peso nas carragenanas comerciais (VELDE *et al.*, 2002a), sendo as espécies *Chondrus crispus*, *Gigartina stellata*, *Iridaea spp.*, *Eucheuma spp.* e *Kappaphycus spp.* as mais utilizadas para a extração destes polímeros (PRAJAPATI *et al.*, 2014).

As carragenanas são classificadas de acordo com os diferentes números, posições de grupos sulfatos e com a presença ou ausência da 3,6-anidro- α -D-galactopiranosose, conduzindo a 42 estruturas dissacarídicas teoricamente diferentes (STORTZ; CERESO, 1992; CAMPO *et al.*, 2009). Sobretudo, apenas 15 foram identificados nas galactanas (LAHAYE, 2001) ocorrendo em diferentes combinações e podendo variar entre espécies e diferentes estágios de vida das algas vermelhas (GRAHAM; WILCOX, 2000).

Dependendo da quantidade e posição dos grupos sulfato, as carragenanas foram denominadas utilizando letras gregas, tais como, λ (lambda), κ (kappa), ι (iota), ν (nu), μ (mu), θ (theta) e ξ (Ksi) (McHUGH, 1987). Inicialmente as carragenanas foram divididas em três famílias, denominadas em *Kappa*, *Lambda* e *Beta* (GREER; YAPHE; 1984). Posteriormente, foi isolado um novo tipo de carragenana, criando uma nova família nomeada de *Ômega* (MOLLION; MOREAU; CHRISTIAN, 1986). O agrupamento nas quatro famílias foi realizado de acordo com a posição dos grupos sulfato na unidade de β -D-galactopiranosose: a Família Kappa (κ) possui grupos sulfato em C4; na Família Lambda (ι) os grupos sulfato substituem C2; na Família Ômega (ω) o grupo sulfato está em C6; a Família Beta (β) não possui grupos sulfato na unidade β . Contudo, carragenanas com um padrão complexo de sulfatação não são classificadas em nenhuma destas famílias (KNUTSEN *et al.*, 1994). Na TABELA 1 são mostradas 15 díades repetitivas.

TABELA 1- CLASSIFICAÇÃO DAS CARRAGENANAS DE ACORDO COM O PADRÃO DE SULFATAÇÃO

Estruturas ^a		(→3)-O-β-D-Galp	(→4)-O-α-D-Galp	Código de letras
Família	Subtipo	Unidade A	Unidade B	
 <p><i>Kappa (k)</i></p>	<i>k (kappa)</i>	β-D-Galp-4-sulfato	3,6-anidro-α-D-Galp	G4S-DA
	<i>ι (iota)</i>	β-D-Galp-4-sulfato	3,6-anidro-α-D-Galp-2-sulfato	G4S-DA2S
	<i>μ (mu)</i>	β-D-Galp-4-sulfato	α-D-Galp-6-sulfato	G4S-D6S
	<i>ν (nu)</i>	β-D-Galp-4-sulfato	α-D-Galp-2,6-dissulfato	G4S-D2S, 6S
	<i>ο (omicron)</i>	β-D-Galp-4-sulfato	α-D-Galp-2-sulfato	G4S-D2S
 <p><i>Beta (β)</i></p>	<i>(β) Beta</i>	β-D-Galp	3,6-anidro-α-D-Galp	G-DA
	<i>α (alfa)</i>	β-D-Galp	3,6-anidro-α-D-Galp-2-sulfato	G-DA2S
	<i>γ (gamma)</i>	β-D-Galp	α-D-Galp-6-sulfato	G-D6S
	<i>δ (delta)</i>	β-D-Galp	α-D-Galp-2,6-dissulfato	G-D2S, 6S
 <p><i>Lamda (λ)</i></p>	<i>(λ) Lamda</i>	β-D-Galp-2-sulfato	α-D-Galp-2,6-dissulfato	G2S-D2S, 6S
	<i>ξ (xi)</i>	β-D-Galp-2-sulfato	α-D-Galp-2-sulfato	G2S-D2S
	<i>θ (theta)</i>	β-D-Galp-2-sulfato	3,6-anidro-α-D-Galp-2-sulfato	G2S-DA2S
	<i>π (pi)</i>	β-D-Galp-4,6-O-(1-carboxietilideno)	α-D-Galp-2-sulfato	GP-D2S
 <p><i>Omega (ω)</i></p>	<i>(ω) Omega</i>	β-D-Galp-6-sulfato	3,6-anidro-α-D-Galp	G6S-DA
	<i>ψ (psi)</i>	β-D-Galp-6-sulfato	α-D-Galp-6-sulfato	G6S-D6S

FONTE: Adaptado de Knutsen *et al.* (1994) e Lahaye (2001)NOTAS: ^aR = SO₃⁻ ou H

As carragenanas mais prevalentes e de maior interesse comercial são a *kappa*, *iota*- e a *lambda*-carragenana. De acordo com suas propriedades elas podem ser divididas em gelificantes (*kappa* e *iota*) e espessantes (*lambda*) (PRAJAPATI *et al.*, 2014).

Para a formação dos géis é necessária a presença da 3,6-anidro- α -D-galactopiranosose e da interação dos grupos sulfato com cátions específicos, como o K^+ (USOV, 1992). Em condições de resfriamento, a partir de um estado de enrolamento aleatório, as cadeias de *kappa*- e *iota*-carragenanas formam duplas hélices entre as regiões repetitivas da molécula, porém em regiões sem regularidade, há formação de duplas hélices com outra cadeia (HOFFMANN *et al.*, 1995). As duplas hélices se unem formando pequenos domínios ordenados envolvendo um número limite de cadeias. Quando há a presença de contra-íons como K^+ , Rb^+ , Cs^+ e NH_4^+ , os domínios se unem através de uma agregação hélice-hélice e forma-se uma rede coesiva com maior associação gerando um gel firme e resistente (MORRIS; REES; ROBINSON, 1980).

As carragenanas diferem nas propriedades de seus hidrogéis, sendo isso um reflexo de suas diferenças estruturais. A *kappa*-carragenana, por exemplo, apresenta hidrogéis derivados de hélices agregadas, pois estas moléculas não formam domínios ordenados, assim, não gelificam em condições sem agregação o que faz com que seus géis sejam quebradiços. Por outro lado, a *iota*-carragenana pode apresentar a formação de hélices com íons metálicos como Li^+ , Na^+ e $(CH_3)_4N^+$ não formando os agregados, o que provoca flexibilidade e suavidade aos géis.

Durante a formação das duplas hélices, a sequência é interrompida pelas unidades precursoras da unidade 3,6-anidro, a α -D-galactose 6-sulfato na *mu*-carragenana e α -D-galactose 2,6-disulfato na *nu*-carragenana, o que é responsável por uma grande alteração na forma da molécula. Assim, unidades precursoras são importantes para a formação de gel, mas em grandes quantidades dificultam a formação das hélices, podendo prejudicar o processo de geleificação (VELDE *et al.*, 2002a, 2002b).

A indústria para diminuir gastos durante a extração submete as carragenanas à extração alcalina, um método que permite a ciclização das unidades precursoras como acontece naturalmente nas algas por ação enzimática (USOV, 1998), aumentando o poder gelificante. Em escala laboratorial este método químico é chamado de tratamento alcalino (NOSEDA; CERZO, 1995).

A *lambda*-carragenana não possui propriedade gelificante e é mais hidrofílica que a *iota*-, que por sua vez é mais hidrofílica que a *kappa*-carragenana (PRAJAPATI, *et al.*, 2014). Abaixo se encontra uma representação esquemática do modelo em domínios para a geleificação de carragenanas (FIGURA 2).

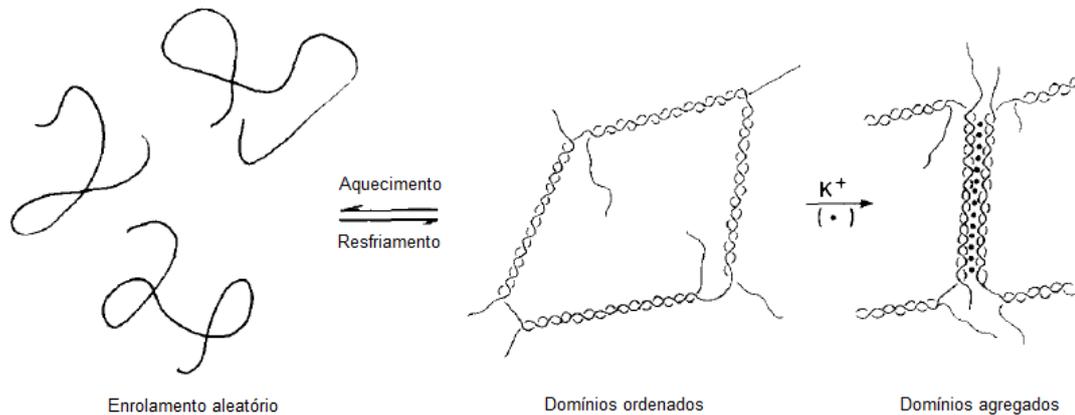


FIGURA 2- REPRESENTAÇÃO DO MODELO DE DOMÍNIOS PARA A GELEIFICAÇÃO DE CARRAGENANAS. A estrutura intermediária é estável apenas para a *iota*-carragenana sob condições iônicas (ex. $(\text{CH}_3)_4\text{N}^+$). Para a *kappa*- e *iota*-carragenana na presença de cátions (•) (K^+ , Rb^+ e Cs^+ , NH_4^+) ocorre a formação de domínios agregados. Estão sendo mostrados apenas cátions ligados relevantes para o modelo.

FONTE: Reproduzido de MORRIS, E. R.; REES, D. A; ROBINSON, G. Cation-specific aggregation of carrageenan helices: domain model of polymer gel structure. *Journal of Molecular Biology*, v. 138, p. 349–362, Copyright (1980), com a permissão da Elsevier.

2.2.1 Aplicações industriais

Devido suas propriedades, as carragenanas têm sido extensivamente utilizadas na indústria alimentícia possuindo funções como espessante, emulsificante, gelificante, agente de volume, estabilizadora de viscosidade e textura.

Por meio da interação com outras substâncias como, por exemplo, proteínas, fosfatos de cálcio ou sódio, amidos, galactomananas e carboximetilcelulose, as carragenanas melhoram a aparência, mantêm a homogeneidade, textura e paladar de alimentos derivados de leite, cremes de chantilly e sobremesas congeladas (CAMPO *et al.*, 2009; PRAJAPATI *et al.*, 2014).

As carragenanas também podem ser encontradas em carnes processadas substituindo gorduras, como por exemplo, em hambúrgueres (McHUGH, 2003) e na

forma de películas encobrimdo frutas (reduz a respiração destas, mantendo a textura e fornecendo proteção antibacteriana) (BICO *et al.*, 2009; PLOTTO *et al.*, 2004, 2006). Em 2014, passaram a ser incluídas em vegetais fermentados (como cogumelos, raízes e tubérculos, legumes), peixes congelados, produtos de peixe, moluscos e crustáceos, cafés, chás e infusões herbárias (CODEX ALIMENTARIUS, 2014, p.114).

Além destas aplicações, as carragenanas possuem outras utilizações como em alimentos para animais, pastas de dentes, na cosmética, na indústria têxtil (ZACHAROPOULOS; PHILLIPS, 1997) e mais recentemente na indústria farmacêutica (CAMPO *et al.*, 2009; PRAJAPATI *et al.*, 2014). Por exemplo, Teruel e colaboradores (1997) utilizaram a *kappa*-carragenana para imobilizar *Streptomyces aureofaciens* a fim de aperfeiçoar a produção de tetraciclina e clorotetraciclina, um dos mais importantes grupos de antibióticos. Essa mesma carragenana já vem sendo utilizada desde 1973 para imobilizar células para a produção de ácido L-aspártico. Desde então, a indústria vem produzindo inúmeros compostos para utilização em alimentos e aplicações médicas como L-ácido-málico, L-alanina, L-triptofano, 1,5-dimetil-2-piperidônio (VELDE *et al.*, 2002b).

A TABELA 2 fornece a informação de alguns produtos em que as carragenanas podem ser comumente encontradas.

TABELA 2- APLICAÇÕES E FUNÇÕES DAS CARRAGENANAS EM DIFERENTES PRODUTOS

Aplicação	Proposta para adição/ação no produto	Referência
Queijo cottage	Prevenção na separação de proteínas.	McHugh (2003)
Sorvetes	Prevenção na separação causada por adição de outros produtos, da formação do soro, estabilizante e emulsificante.	McHugh (2003)
Geléias de baixa caloria	Substituição da pectina.	Campo <i>et al.</i> (2009); McHugh (2003)
Produtos de aves pré-cozidos	Melhora da textura e mantém a suculência.	McHugh (2003)
Alimentos enlatados para animais	Estabilização dos lipídeos; espessante.	McHugh (2003)
Cervejas	Clarificação através da precipitação com proteínas.	McHugh (2003)
Peixes	Adição prévia ao processamento para retenção de água.	McHugh (2003)
Frutas pouco embaladas	Diminui/controla a descoloração, mantém a textura.	Bico <i>et al.</i> (2009) e Plotto <i>et al.</i> (2006)
Pasta de dente	Ligante.	Campo <i>et al.</i> (2009); Prajapati <i>et al.</i> (2014)
Loções	Espessante e emoliência.	Campo <i>et al.</i> (2009); Prajapati <i>et al.</i> (2014)
Tintas à base de água	Suspensão, controle do fluxo e estabilização da emulsão.	Prajapati <i>et al.</i> (2014)

FONTE: Adaptado de McHugh (2003) e Prajapati *et al.* (2014)

Há dois tipos de carragenanas, as de baixa massa molecular, degradadas, ou as que possuem alta massa molecular. De acordo com a definição da *United States Adopted Name (USAN)*, carragenanas com baixa massa molecular são chamadas de “poligenanas” e possuem massa molecular média entre 10 e 20 KDa. Elas são produzidas por processos de hidrólise ácida e não são utilizadas em alimentos por apresentarem certa toxicidade.

Em uma revisão realizada por Tobacman (2001), foi concluído que a exposição às carragenanas degradadas/não degradadas está associada com lesões como úlceras em diferentes modelos animais (camundongos, ratos, coelhos, macacos, furão). Esses resultados suscitaram a criação de regulamentos pelo *Food and Drug Administration (FDA)* para a utilização de carragenanas comerciais, não sendo permitida a utilização de carragenanas com massa menor que 100 KDa.

Autoridades mundiais como o *Joint FAO/WHO Expert Committee on Food*

Additives (JECFA) e *International Food Additives Council* (IFAC) avaliaram a segurança das carragenanas. Contraditoriamente aos resultados de Tobacman (2001), as autoridades concordam que o uso de carragenanas em alimentos é seguro, mas como as carragenanas degradadas foram associadas a efeitos adversos, como medida preventiva o JECFA declarou o uso de carragenanas em produtos infantis como não recomendado (JECFA, 2007).

Como as carragenanas de baixa massa molecular induzem a ativação de macrófagos e a inflamação, são utilizadas para o desenvolvimento de anti-inflamatórios em modelos animais (PASCHAPUR *et al.*, 2009; WIJESEKARA; PANGESTUTI; KIM, 2011).

2.2.2 Aplicações biológicas

A atividade anticoagulante das carragenanas foi demonstrada há mais de setenta anos. Assim como suas estruturas químicas variadas, sua atividade anticoagulante também é bem variada. No trabalho de Silva *et al.* (2010), foi determinada a atividade anticoagulante por Tromboplastina parcial ativada (aPTT) das carragenanas *iota-*, *kappa-* e *lamda-*. Neste estudo, a *lamda-*carragenana exibiu a maior atividade anticoagulante (240s a 20 µg), porém muito abaixo do que a da heparina (250s a 2,5 µg).

Estudos de atividades antitumorais com carragenanas também têm apresentado resultados promissores *in vitro* e *in vivo* (ZHOU *et al.*, 2004, 2006). Em relação a atividade antioxidante, Souza e colaboradores (2007) observaram que existe uma correlação dependente entre a atividade antioxidante e a quantidade de sulfato. Em um estudo realizado com a *iota-*carragenana, observou-se que esta teve um efeito mais elevado na inibição da formação de íons hidroxila em relação à *kappa-*carragenana (SOUZA *et al.*, 2012).

Ainda há relatos de propriedades imunomodulatórias e também anti-hiperlipidêmicas (PANLASIGUI *et al.*, 2003; ZHOU *et al.*, 2004).

Em relação às atividades antivirais, as carragenanas têm apresentado resultados interessantes. Pesquisas vêm demonstrando que as carragenanas apresentam inibição seletiva e bloqueiam a transmissão do vírus da herpes simples

1 e 2 (HSV-1 e HSV-2), da imunodeficiência humana (HIV), papilomavírus humano (HPV), da dengue e o rinovírus humano (HRV) (CÁCERES *et al.*, 2000; BUCK *et al.*, 2006; GRASSAUER *et al.*, 2008; VO; KIM, 2010). F-Tischer *et al.* (2006) testaram carragenanas isoladas da alga *M. gelidium* e verificaram ser um dos mais potentes polissacarídeos sulfatados obtidos de algas vermelhas inibidores do vírus HSV-2. Talarico *et al.* (2011) observaram que *iota*-carragenana inibe o vírus da dengue 2 (DEN-2) em células do mosquito.

Formulações a partir de carragenanas aliadas com outras drogas antivirais também vêm se mostrando promissoras após a modificação química contra vírus como o HPV e HIV (CAMPO *et al.*, 2009). Por exemplo, Carraguard® é o nome de um microbicida vaginal à base de carragenanas que pode bloquear o HIV e outras doenças sexualmente transmitidas *in vitro*. Finalizada a III fase de ensaios clínicos que envolveram 6000 não-grávidas e mulheres não contaminadas com o vírus, Carraguard® se mostrou seguro e diminuiu a infecção dos vírus HIV, tornando-se uma formulação promissora (ZACHAROPOULOS; PHILLIPS, 1997; SPIELER, 2002; TURVILLE *et al.*, 2008).

No trabalho de Yuan *et al.* (2005) após a modificação química de uma *kappa*-carragenana comercial, onde sulfataram, acetilaram e fosforilaram, foi observado que todos os derivados apresentaram atividade antioxidante maior do que a fração nativa, levando assim, a uma potencialização da atividade já existente.

2.3 OXIDAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS

A oxidação é um método que pode introduzir ao polissacarídeo uma maior capacidade geleificante, complexadora e antifloculante, além de potencializar propriedades biológicas (PEREZ, MONTANARI, VIGNON, 2003).

A oxidação de polissacarídeos envolve métodos com a participação de metais de transição, como cromo, rutênio e tungstênio (SHELDON, 1997; NOYORI; AOKI; SATO, 2003), óxidos de nitrogênio, ozônio, peróxido de hidrogênio (oxigênio na presença de Pt), periodato de sódio e diferentes compostos halogenados (NaOCl, NaClO₂, NaClO₃, NaBrO₃, ClO₂) (PONEDEL'KINA; KHAIBRAKHMANOVA; ODINOKOV, 2010). Contudo, estes métodos oxidam tanto hidroxilas primárias

quanto secundárias, não sendo quimiosseletivos. Além disso, podem provocar a clivagem de ligações glicosídicas (ISHAK; PAINTER, 1973; PAINTER, 1988).

Hassan *et al.* (2011) realizaram a oxidação das carragenanas comerciais *iota*- e *lambda*- com íon permanganato produzindo derivados cetoácidos. Os autores sugerem que estes produtos podem ser utilizados para encapsular, proteger, liberar componentes bioativos ou funcionais, tais como minerais, peptídeos, proteínas, enzimas, fármacos e lipídeos. Além disso, estes polímeros poderiam ser utilizados como precursores para a síntese de novos biopolímeros e seus géis utilizados como condutores, membranas semipermeáveis, biocatalisadores e resinas de troca catiônica.

2.3.1 Oxidação seletiva utilizando o reagente TEMPO

A oxidação seletiva foi originalmente descrita no estudo de Nooy; Besemer; Bekkum (1995). Utilizando quantidades catalíticas do reagente *N*-oxil-2,2,6,6-tetrametilpiperidina (TEMPO) e hipoclorito/brometo como co-oxidante, os grupos álcoois primários de glucanas foram oxidados e geraram piranosídeos com oxidação superior a 95% sem a presença de produtos secundários.

Assim, a reação utilizando o reagente TEMPO é regiosseletiva, pois oxida as hidroxilas primárias na presença das hidroxilas secundárias, e apresenta alta taxa de reação, ocorrendo em uma única etapa sem necessidade de precauções como atmosfera inerte ou solvente anidro.

Pertencente a classe de compostos referidos como radical nitróxido, durante a reação, o reagente TEMPO (1) é facilmente oxidado para o sal oxoamônio (2) ou reduzido gerando a hidroxilamina (3) (NOOY; BESEMER; BEKKUM, 1995) como apresentado na FIGURA 3:

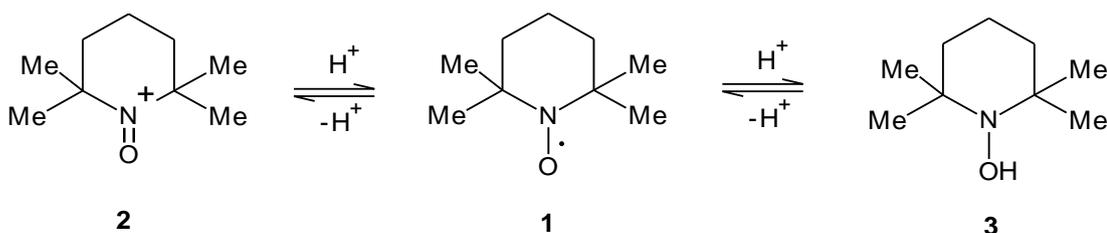


FIGURA 3 - REAÇÃO DE ÓXIDO-REDUÇÃO DO REAGENTE TEMPO
 FONTE: Adaptado de Ponedel'kina; Khaibrakhmanova; Odínokov (2010)

A óxido-redução do TEMPO permite que esse reagente possa ser adicionado em quantidades catalíticas (em grande parte dos estudos, 1% do substrato) e ser regenerado continuamente *in situ* durante a reação por um co-oxidante (FIGURA 4).

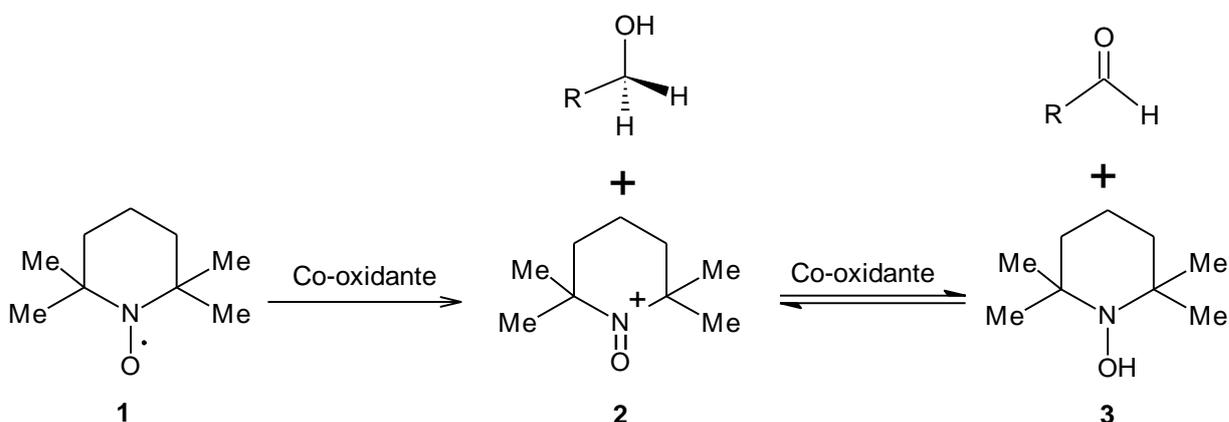


FIGURA 4- OXIDAÇÃO DE ÁLCOOIS UTILIZANDO O REAGENTE TEMPO E CO-OXIDANTE
 NOTA: R¹ e R² = H, alquil, alil, aril
 FONTE: Adaptado de Ponedel'kina; Khaibrakhmanova; Odínokov (2010)

A oxidação resulta em um rendimento elevado (NOOY; BESEMER; BEKKUM, 1995; ANELLI *et al.*, 1998; LUCA *et al.* 2003; PEREZ, MONTANARI, VIGNON, 2003; BRAGD; BEKKUM; BESEMER, 2004; ANGELIN *et al.*, 2006) e gera diminuição de custos (MILLER; HOERRNER, 2003), sendo por isso apontada como um método seletivo, eficiente e bem controlado para oxidar hidroxilas primárias de polissacarídeos e outros álcoois (KATO, MATSUO, ISOGAI, 2003; PEREZ, MONTANARI, VIGNON, 2003; BRAGD; BEKKUM; BESEMER, 2004).

Para os biopolímeros representa um dos mais importantes avanços na modificação química de polissacarídeos devido ao grande interesse nos ácidos poliurônicos formados e nos intermediários, como aldeídos e hemiacetais que

podem ser utilizados como precursores em sínteses de novos biopolímeros. Entre outras aplicações dos ácidos poliurônicos formados, se encontram utilização em colas, espessantes, absorventes, aditivos para alimentos e cosméticos, corantes e fármacos até às atividades biológicas (PEREZ, MONTANARI, VIGNON, 2003; PONEDEL’KINA; KHAIBRAKHMANOVA; ODINOKOV, 2010).

Diferentes co-oxidantes têm sido utilizados em reações de oxidação seletiva de diversos álcoois primários e secundários para regeneração do reagente TEMPO, tais como, os ácidos trihaloisocianúricos, O_2-Cu , hipoclorito de sódio (NaClO), clorito de sódio, ($NaClO_2$), bromito de sódio, (NaBrO), *N*-clorosuccinimida, $Cu(NO_3)_2$, $H_2O_2-HBr-MeReO_3$, IO_5 , peróxido em presença de prata, $K_3[Fe^{3+}(CN)_6]$, $PhICl_2$ (PONEDEL’KINA; KHAIBRAKHMANOVA; ODINOKOV, 2010). Para a oxidação de polissacarídeos poucos co-oxidantes são encontrados, sendo o NaOCl–NaBr o mais comum. Na TABELA 3, encontram-se alguns sistemas co-oxidantes utilizados em oxidação seletiva de alguns polissacarídeos.

TABELA 3- OXIDAÇÕES DE POLISSACARÍDEOS UTILIZANDO O REAGENTE TEMPO

Sistemas co-oxidante	Polissacarídeo	Referência
NaOCl–NaBr	Manogalactoglucana	Bae <i>et al.</i> (2011)
	Xantana	Delattre <i>et al.</i> (2014)
	Galactoxiloglucana	Freitas <i>et al.</i> (2004)
	Galactomanana	Souza <i>et al.</i> (2011)
<i>Laccase</i>	Nanofibras de celulose	Jaušovec; Vogrinčič; Kokol (2014)
	Galactomanana	Lavazza <i>et al.</i> (2011)

FONTE: O autor (2015)

Dentre os co-oxidantes existentes, os ácidos trihaloisocianúricos (FIGURA 5) (RIBEIRO; ESTEVES; MATTOS, 2008) são muito interessantes uma vez que não são corrosivos e apresentam economia atômica (isto é, o máximo da massa atômica dos reagentes que pode ser incorporada no produto) (TROST, 1988; WARNER; CANNON; DYE, 2004; GUPTA; PAUL; GUPTA, 2010) contribuindo com a minimização de resíduos e um processo mais eficiente e sustentável (ANGELIN *et al.*, 2006; WARNER; CANNON; DYE, 2004).

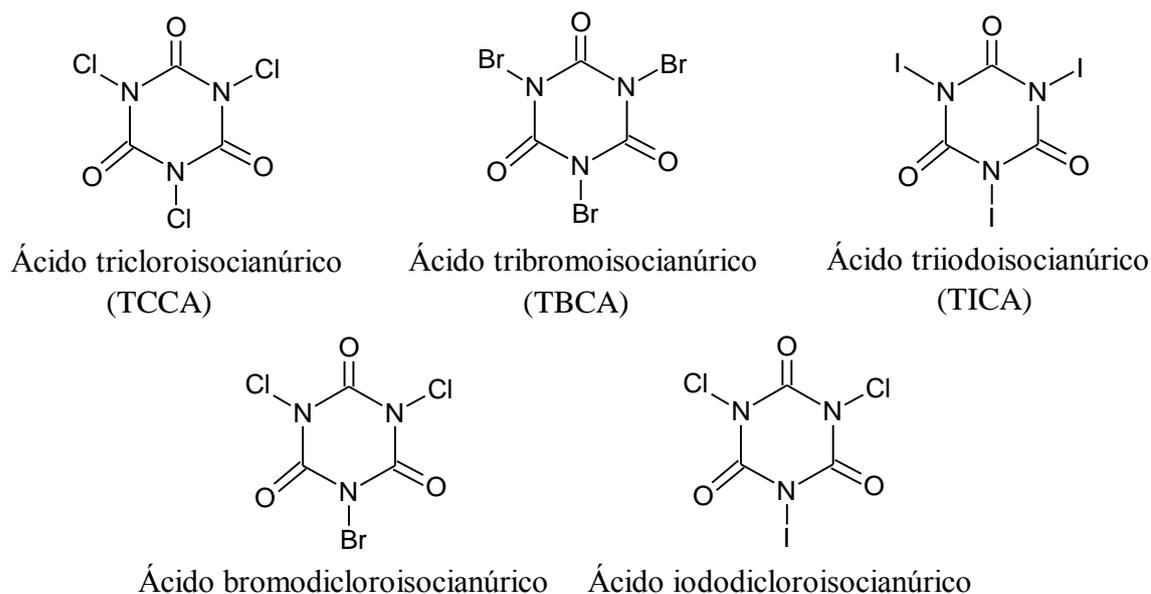


FIGURA 5- ESTRUTURA DOS ÁCIDOS TRIHALOISOCIANÚRICOS
 FONTE: Adaptado de Ribeiro; Esteves; Mattos (2008)

Dentre eles, o ácido tricloroisocianúrico, pela IUPAC, 1,3,5-tricloro-1,3,5-triazina-2,4,6-(1H, 3H,5H)-triona, (TCCA) é um composto conhecido já há muito pela indústria devido as características que apresenta (CHATTAWAY; WADMORE, 1989) como fácil manipulação, baixo custo e estabilidade, sendo facilmente encontrado em um grande número de produtos comerciais devido sua atividade microbiológica, como por exemplo para desinfecção de piscina e produtos de limpeza.

O TCCA catalisa a reação de maneira branda, simples e homogênea (TILSTAM; WEINMANN, 2002; WENGERT; SANSEVERINO; MATTOS, 2002; SOUZA *et al.*, 2007), produzindo ácido hipocloroso após decomposição em água (JUENGE; BEAL; DUNCAN, 1968; BASU *et al.*, 2013; MENDONÇA; MATTOS, 2013). Este reagente pertence à família de N-cloroaminas, podendo agir como agente de cloração ou como oxidante, através da absorção de elétrons. Essa opção é dada pelas condições de síntese empregadas. Em condições ácidas serão obtidas reações de cloração seletiva, enquanto que em condições alcalinas ocorre a oxidação (TILSTAM; WEINMANN, 2002). Dentro das oxidações, são principalmente categorizados dois grupos, transferência de oxigênio (oxidação de éteres, álcoois e aldeídos) e desidrogenação (aminas).

Dessa forma, a união desses dois reagentes (TEMPO e TCCA) permite a oxidação rápida de álcoois primários para aldeídos e ácidos carboxílicos sobre

condições reacionais suaves e com alto grau de quimioseletividade (LUCA; GIACOMELLI; PORCHEDDU, 2001; LUCA *et al.* 2003). Na FIGURA 6 encontra-se um mecanismo proposto por Luca *et al.* (2003) para a oxidação seletiva de um álcool genérico.

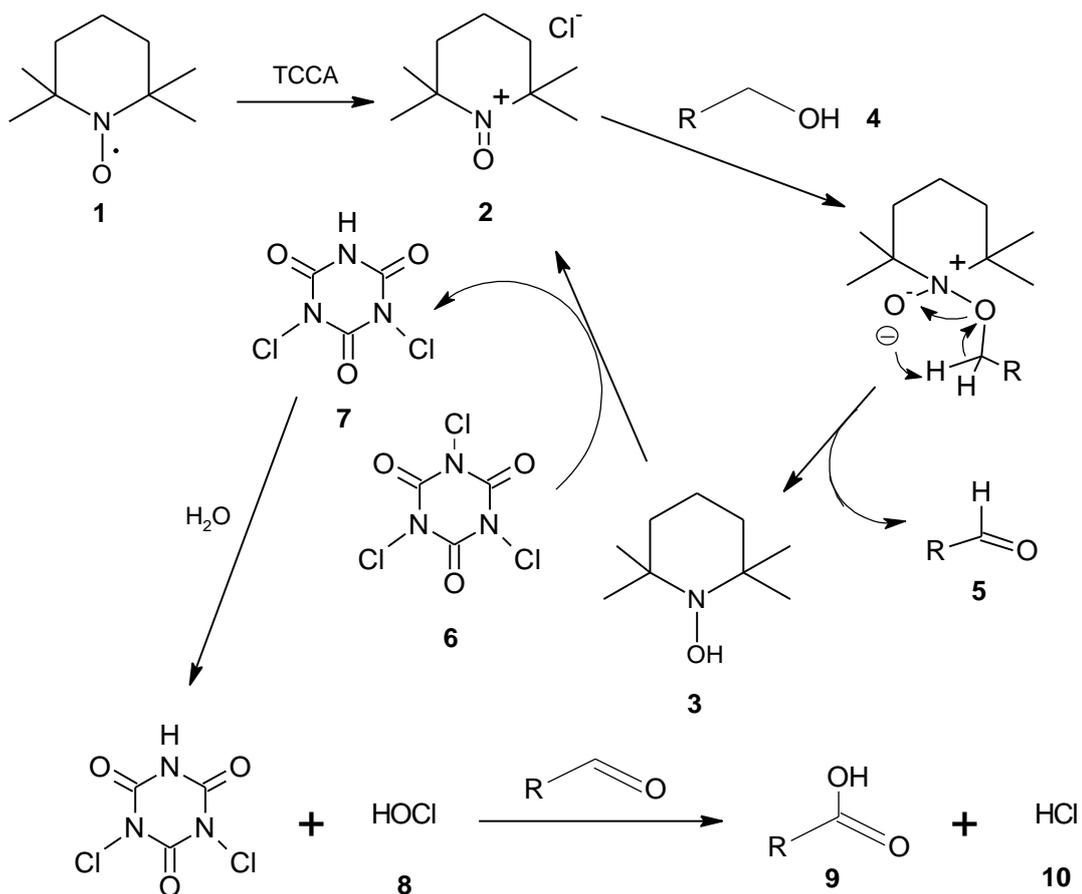


FIGURA 6 - MECANISMO DE OXIDAÇÃO SELETIVA UTILIZANDO O REAGENTE TCCA COMO CO-OXIDANTE
 FONTE: Adaptado de Luca *et al.* (2003)

No mecanismo, uma quantidade catalítica de co-oxidante TCCA (6) pode reagir com o reagente TEMPO (1) para formar o íon oxoamônio (2) que reage com o álcool (4) originando o composto carbonil (5). A hidroxilamina (3) é reoxidada pelo TCCA (6) ao íon oxoamônio (2). A hidrólise do TCCA (6) e seu derivado (7) podem formar o ácido hipocloroso (8) capaz de oxidar o aldeído (5) até o ácido carboxílico (9). Ainda a reação entre os ácidos clorídrico (10) e hipocloroso (9), formados durante o processo, podem originar clorinas capazes de clorinar os compostos carbonílicos formados (SANDERCOCK; BARNETT, 2009).

2.4 ATIVIDADE ANTICOAGULANTE

A hemostasia é o mecanismo responsável por manter a fluidez do sangue. Ele se baseia no equilíbrio da formação do coágulo ou trombo iniciado com agregação plaquetária e reações enzimáticas em cascata para a produção de fibrina (pré-coagulação), na parada de formação do coágulo (anticoagulante) e após a lesão ser reparada, na dissolução do coágulo (fibrinólise) (COLMAN, 2006).

2.4.1 Pré-coagulação

Quando ocorre uma lesão no vaso, inicialmente há a constrição do mesmo para diminuição do fluxo sanguíneo. No modelo clássico da cascata de coagulação, o sistema de coagulação sanguínea envolve duas vias, que para facilitar a interpretação de exames são vistas de forma independentes, ambas convergindo para uma via comum.

A primeira via conhecida como Via extrínseca ou via do fator tissular, tem esse nome porque o fator desencadeante da coagulação não está no sangue circulante. Este fator é chamado de fator tissular (FT) ou tromboplastina tecidual (fator III), expresso na camada endotelial dos vasos sanguíneos e somente é exposto após a lesão do vaso, ligando-se em seguida ao fator VII que se cliva em fator VIIa. Na presença de cálcio (Ca^{2+}) é formado um complexo e inicia-se o processo da cascata até a ativação do fator X em fator Xa. Os fatores III e VII são exclusivos dessa via (DEVLIN, 2007; MURRAY *et al.*, 2007).

A via intrínseca ou via de contato ocorre espontaneamente quando superfícies de membrana aniônicas expostas após a lesão interagem com o sangue. Nesse momento, chamado de “fase de contato”, essas superfícies ligam-se a pré-caliceína, ao cicinogênio, ao fator XII e ao fator XI ativando fator XIa, gerando a caliceína. A caliceína converte mais fator XII em XIIa em um ciclo. O FIIa atua sobre o fator XI gerando o fator XIa. Quando há cálcio, o fator XIa transforma o fator IX em uma enzima ativa (fator IXa) que ativa o fator VIII, formando o complexo na superfície de plaquetas IXa-fosfolípídeos-VIIIa- Ca^{2+} que ativa o fator X.

Pequenas quantidades de trombina são formadas a partir da proteólise da protrombina. Essas quantidades formadas são responsáveis por catalisar a ativação de vários fatores, como o V, o VII, VIII e XIII.

Assim, a via comum é o fator Xa ativando a protombina (fator II) em trombina, e esta converte o fibrinogênio em fibrina (DEVLIN, 2007; MURRAY *et al.*, 2007) (FIGURA 7).

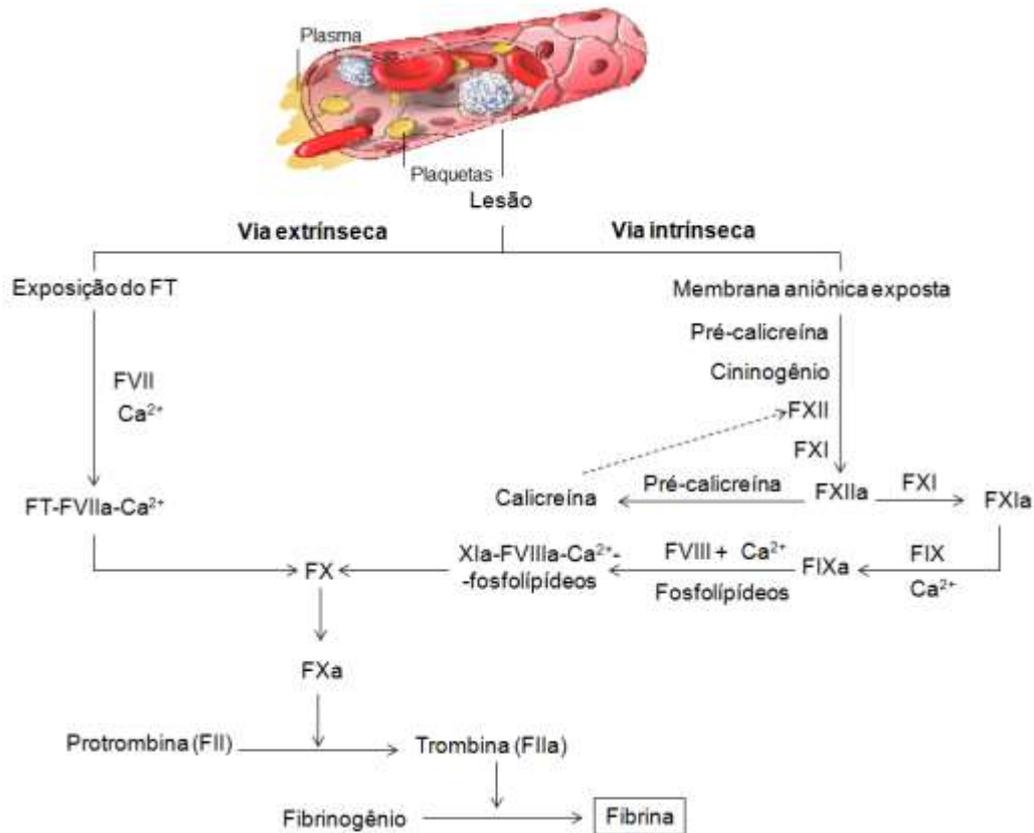


FIGURA 7- VIAS INTRÍNSECA E EXTRÍNSECA DO MODELO CLÁSSICO DA CASCATA DE COAGULAÇÃO
 FONTE: O autor (2015)

A via intrínseca pode também ser desencadeada *in vitro*, quando o sangue entra em contato com superfícies carregadas negativamente como o caulim, a sílica ou o vidro (FRANCO, 2001). O teste de aceitação universal Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada (aPTT), muito utilizado na pesquisa para determinação de atividades anticoagulantes, se baseia nessa característica da via intrínseca. O princípio do teste consiste na adição do reagente aPTT que contém um ativador plasmático (fornece uma superfície de carga altamente negativa para otimizar a ativação de contato dos fatores de coagulação) e fosfolípidos na amostra

teste. O ativador plasmático é o responsável por desencadear o mecanismo de coagulação da via intrínseca através da ativação inicial do fator XII, na presença de íons cálcio (Ca^{2+}). Um dos métodos de detecção utiliza-se de medição ótica da formação de fios de fibrina insolúveis demonstrada pelo aparecimento de um coágulo, que se concentra no caminho da luz, ocasionando a mudança na transmissão de luz do detector (aumento de turbidez), fazendo com que o cronômetro pare indicando o tempo de coagulação (LABTEST, 2010).

2.4.2 Sistema anticoagulante

A fim de evitar a formação excessiva de fibrina e impedir a oclusão vascular, existem mecanismos de regulação. Assim, o sistema anticoagulante atua desde o início da coagulação, podendo inibir a via extrínseca, a trombina, por meio da antitrombina, através da proteína C e do cofator II da heparina.

A inibição da via extrínseca ocorre pelo bloqueio do complexo VIIa/TF através da glicoproteína TFPI (inibidor da via do fator tissular) produzido principalmente nas células do endotélio (DEVLIN, 2007). A trombina é inibida pela antitrombina, uma serpina que circula pela corrente sanguínea. Ela também inibe outras enzimas como os fatores IXa, Xa e XIa e acelera o complexo VIIa/TF (PATEL; BERRY; CHAN, 2007). A proteína C pode clivar os fatores Va e VIIIa. Para isso, primeiro ela precisa ativar-se ligando-se ao seu receptor no endotélio e ao complexo formado entre a trombina e trombotomodulina, outra proteína endotelial, e depois dissociar-se do receptor e ligar-se a proteína S (co-fator) (FRANCO, 2001). O co-fator II da heparina (HCII) é uma glicoproteína semelhante a antitrombina, sendo assim, também inibe a trombina. Sozinha ela não é suficiente para inibir a trombina, mas na presença da heparina, heparan sulfato ou dermatan sulfato tem sua atividade incrivelmente aumentada (TOLLEFSEN, 2007).

2.4.3 Heparina

A heparina é o agente anticoagulante e antitrombótico mais utilizado no mundo para o tratamento de doenças como a trombose, coagulação intravascular disseminada e procedimentos como hemodiálise e coleta de sangue (PETITOU; CASU; LINDAHL, 2003), sendo sua descoberta realizada há quase um século (McLEAN, 1916).

A estrutura da heparina ou heparina não-fracionada (UFH – *unfractionated heparin*) é altamente sulfatada possuindo a maior densidade de carga negativa de qualquer molécula biológica conhecida (CAPILA; LINHARDT, 2002). Assim como qualquer outro polissacarídeo natural, a heparina é composta por uma mistura polidispersa contendo um grande número de cadeias de massas moleculares distintas (AHSAN *et al.* 1995). Sua estrutura majoritária é composta por unidades repetitivas dissacarídicas trissulfatadas de ácido urônico do tipo 1→4 (α -L-idurônico ou β -D-glucurônico) e unidades de α -D-glucosamina (\rightarrow 4]IdoA2S(1→4)GlcNS6S[1→) e em menor adição, por estruturas dissacarídicas correspondendo a sequências variadas (FIGURA 8). As moléculas de ácido α -L-idurônico apresentam-se sulfatadas em OH-2 e as moléculas de α -D-glucosamina apresentam-se N-sulfatadas ou N-acetiladas. A heparina glicosaminoglicana possui massa molecular de 5 a 40 KDa (LINDAHL; HÖÖK, 1978; CAPILA; LINHARDT, 2002; LIU; ZHANG; LINHARDT, 2009).

A antitrombina (AT) se liga a uma sequência pentassacarídica específica na heparina, distribuída aleatoriamente na cadeia polissacarídica, que provoca uma alteração conformacional na heparina e AT resultando na inibição da trombina e outras proteases da cascata de coagulação. Por outro lado, a heparina possui baixa interação com a trombina devido sua elevada densidade de carga negativa, mas se uma cadeia suficientemente longa conter um sítio de ligação AT e puder acomodar a trombina, pode ser formado um complexo terciário que inibe a formação do coágulo (LINDAHL; HÖÖK, 1978; LIU; ZHANG; LINHARDT, 2009).

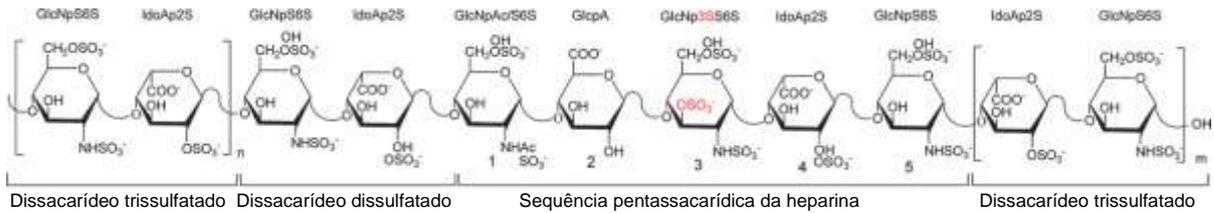


FIGURA 8- SEQUÊNCIA PENTASSACARÍDICA DA HEPARINA

FONTE: Reproduzido de LIU, H.; ZHANG, Z.; LINHARDT, R. J. Lessons learned from the contamination of heparin. *Natural Product Reports*, v. 26, n. 3, p. 313–321, 2009 com a permissão da The Royal Society of Chemistry.

Contudo, a heparina é encontrada em pequenas concentrações na mucosa intestinal de suínos e pulmões bovinos. Por este motivo durante o processo de extração existe o risco de contaminação por patógenos de origem animal como príons e vírus. Ainda, o polissacarídeo obtido pode apresentar grande heterogeneidade estrutural, (MERLI, 2005). Entre 2006 e 2008, o FDA notificou 301 mortes de pacientes que receberam heparina, sendo que destas, 152 estavam relacionadas a reações alérgicas causadas pela contaminação da heparina (FDA, 2009) destacando as dificuldades de monitoramento do controle de qualidade e segurança destes polímeros (TURNBULL, 2011). Como efeitos colaterais à administração da heparina, os pacientes podem apresentar trombocitopenia (AHMED, MAJEED, POWELL, 2007), trombose venosa, embolia pulmonar, oclusão trombolítica de artérias, infarto agudo do miocárdio, derrame cerebral e hemorragia (GREINACHER; WARKENTIN, 2006). Sua aplicação ainda pode causar hematomas, dermatites de contato, urticária e necrose da pele quando administrada pela via subcutânea (PERRINAUD *et al.*, 2006; SCHINDEWOLF *et al.*, 2012).

Assim, embora a heparina seja o fármaco anticoagulante mais utilizado, as inúmeras desvantagens citadas impulsionam a busca por fontes complementares e mais seguras. No caso das galactanas sulfatadas, (SHANMUGAM; MODY, 2000; WIJESEKARA; PANGESTUTI; KIM, 2011) os estudos mostram que no mecanismo de ação anticoagulante o polissacarídeo comporta-se como uma ponte entre a AT e FXa ou trombina, para a potenciação da AT (MELO *et al.*, 2004).

A TABELA 4 apresenta vários polissacarídeos de algas marinhas que já foram isolados, caracterizados e apresentaram atividade anticoagulante.

TABELA 4- POLISSACARÍDEOS SULFATADOS COM ATIVIDADES ANTICOAGULANTES EXTRAÍDOS DE ALGAS MARINHAS

Divisão	Monossacarídeo majoritário	Fonte	Referência
Chlorophyceae	Ramnose	Monostroma latissimum	Mao <i>et al.</i> (2009)
	Arabinose	Codium fragile	Hayakawa <i>et al.</i> (2000)
	Glucose	Codium pugniformis	Matsubara <i>et al.</i> (2000)
	Galactose	Codium cylindricum	Matsubara <i>et al.</i> (2001)
Phaeophyceae	Fucose	Ecklonia cava	Athukorala <i>et al.</i> (2006)
	Fucose	Laminaria japonica	Wang <i>et al.</i> (2010)
	Fucose	Lessonia vadosa	Chandia; Matsuhira (2008)
Rhodophyceae	Galactose	Lomentaria catenata	Pushpamali <i>et al.</i> (2008)
	Galactose	Gigartina skottsbergii	Carlucci <i>et al.</i> (1997)
	Galactose	Schizymenia binderi	Zúñiga; Matsuhira; Mejias (2006)
	Galactose	Porphyra haitanensis	Zhang <i>et al.</i> (2010)

FONTE: Adaptado de WIJESSEKARA; PANGESTUTI; KIM (2011)

3 JUSTIFICATIVA

As carragenanas são polissacarídeos naturalmente sulfatados extraídos das algas marinhas, que representam uma fonte natural, renovável, abundante e de baixo custo. Esses biopolímeros apresentam aplicabilidades industriais e comerciais devido suas propriedades espessantes e geleificantes, e, além disso, aplicabilidades biológicas.

Por meio das modificações químicas é possível aprimorar suas propriedades físico-químicas tanto para às aplicações industriais, como ocorre na reação de ciclização realizada a fim de aumentar o poder geleificante, como também para o aumento da potência das atividades biológicas.

Neste contexto, a oxidação seletiva surge como outra modificação que pode inserir uma nova funcionalidade à cadeia polissacarídica. Esta estratégia tem sido aplicada a outros polissacarídeos solúveis e insolúveis como o amido, amilodextrina, amilopectina, quitosana, galactomanana, celulose, amilose e quitina gerando aplicações como a gelificação, complexação, antifloculação, aumento de solubilidade e atividades biológicas, incluindo a atividade anticoagulante.

A heparina é o anticoagulante mais utilizado na clínica, entretanto, apresenta inúmeros efeitos colaterais, como hemorragia, trombocitopenia e necrose de pele. Por ser obtida a partir de fontes animais, o processamento deste glicosaminoglicano apresenta o risco de contaminações por patógenos. Desta forma, a busca por novos polissacarídeos nativos ou modificados de origem não animal com atividade anticoagulante para a substituição da heparina é um tema de bastante interesse dentro da Glicobiologia.

Em um dos trabalhos mais recentes do nosso grupo de pesquisa, Araújo e colaboradores (2013) realizaram a sulfatação regioseletiva e persulfatação nas carragenanas *iota*-, *kappa*- e *theta*-, e compararam suas atividades anticoagulantes relacionando-as com as estruturas das frações nativas e modificadas quimicamente, observando diferenças significativas entre o padrão de sulfatação e a atividade anticoagulante.

Dessa forma, dando continuidade a este estudo e observando que ainda não há relatos na literatura de oxidação seletiva em carragenanas até o momento, este trabalho teve por objetivo oxidar seletivamente e em diferentes proporções a

hidroxila primária (C6) da unidade β -D-galactopiranosose das carragenanas *kappa*-, *iota/nu*-, *iota*-, *lambda*- e *theta*-, que diferem na quantidade e posição de seus substituintes éster sulfatos e na presença da unidade 3,6-anidro α -D-galactopiranosose utilizando o reagente TEMPO (*N*-oxil-2,2,6,6-tetrametilpiperidina) e TCCA (ácido tricloroisucianúrico) como co-oxidante do processo.

Com o intuito de investigar a influência do grupo carboxila na estrutura do polissacarídeo, foi avaliada a atividade anticoagulante *in vitro* de frações contendo *theta*-carragenana nativa e oxidada em diferentes proporções.

4 OBJETIVOS

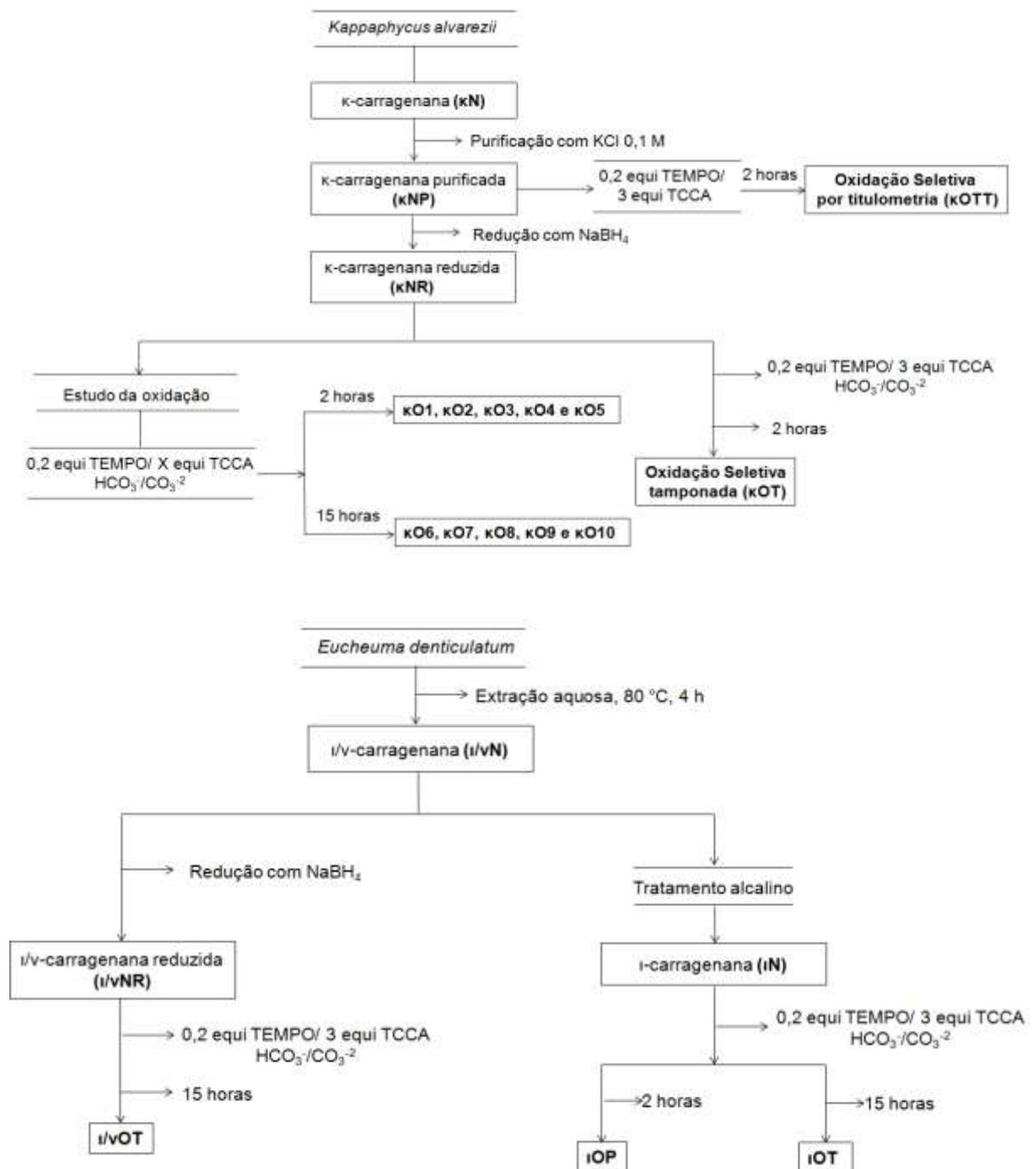
Oxidar seletivamente as carragenanas *kappa*-, *iota*-, *theta*-, *lambda*- e o híbrido *iota/nu* em diferentes graus de oxidação utilizando o catalisador *N*-oxil-2,2,6,6-tetrametilpiperidina (TEMPO) e o co-oxidante ácido tricloroisocianúrico (TCCA).

4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Purificar as carragenanas obtidas da alga vermelha *Kappaphycus alvarezii* através do fracionamento com KCl para obtenção da *kappa*-carragenana;
- Extrair o híbrido *iota/nu*-carragenana da espécie de alga vermelha *Eucheuma denticulatum*;
- Realizar o tratamento alcalino no híbrido *iota/nu*- e na *lambda*-carragenana obtida da alga *Gigartina Skottsbergii* para obtenção das frações *iota*- e *theta*-carragenana;
- Estudar a reação de oxidação seletiva utilizando TEMPO como catalisador e TCCA como co-oxidante adotando a *kappa*-carragenana como modelo;
- Oxidar as carragenanas *kappa*-, *iota*-, *theta*-, *lambda*- e o híbrido *iota/nu* seletivamente em C6 (hidroxila primária) para obter polímeros com diferentes graus de oxidação;
- Avaliar a eficiência do processo de oxidação através de métodos espectroscópicos (RMN de ¹³C e ¹H e Infravermelho);
- Determinar as massas moleculares ponderais médias utilizando HPSEC/MALLS e estimar as massas moleculares relativas utilizando padrões de dextrana, óxido de polietileno e carragenanas nativas e oxidadas;
- Realizar testes anticoagulantes de aPTT, *in vitro*, com os polissacarídeos nativos e modificados da *theta*-carragenana.

5 MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado no Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná (UFPR). O fluxograma do trabalho está mostrado na FIGURA 9. As frações obtidas aparecem em destaque.



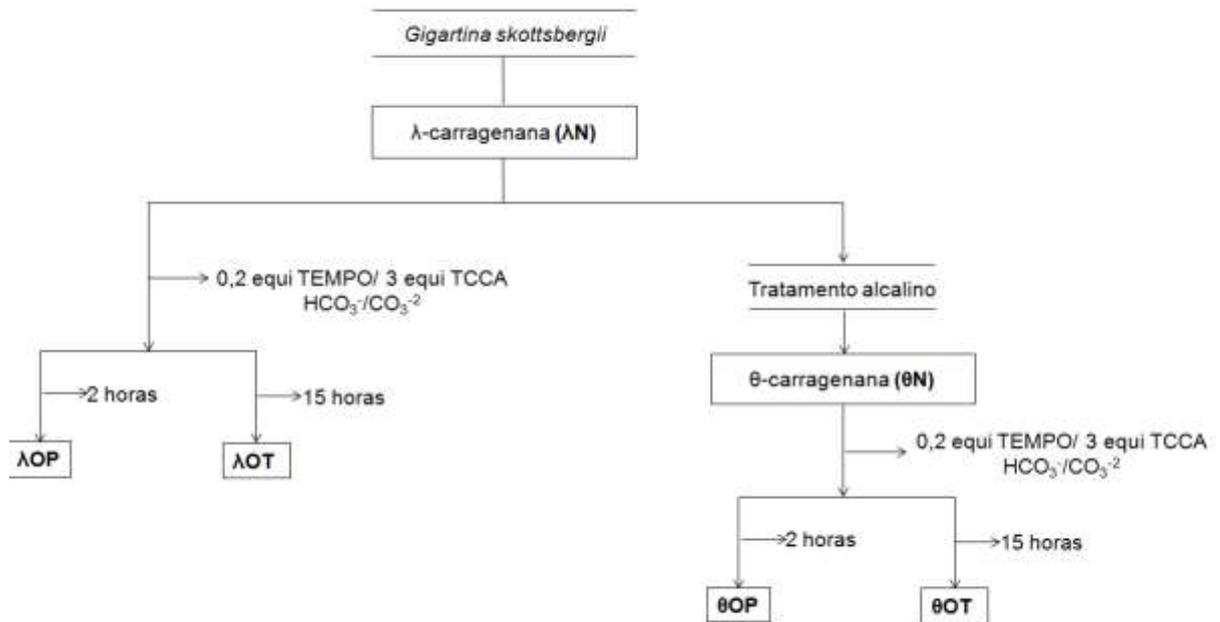


FIGURA 9- FLUXOGRAMA DAS FRAÇÕES OBTIDAS E OXIDADAS SELETIVAMENTE DOS POLISSACARÍDEOS EXTRAÍDOS DAS ALGAS *Kappaphycus alvarezii*, *Eucheuma denticulatum* e *Gigartina skottsbergii*.

FONTE: O autor (2015)

5.1 EXTRAÇÃO E OBTENÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS

5.1.1 *Kappa*-carragenana (κ NP)

Dois extratos polissacarídicos ricos em *kappa* (κ)-carragenana foram obtidos por Araújo (2012) e Ducatti (2009) a partir das extrações da alga vermelha *Kappaphycus alvarezii*, cultivada no litoral norte do estado de São Paulo, município de Ubatuba e coletada em março de 1999 (PAULA; PEREIRA; OHNO, 1999). As extrações ocorreram de acordo com o método de Ohno, Nang e Hirase (1996) e os extratos secos e moídos foram cedidos para a obtenção da κ -carragenana purificada utilizada neste trabalho.

Para a purificação (MATULEWICZ *et al.*, 1989), os extratos polissacarídicos combinados (9,00 g) foram solubilizados em 3,6 L de água destilada com agitação. Em seguida, foi adicionada à mistura KCl (26,80 g) para uma concentração salina final de 0,1 M. A mistura foi agitada por 3 h, seguida de repouso por 16 h, a 4 °C. O gel formado foi centrifugado (8000 rpm, 20°C, 20 minutos). O sobrenadante foi

descartado.

O precipitado foi submetido à diálise fechada em membrana de 12-14 KDa contra uma solução de NaCl 1 M por 24 h, seguida de água deionizada até a remoção do sal, que teve sua saída monitorada através de condutivímetro. A fração retida na diálise foi filtrada em lã de vidro, concentrada no rotaevaporador (50 °C) e liofilizada fornecendo a κ-carragenana purificada nomeada como κNP.

5.1.2 *Iota/nu*-carragenana (ι/νN)

A amostra comercial da alga *Eucheuma denticulatum* foi importada das Filipinas pela indústria Gelymar S.A. (Puerto Montt, Chile) e gentilmente cedida ao Laboratório de Química de Carboidratos da UFPR. Para a extração, na alga seca e moída (4,90 g) foram adicionados 490 mL de água destilada. Essa mistura foi agitada em banho-maria, a 80 °C, por 4 h. Após centrifugação (8000 rpm, a 20°C, por 20 minutos), foi adicionado ao sobrenadante 3 volumes de etanol (1,5 L). As fibras formadas foram recolhidas com o auxílio de um bastão de vidro e ressolubilizadas em água destilada. Esta solução foi dialisada em diálise fechada com membrana de 12-14 KDa primeiramente contra NaCl 1 M por 21 h e em seguida água destilada até a remoção do sal. A fração retida no processo de diálise foi concentrada em rotaevaporador, congelada e liofilizada fornecendo a fração *iota/nu* (ι/ν)-carragenana nomeada como ι/νN.

5.1.3 *Iota*-carragenana (ιN)

A fração ι/νN foi submetida à tratamento alcalino (CIANCIA *et al.*, 1993; VIANA *et al.*, 2004). Uma amostra de 2,00 g foi solubilizada em 1 L de água destilada. Em seguida, foi adicionado 0,200 g de borohidreto de sódio (NaBH₄) e a mistura ficou em agitação durante 18 h. Adicionou-se 0,5 L de solução de NaOH 3 M (concentração final de 1 M) e 0,100 g de NaBH₄. A solução foi aquecida a 80 °C por 30 minutos, resfriada em temperatura ambiente, sendo em seguida neutralizada com

HCl fumegante, em banho de gelo. A solução resultante foi concentrada em rotaevaporador e dialisada em diálise fechada (membrana de 12-14 KDa) com água destilada até a remoção do sal. A fração retida na diálise foi congelada e liofilizada, gerando a ι -carragenana nomeada como ι N.

5.1.4 *Lambda*-carragenana (λ N)

A extração da alga *Gigartina skottsbergii* proveniente da Bahia de Camarones, Província de Chubut, Argentina (GONÇALVES *et al.*, 2005) e purificação através da precipitação com KCl 0,8 M de acordo com a metodologia de Nosedá (1994) foi realizada por Araújo *et al.* (2013) gerando a *lambda* (λ)-carragenana (λ N) gentilmente cedida para utilização neste trabalho.

5.1.5 *Theta*-carragenana (θ N)

A fração λ N foi submetida ao tratamento alcalino. Para isso 2,30 g foi solubilizada em 1,2 L de água destilada e em seguida foi adicionado 0,23 g de NaBH_4 o equivalente a 10% em relação à massa de carboidrato. A mistura resultante foi agitada por 18 h. Em seguida, foi adicionado 575 mL de NaOH 3 M (concentração final de 1 M), a mistura foi agitada por 10 minutos e 0,12 g de NaBH_4 (5% em relação a massa de carboidrato) foi adicionado. A solução resultante foi aquecida a 80° C por 28 h (CIANCIA *et al.*, 1993), resfriada, neutralizada com HCl concentrado (em banho de gelo) e dialisada em diálise fechada (membrana de 12-14 KDa) contra água destilada até a remoção de todo o sal. A solução retida foi liofilizada gerando a θ -carragenana nomeada como θ N.

5.2 REAÇÃO DE OXIDAÇÃO SELETIVA DAS CARRAGENANAS

5.2.1 Reduções das frações κNP e ι/vN

Antes de iniciar as reações de oxidação, as amostras κNP e ι/vN foram submetidas às reações de redução seguindo a metodologia de Araújo *et al.* (2013) para redução dos terminais redutores dos políssacarídeos (ASPINALL, 1982). Assim, cada grama de políssacarídeo foi dissolvido em 100 mL de água deionizada e adicionado 150 mg de NaBH₄. As soluções foram agitadas durante 12 horas e em seguida o pH foi ajustado para 4,5 com ácido acético glacial. As soluções resultantes foram submetidas à diálise fechada (membrana de 12-14 KDa) contra água deionizada até a remoção completa do sal e então, congeladas e liofilizadas, gerando as carragenanas reduzidas κNR e ι/vNR. As frações ιN e θN já haviam passado pela etapa de redução anteriormente, durante o tratamento alcalino e a amostra λN já havia sido reduzida por Araújo *et al.* (2013).

5.2.2 Oxidação seletiva da kappa-carragenana monitorada por titulometria (κOTT)

Esse procedimento foi adaptado das metodologias de Nooy; Besemer; Bekkum (1995); Thaburet *et al.* (2001); Kato, Matsuo, Isogai (2003); Perez, Montanari, Vignon (2003) e Bragd; Bekkum; Besemer (2004). Um equivalente da κNP (50 mg) foi dissolvido em água deionizada (7 mL) e em seguida, 0,2 equivalentes (4,00 mg) de reagente TEMPO foram adicionados sob agitação (solução 1). Paralelamente, 3 equivalentes de TCCA (83,90 mg) foram dissolvidos em água deionizada (43 mL) e o pH foi ajustado para 10 através da adição de 5,3 mL de NaOH 0,5 M (solução 2). Esta solução foi resfriada em banho de gelo e no tempo 0' a solução 1 foi adicionada sobre a solução 2. Todo o experimento foi monitorado utilizando pHmetro (GEHAKA, modelo PG 1800) e conforme a evolução da reação e consequente diminuição do pH, havia adição titulométrica de NaOH 0,021 M até pH 10. Decorrido 2 horas, foi adicionado etanol (21 µL), a solução foi

dialisada em diálise fechada, concentrada e liofilizada, gerando a κ O_{TT} (κ -carragenana oxidada totalmente via titulometria).

5.2.3 Estudo da oxidação seletiva utilizando a *kappa*-carragenana como substrato

Os estudos da oxidação seletiva foram realizadas de modo que as concentrações do polissacarídeo (amostra κ NR) e do catalisador TEMPO fossem mantidas em todos os experimentos e que fosse variado somente as concentrações do co-oxidante TCCA e o tempo de reação. Foram realizadas 5 reações em 2 horas e 5 reações em 15 horas. A TABELA 5 apresenta os valores de massas moleculares e volumes.

TABELA 5- MASSAS MOLARES E VOLUMES UTILIZADOS NO ESTUDO DA OXIDAÇÃO SELETIVA COM A *KAPPA*-CARRAGENANA

Amostra	Tempo de reação (horas)	κ NR (mg)	Reagente TEMPO (mg)	TCCA (mg)	ETANOL (μ L)	NABH ₄ (mg)
κ O1	2	50,4	4,4	5,7	32	46,3
κ O2	2	50,0	4,4	14,0	10	46,9
κ O3	2	50,6	3,8	29,0	22	46,5
κ O4	2	50,0	4,4	57,0	45	47,6
κ O5	2	52,5	4,8	89,8	40	48,6
κ O6	15	46,4	3,7	6,2	5	43,0
κ O7	15	42,0	3,4	12,0	10	34,0
κ O8	15	42,0	3,4	27,0	20	38,0
κ O9	15	52,0	4,2	90,0	40	46,0
κ O10	15	50,0	4,2	89,7	55	47,0

FONTE: O autor (2015)

Para as reações realizadas em 2 horas, um equivalente de κ NR foi polidissolvido em 7 mL de água deionizada e em seguida foram adicionados 0,2 equivalentes de TEMPO (solução 1). Após completa dissolução, as soluções foram mantidas em agitação e colocada em banho de gelo. Paralelamente, 0,2; 0,5; 1; 2 e

3 equivalentes de TCCA foram dissolvidos em 43 mL de soluções tampão gelado $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_3^{2-}$ 1 M durante dois minutos (solução 2). No tempo 0' a solução 2 foi adicionada sobre a solução 1. Duas horas depois foi adicionado etanol e as soluções foram tratadas com NaBH_4 durante 10 min. As soluções foram neutralizadas com ácido acético, dialisadas em diálise fechada em água destilada, concentradas e liofilizadas. Os produtos liofilizados oxidados foram nomeados como κO1 , κO2 , κO3 , κO4 e κO5 , respectivamente.

Para as reações em 15 horas, foi realizado o mesmo procedimento para as oxidações no tempo de 2 horas. Os produtos liofilizados oxidados foram nomeados como κO6 , κO7 , κO8 , κO9 e κO10 .

5.2.4 Oxidação seletiva tamponada da *kappa*-carragenana (κOT)

Em um segundo experimento o controle do pH titulométrico foi substituído por um meio tamponado (tampão 1 M de $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_3^{2-}$) em pH 9,6. Um equivalente de κNR (300 mg) foi dissolvido em 40 mL de água deionizada e em seguida foi adicionado 0,2 equivalentes do reagente TEMPO (23,2 mg) (solução 1). Após completa dissolução, a solução foi mantida em agitação e colocada em banho de gelo. Paralelamente, três equivalentes de TCCA (514 mg) foram dissolvidos em 260 mL de tampão gelado $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_3^{2-}$ 1 M durante dois minutos (solução 2). No tempo 0' a solução 2 foi adicionada sobre a solução 1. A reação prosseguiu durante 2 horas e logo após foram adicionados três equivalentes de etanol (390 μL), e a solução foi tratada com NaBH_4 (279 mg) para redução de eventuais extremidades redutoras formadas. Após 10 min, ainda sob agitação, a reação foi neutralizada com ácido acético glacial até pH 7, foi dialisada em diálise fechada em água deionizada, concentrada e liofilizada gerando o produto liofilizado κOT (κ -carragenana oxidada totalmente).

5.2.5 Oxidação seletiva tamponada do híbrido *iota/nu*-carragenana (i/vOT)

Um equivalente de i/vNR (300 mg) foi dissolvido em 40 mL de água deionizada e em seguida foram adicionados 0,2 equivalentes de TEMPO (19 mg) (solução 1). Após completa dissolução, a solução foi mantida em agitação e colocada em banho de gelo. Paralelamente, três equivalentes de TCCA (423 mg) foram dissolvidos em 260 mL de tampão gelado $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_3^{2-}$ 1 M durante dois minutos (solução 2). No tempo 0' a solução 2 foi adicionada sobre a solução 1. A reação prosseguiu durante 15 horas. Logo após foram adicionados três equivalentes de etanol (320 μL), e a solução foi tratada com NaBH_4 (229 mg) durante 10 min. A solução foi neutralizada com ácido acético, dialisada em diálise fechada em água deionizada, concentrada e liofilizada. O produto liofilizado foi nomeado como i/vOT.

5.2.6 Oxidação seletiva tamponada total (iOT) e parcial (iOP) da *iota*-carragenana

Um equivalente de iN-carragenana (300 mg) foi dissolvido em 40 mL de água deionizada e em seguida foram adicionados 0,2 equivalentes de TEMPO (20 mg) (solução 1). Após completa dissolução, a solução foi mantida em agitação e colocada em banho de gelo. Paralelamente, três equivalentes de TCCA (431 mg) foram dissolvidos em 260 mL de tampão gelado $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_3^{2-}$ 1 M durante dois minutos (solução 2). No tempo 0' a solução 2 foi adicionada sobre a solução 1. A reação prosseguiu por 15 horas e em seguida foram adicionados três equivalentes de etanol (325 μL). A solução foi tratada com NaBH_4 (234 mg) durante 10 min, neutralizada com ácido acético, dialisada em diálise fechada com água deionizada, concentrada e liofilizada. O produto liofilizado foi nomeado como iOT.

Para alcançar o produto com oxidação parcial (iOP), um equivalente de iN-carragenana (300 mg) foi dissolvido em 40 mL de água deionizada e em seguida foram adicionados 0,2 equivalentes de TEMPO (20 mg) (solução 1). Após completa dissolução, a solução foi mantida em agitação e colocada em banho de gelo. Paralelamente, três equivalentes de TCCA (430 mg) foram dissolvidos em 260 mL de tampão gelado $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_3^{2-}$ 1 M durante 2 minutos (solução 2). No tempo 0' a

solução 2 foi adicionada sobre a solução 1. A reação prosseguiu durante 2 horas. Logo após foram adicionados três equivalentes de etanol (325 μ L), e a solução foi tratada com NaBH_4 (233 mg) por 10 min, neutralizada com ácido acético, dialisada em água deionizada, concentrada e liofilizada. O produto liofilizado foi nomeado como λ OP.

5.2.7 Oxidação seletiva tamponada total (λ OT) e parcial (λ OP) da *lambda*-carragenana

Um equivalente de λ N (300 mg) foi dissolvido em 40 mL de água deionizada e em seguida 0,2 equivalentes de reagente TEMPO (17 mg) foram adicionados (solução 1). Após completa dissolução, a solução foi mantida em agitação e colocada em banho de gelo. Paralelamente, três equivalentes de TCCA (370 mg) foram dissolvidos em 260 mL de tampão gelado $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_3^{2-}$ 1 M durante dois minutos (solução 2). No tempo 0' a solução 2 foi adicionada sobre a solução 1. Após 15 horas, foram adicionados três equivalentes de etanol (280 μ L), a solução foi tratada com NaBH_4 (200 mg) (10 min), neutralizada com ácido acético, dialisada em diálise fechada com água deionizada, concentrada e liofilizada. O produto liofilizado foi nomeado como λ OT.

O produto com oxidação parcial (λ OP) foi obtido através da reação de um equivalente de λ N (301 mg) dissolvidos em 40 mL de água deionizada e em 0,2 equivalentes de reagente TEMPO (17 mg) (solução 1) mantida em banho de gelo após solubilização. Paralelamente, três equivalentes de TCCA (372 mg) foram dissolvidos em 260 mL de tampão gelado $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_3^{2-}$ 1 M durante 2 minutos (solução 2). No tempo 0' a solução 2 foi adicionada sobre a solução 1. Após 2 horas de reação foram adicionados três equivalentes de etanol (280 μ L), e a solução foi tratada com NaBH_4 (200 mg) durante 10 min. A solução foi neutralizada com ácido acético e dialisada em diálise fechada com água deionizada, concentrada e liofilizada.

5.2.8 Oxidação seletiva tamponada total (θ OT) e parcial (θ OP) da *theta*-carragenana

Um equivalente de θ N (301 mg) foi dissolvido em 40 mL de água deionizada e em seguida foram adicionados 0,2 equivalentes do reagente TEMPO (20 mg) (solução 1). Após completa dissolução, a solução foi mantida em agitação e colocada em banho de gelo. Paralelamente, três equivalentes de TCCA (420 mg) foram dissolvidos em 260 mL de tampão gelado $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_3^{2-}$ 1 M durante dois minutos (solução 2). No tempo 0' a solução 2 foi adicionada sobre a solução 1. Após 15 horas foram adicionados 3 equivalentes de etanol (325 μL), e a solução foi tratada com NaBH_4 (238 mg) (10 min). A solução foi neutralizada com ácido acético, dialisada em diálise fechada com água deionizada, concentrada e liofilizada. O produto liofilizado foi nomeado como θ OT.

Para obtenção de θ OP (300 mg), a fração θ N foi dissolvida em 40 mL de água deionizada e foram adicionados 0,2 equivalentes do reagente TEMPO (20 mg) (solução 1). Essa solução foi mantida em banho de gelo após total solubilização. Paralelamente, três equivalentes de TCCA (430 mg) foram dissolvidos em 260 mL de tampão gelado $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_3^{2-}$ 1 M durante 2 minutos (solução 2). No tempo 0' a solução 2 foi adicionada sobre a solução 1. A reação prosseguiu durante 2 horas e foi interrompida pela adição de 3 equivalentes de etanol (325 μL). Após, foi adicionado NaBH_4 (233 mg) aguardou-se 10 min e neutralizou-se a solução com ácido acético glacial. O produto foi dialisado em diálise fechada com água deionizada, concentrado e liofilizado.

5.3 MÉTODOS ANALÍTICOS

5.3.1 Determinação de ácido urônico

A reação de oxidação seletiva nos polissacarídeos insere unidades de ácidos urônicos na cadeia. Assim, para acompanhar o sucesso da reação foi utilizada a dosagem de ácidos urônicos baseado no método Filisetti-Cozzi e Carpita (1991).

Este método envolve uma etapa de hidrólise ácida, onde o produto da desidratação ácida reage com o reagente *m*-hidroxidifenil produzindo uma coloração rósea estável que pode ser detectada por espectrometria em 525 nm. A quantificação é realizada por meio de curva padrão do ácido D-galacturônico. A técnica permite determinar a quantidade total de ácido urônico na molécula e possui sensibilidade de 0,97-38,8 µg de ácido urônico em 400 µL de amostra.

Para isso, cada amostra foi solubilizada em água deionizada (1 mg/mL) e 100µL foram pipetados em quatro tubos de ensaio e completados para 400 µL com água deionizada. Nos quatro tubos foram adicionados 40 µL de ácido sulfâmico-sulfamato de potássio 4M em pH 1,6 e 2,4 mL de H₂SO₄ em grau analítico (96,4%) (resfriado em banho de gelo) contendo tetraborato de sódio 75 mM. Os tubos foram agitados em agitador tipo Vortex (VM3000), tampados com bolas de gude e em seguida, aquecidos em banho-maria a 100 °C por 20 min. Os tubos foram colocados em banho de gelo para diminuição rápida da temperatura e por fim, foi adicionado em três dos quatro tubos 80 µL de solução 3-fenilfenol a 0,15 % (p/V) em NaOH a 0,5 % (p/V) seguidos de agitação. O tubo sem 3-fenilfenol refere-se ao branco da amostra. A cor rosa se desenvolve entre 5 e 10 min e tem estabilidade cerca de 1 hora antes de começar a se desvanecer. De cada tubo foi pipetado 200 µL para microplaca de 96 poços e então foi lida a absorbância em 525 nm em espectrofotômetro automático para microplacas da marca BioTek. A concentração de ácidos urônicos na amostra foi determinada contra branco e curva padrão de ácido galacturônico (0,01 a 0,04 mg/µL). Cada leitura foi realizada em triplicata. O branco do equipamento foi feito substituindo o padrão por 400 µL de água deionizada com adição dos demais reagentes.

5.3.2 Determinação do grau de sulfatação ($DS_{\text{Sulfatação}}$)

Os teores de sulfato, assim como o grau de substituição ($DS_{\text{Sulfatação}}$) foram determinados pelo método turbidimétrico (DOGSON, 1960; DODGSON; PRINCE, 1962). Para o preparo da solução de gelatina-bário (5 mg/mL), 200 mg de gelatina foram dissolvidos em 40 mL de água destilada aquecida (60–70°C). A solução foi mantida em refrigerador por 12h. Em seguida foi adicionado BaCl₂ (200 mg) à

solução de gelatina sob lenta agitação e novamente manteve-se sob refrigeração por mais 2h. Os polissacarídeos (1 mg/ml) foram hidrolisados com HCl 1 M por 5 horas em estufa a 110 °C. O hidrolisado (0,2 ml) foi tratado com 3,8 ml de TCA 3% e com 1,0 ml de solução de cloreto de bário-gelatina. Após 15 min a temperatura ambiente, a absorbância foi determinada em espectrofotômetro (360 nm) para cada amostra (em triplicata). Para a calibração do aparelho foi utilizado uma solução branco, onde 0,2 mL da amostra foi substituído por 0,2 mL da solução de HCl 1 M. O teor de sulfato foi determinado em relação a uma curva padrão de sulfato de sódio (30 a 180 µg/mL). O grau de substituição dos polissacarídeos após a sulfatação química foi calculado a partir da Equação 1 (WHISTLER; SPENCER, 1964):

$$DS_{\text{Sulfatação}} = (306,37 \times S) / [3200 - (102 \times S)] \quad (1)$$

Onde:

306,27 = representa 1 mol da unidade dissacarídica repetitiva G-DA nas carragenanas;

3200 = representa a massa atômica do enxofre (32) x 100;

102 = representa 1 mol do éster substituinte (Na_2SO_3);

S = representa o teor de enxofre dado em porcentagem, que é calculado a partir da dosagem do sulfato.

5.3.3 Curvas padrão de polissacarídeos para estimação de massa molecular relativa

Uma série de padrões de dextrana, padrões de óxido de polietileno e carragenanas nativas e oxidadas com massas moleculares ponderais médias determinadas por dn/dc ($\lambda = 180.9$, $\lambda_{OP} = 143.5$, $\lambda_{OT} = 80.1$, $\theta = 65.3$, $\theta_{OP} = 48.4$, $\theta_{OT} = 34.7$, KDa) foram utilizadas para estimar as massas moleculares relativas.

Cada padrão foi solubilizado durante 24 horas na concentração de 1,0 mg/mL em solução de nitrito de sódio NaNO_2 (0,1 mol/L) contendo NaN_3 100 ppm/L, e filtradas em membrana de nitrocelulose (Hexis Científica S/A), com poros de 0,2 µm. Em seguida foram injetadas no cromatógrafo de exclusão

estérica de alta precisão (HPSEC) Waters em conjunto com 4 colunas de gel permeação Ultrahydrogel™ 2000, 500, 250 e 120 conectadas em série com limites de exclusão de 7.10^6 , 4.10^5 , 8.10^4 , 5.10^3 , respectivamente. O cromatógrafo é acoplado a dois detectores, detector de índice de refração diferencial (IR), modelo Waters 2410, e detector de espalhamento de luz laser em multiângulos Wyatt Technology (MALLS), modelo DAWN DSP-F. A fase móvel utilizada foi uma solução de NaNO_2 0,1 mol/L contendo NaN_3 100 ppm/L, com fluxo controlado de 0,6 mL/min, pressão de ~ 800 psi a 25 °C, controladas por bomba WATERS 515 (WYATT, 1993). Os cromatogramas foram registrados e analisados através do software ASTRA versão 450.

A TABELA 6 apresenta os tempos de retenção (min) e as massas moleculares dos padrões de dextrana e óxido de polietileno.

TABELA 6- TEMPO DE RETENÇÃO, M_w E PARÂMETROS DAS CURVAS PADRÕES DE CALIBRAÇÃO

Padrão	Produto	M_w^a ($\times 10^3$ g/mol)	Tempo de retenção (min)	Log M_w	Curva de calibração
Dextrana	D-5251	487	43,9	5,69	$y = -0,1741x + 13,237$ $r^2 = 0,9879$
	D-7265	266	44,4	5,42	
	D-4751	77,8	48,0	4,89	
	D-4133	40,2	49,2	4,60	
	D-9260	9,4	53,4	3,97	
Óxido de polietileno	WAT011584	599	41,0	5,78	$y = -0,1441x + 11,639$ $r^2 = 0,9903$
	WAT011580	177	44,0	5,25	
	WAT011576	41,3	48,3	4,62	
	WAT011574	24,8	50,7	4,39	

FONTE: O autor (2015)

NOTAS: x= tempo de retenção (min); y= log M_w ; r^2 = coeficiente de determinação

^a M_w de acordo com as especificações do fabricante

As curvas padrões de calibração para os padrões de dextrana e óxido de polietileno (ANEXO 1) foram plotadas em uma escala de log das massas moleculares dos padrões contra o tempo de retenção (min) e apresentaram boa linearidade (coeficientes de determinação, $r^2 = 0,9879$ e $r^2 = 0,9903$, respectivamente).

5.3.4 Análise cromatográfica de exclusão estérica de alta precisão acoplada a espalhamento de luz laser em multiângulos (HPSEC-MALLS)

A cromatografia de exclusão estérica de alta precisão acoplada a espalhamento de luz laser em multiângulos (HPSEC-MALLS) foi utilizada para a determinação de homogeneidade e massa molecular ponderal média (M_w) dos polissacarídeos. Para as análises foi utilizado o cromatógrafo modelo Waters 2410 acoplado aos detectores IR/MALLS, cuja fase móvel utilizada foi uma solução de NaNO_2 0,1 mol/L contendo NaN_3 100 ppm/L, com fluxo controlado de 0,6 mL/min, pressão de ~800 psi a 25 °C, controladas por bomba WATERS 515 (WYATT, 1993). Os cromatogramas foram registrados e analisados através do software ASTRA versão 450. O preparo das amostras estão descritos a seguir.

5.3.4.1 Determinação da homogeneidade

Para a análise de homogeneidade, as amostras foram solubilizadas durante 24 e 48 horas na concentração de 1,0 mg/mL em solução de nitrito de sódio NaNO_2 (0,1 mol/L) contendo NaN_3 100 ppm/L, e filtradas em membrana de nitrocelulose (Hexis Científica S/A), com poros de 0,2 μm . Em seguida foram injetadas no cromatógrafo modelo Waters 2410 acoplado aos detectores IR/MALLS como descrito no item 5.3.3. Os cromatogramas foram registrados e analisados através do software ASTRA versão 450.

5.3.4.2 Determinação da massa molecular

Para a determinação da massa molecular ponderal média (M_w) os polissacarídeos tiveram os valores de dn/dc (taxa de variação do índice de refração com relação à concentração) determinados. Para esta análise cada polissacarídeo nativo e modificado foi solubilizado durante 24 e 48 horas na

concentração de 1,0 mg/mL em solução de nitrito de sódio NaNO_2 (0,1 mol/L) e azida de sódio NaN_3 100 ppm/L, e filtradas em membrana de nitrocelulose (Hexis Científica S/A), com poros de 0,2 μm . Em seguida as soluções foram diluídas em cinco diferentes concentrações (0,2, 0,4, 0,6, 0,8 e 1,0 mg/mL), injetadas no cromatógrafo modelo Waters 2410. A fase móvel utilizada foi uma solução de NaNO_2 0,1 mol/L contendo NaN_3 100 ppm/L, com fluxo controlado de 0,6 mL/min, pressão de ~ 800 psi a 25 °C, controladas por bomba WATERS 515 (WYATT, 1993). Os cromatogramas foram registrados e analisados através do software ASTRA versão 450 e analisadas utilizando apenas o detector de índice de refração diferencial (IR).

5.4 MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS

5.4.1 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

As análises de ressonância magnética nuclear (RMN) foram realizadas em espectrômetro BRUKER, modelo AVANCE-DRX operando a frequências de 400 e 600 MHz para ^1H , incorporado a transformador de Fourier no Centro de Ressonância Nuclear, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Paraná. Os experimentos foram realizados utilizando tubos de 5 mm de diâmetro externo em água deuterada. Os deslocamentos químicos foram determinados utilizando acetona com grau de pureza HPLC (Tedia) como padrão interno: $\delta = 2,208$ ppm para ^1H e $\delta = 32,69$ para ^{13}C . Os deslocamentos da acetona foram determinados utilizando o 2,2-dimetil-2-silapentano-5-sulfonato de sódio ($\delta = 0$ ppm para ^1H e ^{13}C) como padrão interno, conforme recomendações da IUPAC (VELDE, 2004). Os espectros foram interpretados com o auxílio do programa TOPSPIN 3.1 da Bruker e ACD/Labs NMR Processor Academic Edition.

5.4.1.1 Obtenção dos espectros de ^1H e ^1H - ^{13}C HSQC

Para obtenção dos espectros, as amostras nativas e modificadas foram solubilizadas em água deuterada (D_2O), congeladas e liofilizadas. Foram ressolubilizadas em D_2O na concentração final de 20 mg/mL.

5.4.1.2 Obtenção dos espectros de ^{13}C

Para obtenção dos espectros de ^{13}C , as amostras nativas e modificadas foram solubilizadas em água deuterada (D_2O) na concentração final de 40 mg/mL.

5.4.1.2.1 Tratamento com resina ácida para análise de RMN ^{13}C

Na tentativa de obter maior resolução na obtenção dos espectros de ^{13}C , foi realizado um tratamento do polissacarídeo com resina ácida a fim de trocar cátions que poderiam estar ligados como contra-íons aos grupos carregados negativamente. Para isso, uma resina catiônica Amberlite IR-120 (Synth) foi ativada. Para cada grama de resina pesada foi adicionado 20 mL de HCl 1M e a mistura ficou sob agitação durante 1 hora. Em seguida, a resina foi lavada cinco vezes com água deionizada até sua neutralização (pH= 6,5). Foi adicionada acetona e agitou-se por mais 30 min. A resina foi lavada mais três vezes com acetona e deixada para secar em temperatura ambiente. Para preparação da amostra, a cada grama de polissacarídeo foi adicionado 0,1 mL de água Milli-Q[®], ficando sob agitação *overnight*. No dia seguinte, foi adicionado 0,01 g da resina ativada. Essa mistura foi condicionada sobre banho de gelo permanecendo sob agitação durante 3 h. Em seguida, foi filtrada com água Milli-Q[®], liofilizada e preparada de acordo como no item 5.4.1.2.

5.4.2 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

As análises de infravermelho foram realizadas no Departamento de Farmácia da UFPR, em espectrômetro FT-IR ALPHA da Bruker, incorporado a transformada de Fourier. As amostras liofilizadas (2 mg) foram colocadas diretamente no laser e os espectros foram obtidos instantaneamente. Para a análise foi utilizado o software OPUS Viewer da Bruker.

5.5 ENSAIO DA ATIVIDADE ANTICOAGULANTE *IN VITRO*

O teste anticoagulante realizado foi o Tempo de Tromboplastina Parcialmente Ativada (aPTT) realizado no coagulômetro de 4 canais, modelo KL-340 *coagulation analyzer* da Meizhou Cornley Hi-Tech Co., Ltda. O plasma ovino utilizado (Lote 014/13, coletado em citrato de sódio 8,7%) foi gentilmente cedido pela Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). O tempo máximo de ensaio foi de 300 s e os resultados foram expressos em μg de polissacarídeo/mL de plasma por aPTT \pm Erro Padrão (n = 3).

Para as análises de aPTT foram utilizadas as concentrações de 10, 20, 30, 40, 50, 100 e 150 μg de polissacarídeo/mL de plasma, tanto para os polissacarídeos nativos, quanto para os polissacarídeos oxidados. Como controle negativo (valores de coagulação normais) foi utilizada uma solução salina e como controle positivo heparina (200,47 UI/mg).

Assim, foram incubados 100 μl de solução salina, 100 μl da *theta*-carragenanas nativa e oxidadas nas variadas concentrações ou o padrão de heparina, mais 100 μl de plasma ovino a 37 °C por 1 min. Em seguida houve a adição de 100 μl do reagente aPTT (sílica coloidal em dispersão com fosfolípidos sintéticos, tampão e conservantes) Kit Hemosil® (*Instrumentation Laboratory*) para APTT-SP (*liquid*) e re-incubação por 3 min. Decorrido este tempo, foi adicionado 100 μl de cloreto de cálcio 0,25 M e o tempo de coagulação foi determinado em triplicata para cada concentração.

5.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os valores apresentados nos gráficos e tabelas relativos ao item 5.5 correspondem às médias dos resultados da triplicata, seguidas do erro padrão da média, calculados pela Equação 2 utilizando o software Excel:

$$\bar{s} = \frac{\sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{n-1}}}{\sqrt{n}} \quad (2)$$

onde: \bar{s} = o erro padrão da média;

x_i = o valor de cada resultado individual (x_1, x_2, x_3);

\bar{x} = a média aritmética dos valores de x_i

n = o número de amostras.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 EXTRAÇÃO E OBTENÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS

6.1.1 *Kappa*-carragenana (κ NP)

Os extratos polissacarídicos ricos em κ -carragenana (κ N) obtidos por Araújo (2012) e Ducatti (2009) foram extraídos da espécie de alga *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta) (GONÇALVES *et al.*, 2005; PAULA; PEREIRA; OHNO, 1999). Como essa espécie biossintetiza majoritariamente um híbrido κ/ι -carragenana foi realizada uma purificação com cloreto de potássio (KCl) (MATULEWICZ *et al.*, 1989), que consiste no tratamento de KCl para precipitação da fração contendo principalmente κ -carragenana e mantendo ι -carragenana em solução.

Essa separação é possível devido a principal propriedade físico-química das carragenanas, a geleificação. Neste processo, as duplas hélices, na presença do íon K^+ agregam-se, como em uma estrutura quaternária, formando um gel firme e resistente. Enquanto a ι -carragenana possui 2 grupos sulfatos por unidade dissacarídica, a κ -carragenana possui somente 1, sendo então possível a separação entre as duas carragenanas manipulando a concentração dos cátions (K^+), onde a κ -carragenana geleifica e precipita em menores concentrações de KCl (MORRIS; REES; ROBINSON, 1980; HOFFMANN; RUSSELL; GIDLEY, 1995).

A fração κ NP precipitada na concentração de 0,1 M de KCl apresentou 51% de rendimento em relação à alga extraída e seca.

O espectro de RMN 1H da fração κ N (FIGURA 10A) apresentou a *kappa*- (84%) e *iota*-carragenana (16%), indicadas pela presença dos sinais α -anoméricos da unidade 3,6-anidro- α -D-galactopiranosose e 3,6-anidro- α -D-galactopiranosose-2-sulfato em 5,09 e 5,29 ppm, respectivamente. Após a purificação por precipitação com KCl, verificou-se por meio da integração dos sinais α -anoméricos, que a fração purificada, κ NP (FIGURA 10B) apresentou 88% de *kappa*-carragenana e 12% em *iota*-carragenana. Também foi observado a presença de unidades de 6-O-metil- β -D-galactopiranosose-4-sulfato indicadas pelo sinal em 3,41 ppm correspondentes ao

grupo metil (ESTEVEZ; CIANCIA; CEREZO, 2004). Esses menores constituintes podem estar ligados na posição C6 das unidades β -D-galactopiranosose-4-sulfato de *kappa*- ou *iota*-carragenana. Após a purificação observa-se a diminuição em 50% desse constituinte.

Com isso, fração κ NP foi utilizada nas reações de oxidação seletiva.

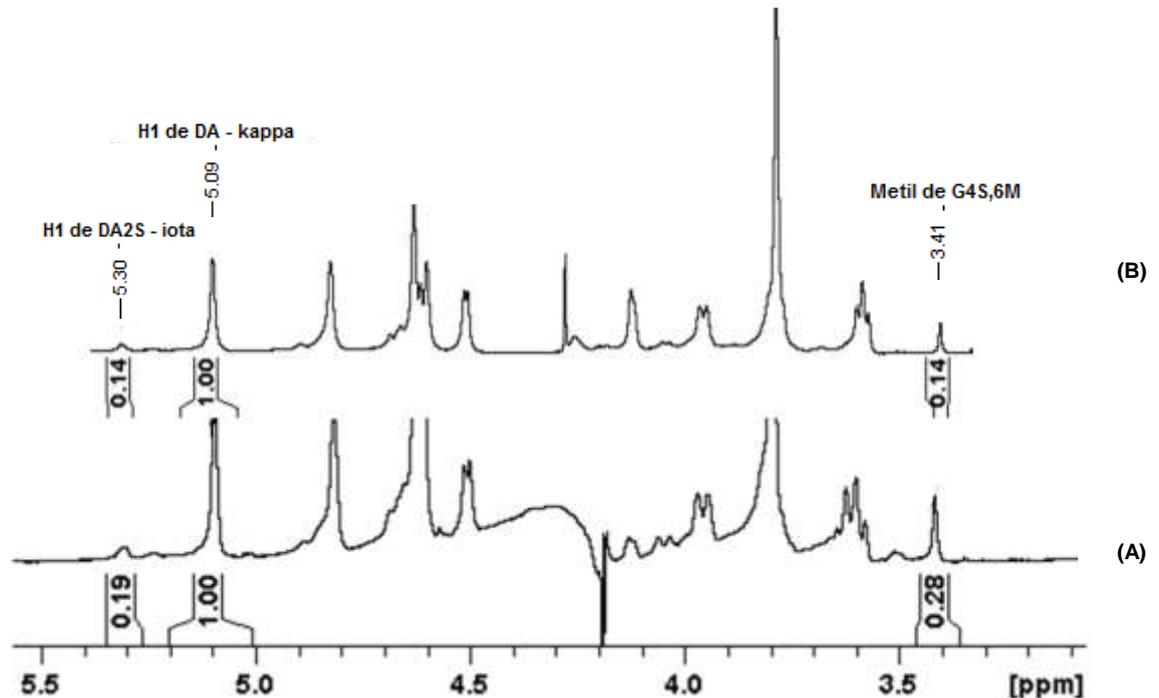


FIGURA 10- ESPECTRO DE RMN ¹H DAS FRAÇÕES κ N (A) E κ NP (B). Solvente: D₂O, 70 °C, 400 MHz, acetona como padrão interno ($\delta = 2,208$ ppm)
 FONTE: O autor (2015)

6.1.2 *Iota/nu*-carragenana (i/vN)

Após a extração da alga *Eucheuma denticulatum* foi obtida uma fração rica em *iota/nu*-carragenana com 64% de rendimento em relação ao peso seco da alga nomeada como i/vN.

Através da análise do espectro de RMN ¹H (FIGURA 11) foi possível identificar e quantificar os teores de cada carragenana presente. Para isso, foram integrados todos os sinais anoméricos encontrados das unidades B (α), sendo eles: 5,09 ppm correspondente a unidade DA da κ -carragenana; 5,23 ppm correspondente a unidade D6S de μ -carragenana; 5,30 ppm correspondente a unidade DA2S da ι -carragenana, e 5,50 ppm correspondente a unidade D2S,6S de ν -carragenana

(USOV; SHASHKOV, 1985; VELDE *et al.*, 2004).

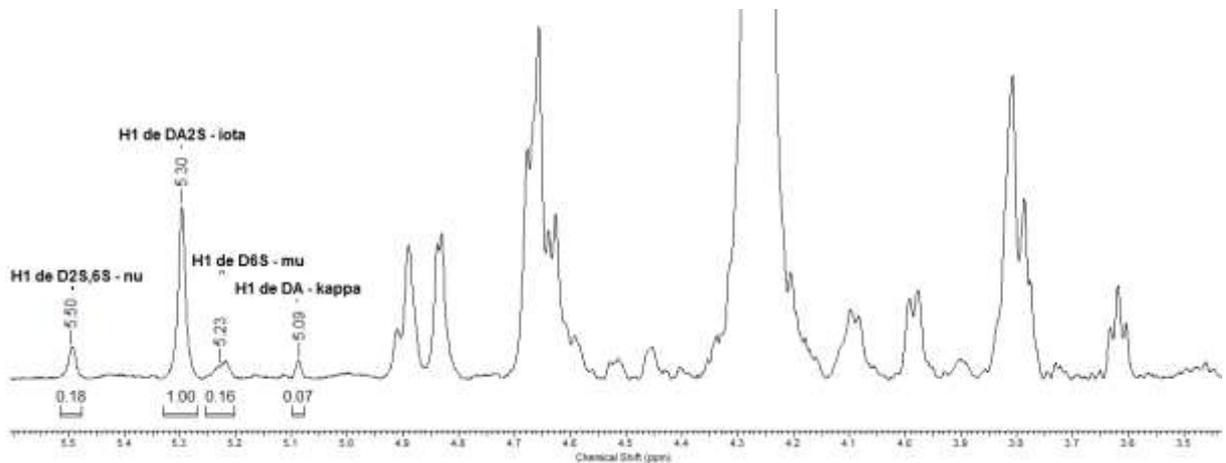


FIGURA 11- ESPECTRO DE RMN ^1H DA FRAÇÃO i/vn OBTIDA DA EXTRAÇÃO DA ALGA *Eucheuma denticulatum*. Solvente: D_2O , 70 °C, 600 MHz, acetona como padrão interno ($\delta = 2,208$ ppm)

FONTE: O autor (2015)

Na TABELA 7 encontram-se os teores em porcentagem de cada díade. Para esse cálculo, os valores de integração foram somados (1,41) e considerados como 100%.

TABELA 7- VALORES DE INTEGRAÇÃO E TEORES DAS CARRAGENANAS OBTIDAS NA EXTRAÇÃO DA ALGA *Eucheuma denticulatum*

Carragenana	Estrutura ^b	Valor de integração ^a	%
i	G4S-DA2S	1,00	71,0
v	G4S-D2S,6S	0,18	13,0
k	G4S-DA	0,07	5,0
μ	G4S-D6S	0,16	11,0

FONTE: O autor (2015)

NOTAS:^a Valores obtidos através de RMN ^1H

^b Baseada na nomenclatura de letras de KNUTSEN *et al.* (1994)

Assim, os dados de RMN indicaram que o extrato obtido é uma carragenana híbrida, sendo constituído principalmente por i-carragenana (71%), valor de acordo ao relatado para esta alga marinha, produtora de i-carragenana (VIANA *et al.*, 2004).

6.1.3 Iota-carragenana (iN)

A fim de enriquecer a quantidade de i-carragenana a partir de seu precursor estrutural v-carragenana, a fração i/vN foi submetida ao tratamento alcalino gerando a fração iN. Essa reação de ciclização promove a formação de unidades 3,6-anidro- α -D-galactopiranosose 2-sulfato a partir de unidades α -D-galactopiranosose 2,6-dissulfato (CIANCIA *et al.*, 1993). O mecanismo para a reação de ciclização ocorre em meio alcalino iniciado com o ataque nucleofílico do íon hidróxido às hidroxilas gerando ânions alcóxidos. A α -D-galactopiranosose 2,6-dissulfato altera a conformação de 4C_1 (6-OSO₃-equatorial) para 1C_4 (6-OSO₃-axial), colocando o C6 sulfatado e o alcóxido de C3 nas posições cis axiais. Na segunda etapa do mecanismo, ocorre ataque nucleofílico do alcóxido de C3 ao C6, resultando na formação da ligação 3,6-anidro na mesma unidade de galactose e liberação do grupo sulfato de C6 (CIANCIA *et al.*, 1993; VIANA *et al.* 2004).

A análise dos espectros de RMN 1H das frações i/vN e iN (FIGURA 12) indicaram que a reação de ciclização foi eficiente, pois o sinal do hidrogênio anomérico, em 5,50 ppm, correspondente as unidades de α -D-galactopiranosose 2,6-dissulfato da v-carragenana (FIGURA 12A) desapareceu (USOV; SHASHKOV, 1985; VELDE *et al.*, 2004).

Após o tratamento alcalino, a fração iN (FIGURA 12B) apresentou 88% de i-carragenana, 7% de κ -carragenana e 5% de μ -carragenana. Para esse cálculo, foram somados os valores de integração (1,14) e considerados como 100%. O rendimento obtido foi de 86% em relação ao peso seco da alga.

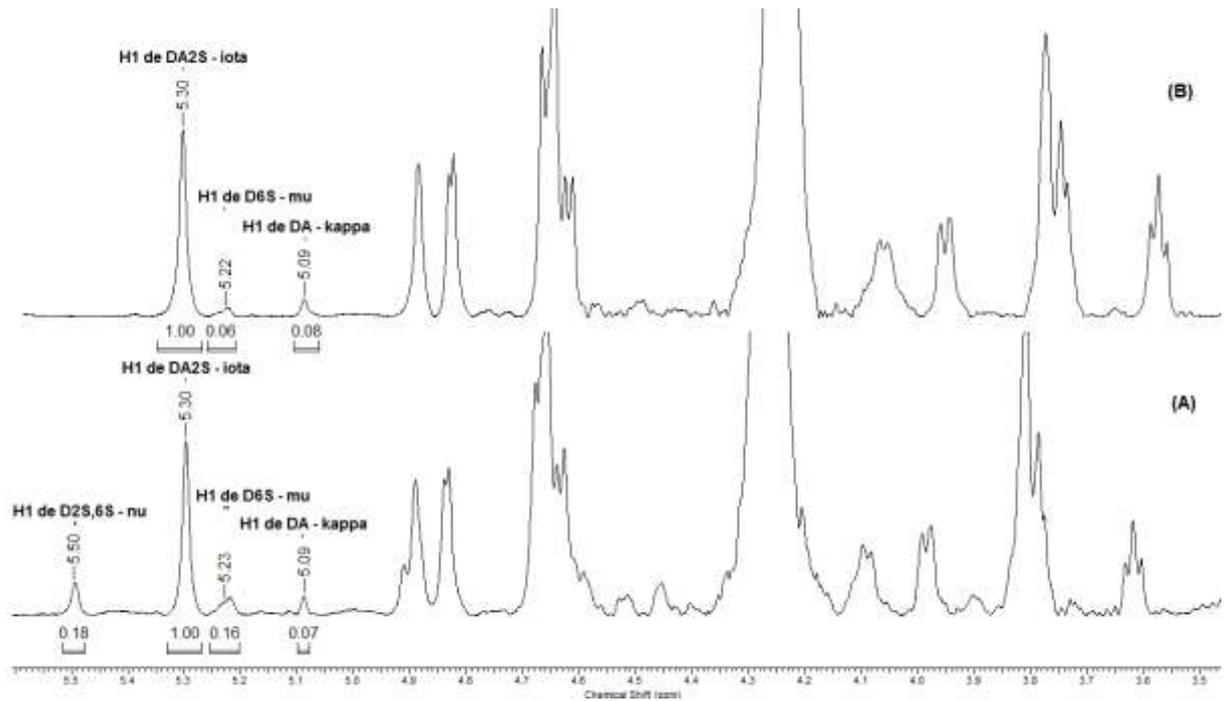


FIGURA 12- ESPECTROS DE RMN ^1H DAS FRAÇÕES I/vN (A) E IN (B), 70 °C, 600 MHz, Solvente: D_2O , acetona como padrão interno ($\delta = 2,208$ ppm)
 FONTE: O autor (2015)

6.1.4 *Lambda*-carragenana (λN)

A fração λN , obtida a partir da extração da alga *Gigartina skottsbergii* e gentilmente cedida por Araújo *et al.* (2013), foi submetida à análise de RMN ^1H para confirmação de sua integridade (FIGURA 13).

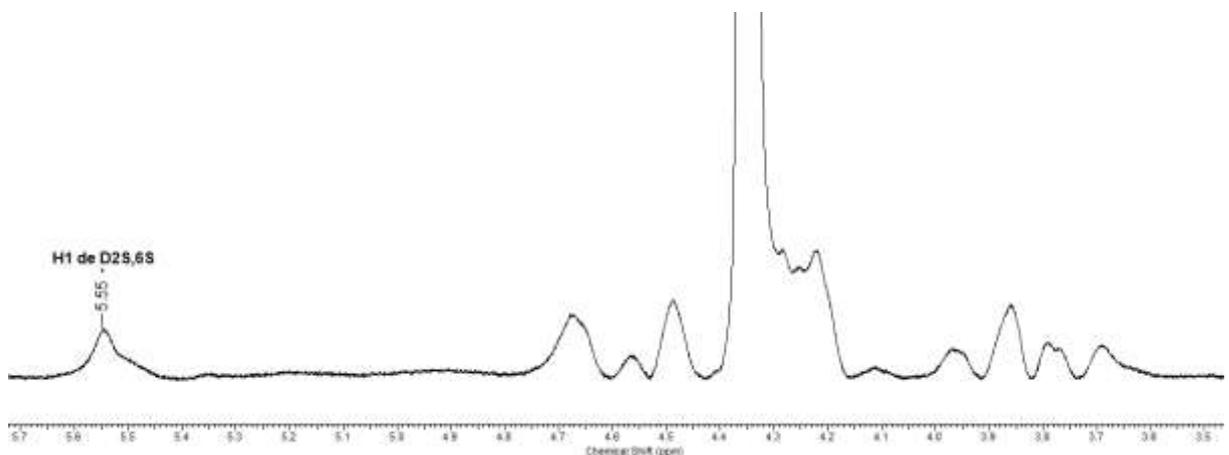


FIGURA 13- ESPECTRO DE RMN ^1H DA FRAÇÃO λN OBTIDA DA EXTRAÇÃO DA ALGA *Gigartina skottsbergii*. 55 °C, 400 MHz. Solvente: D_2O , acetona como padrão interno ($\delta = 2,208$ ppm)
 FONTE: O autor (2015)

O espectro da fração λ N apresentou o sinal em 5,55 ppm, referente ao hidrogênio anomérico da unidade D2S,6S característico da λ -carragenana (GONÇALVES *et al.*, 2005) e demais sinais semelhantes aos obtidos por Araújo *et al.* (2013), o que confirma ser a carragenana do tipo λ .

6.1.5 *Theta*-carragenana (θ N)

A fração θ N foi obtida através do tratamento alcalino (CIANCIA *et al.*, 1993) da fração λ N. Esta reação consiste na conversão das unidades B de α -D-galactopiranosose 2,6–dissulfato (λ -carragenana) em 3,6-anidro- α -D-galactopiranosose 2-sulfato (*theta*-carragenana) através da eliminação do grupo sulfato de C6 em meio alcalino. Esta modificação química apresentou um rendimento de 60% em relação ao peso seco da alga.

O espectro de RMN ^1H (FIGURA 14) mostrou o desaparecimento do sinal em 5,55 ppm, correspondente ao hidrogênio anomérico da unidade D2S,6S (λ -carragenana) e o aparecimento de um sinal bem definido em 5,28 ppm correspondente ao hidrogênio anomérico das unidades de 3,6-anidro- α -D-galactopiranosose 2-sulfato (θ -carragenana), indicando a completa transformação de *lambda* em *theta*-carragenana.

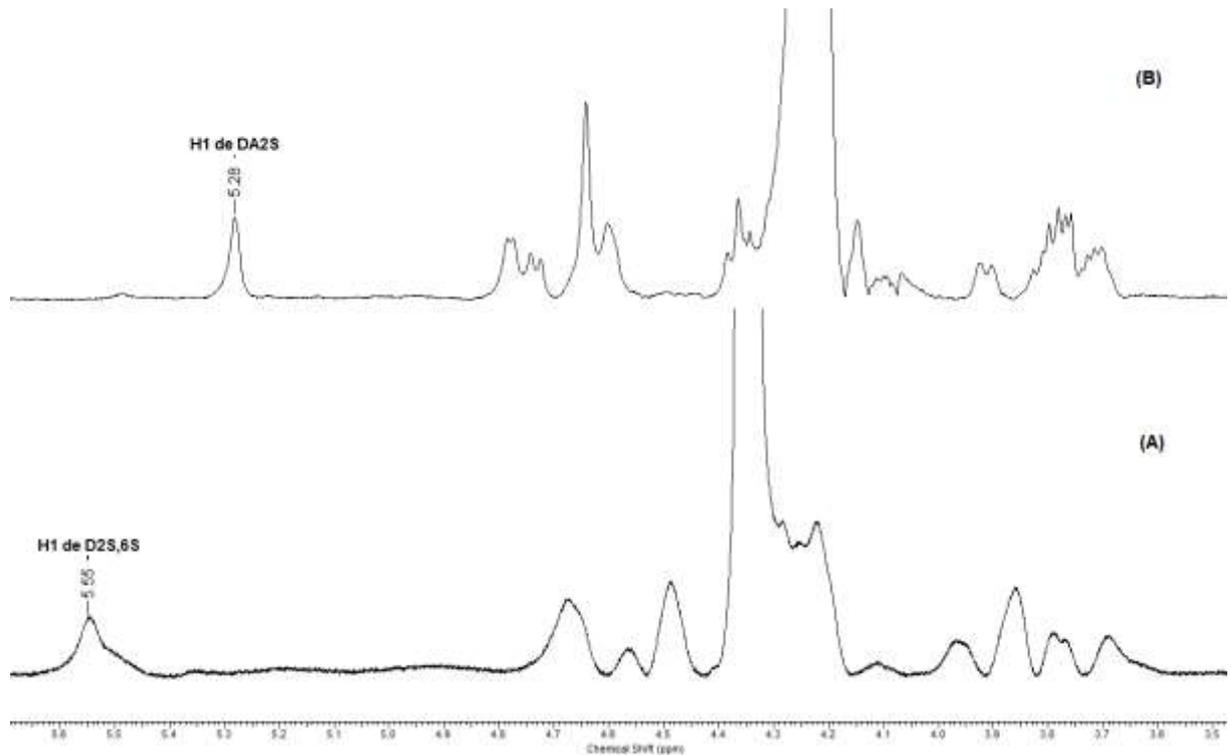


FIGURA 14- ESPECTROS DE RMN ^1H DAS FRAÇÕES λN (A), 55°C , 400 MHz E θN (B), 70°C , 400 MHz. Solvente: D_2O , acetona como padrão interno ($\delta = 2,208$ ppm)
 FONTE: O autor (2015)

A TABELA 8 apresenta os rendimentos de todas as frações obtidas nessa etapa purificação e extração, sendo elas κNP , i/vN , iN e θN .

TABELA 8- RENDIMENTOS OBTIDOS NAS ETAPAS DE OBTENÇÃO DAS CARRAGENANAS*

Carragenana	Fração	Rendimento (%)
κ -carragenana purificada	κNP	88
i/v -carragenana nativa	i/vN	64
i -carragenana nativa	iN	86
θ -carragenana nativa	θN	60

NOTAS: *Em relação à massa seca
 FONTE: O autor (2015)

6.2 OXIDAÇÕES SELETIVA DAS CARRAGENANAS E CARACTERIZAÇÃO

6.2.1 Reduções das frações κNP e i/vN

As reações de oxidação seletiva ocorrem em pH alcalino. Para evitar a β -

eliminação com consequente clivagem das ligações glicosídicas, foi realizada reações de redução dos terminais redutores com NaBH_4 (ASPINALL, 1982) nas frações nativas κNP e $i/v\text{N}$ gerando as frações κNR e $i/v\text{NR}$, de acordo com o método descrito por Araújo *et al.* (2013). A fração λN já havia sido reduzida por Araújo *et al.* (2013) e as frações θN e $i\text{N}$ foram reduzidas durante o tratamento alcalino (CIANCIA *et al.*, 1993; VIANA *et al.*, 2004).

A FIGURA 15 apresenta os espectros de RMN ^1H das frações reduzidas κNR e $i/v\text{NR}$ e das frações $i\text{N}$, λN e θN . Os espectros das frações κNR e $i/v\text{NR}$ foram semelhantes às frações não reduzidas κNP e $i/v\text{N}$.

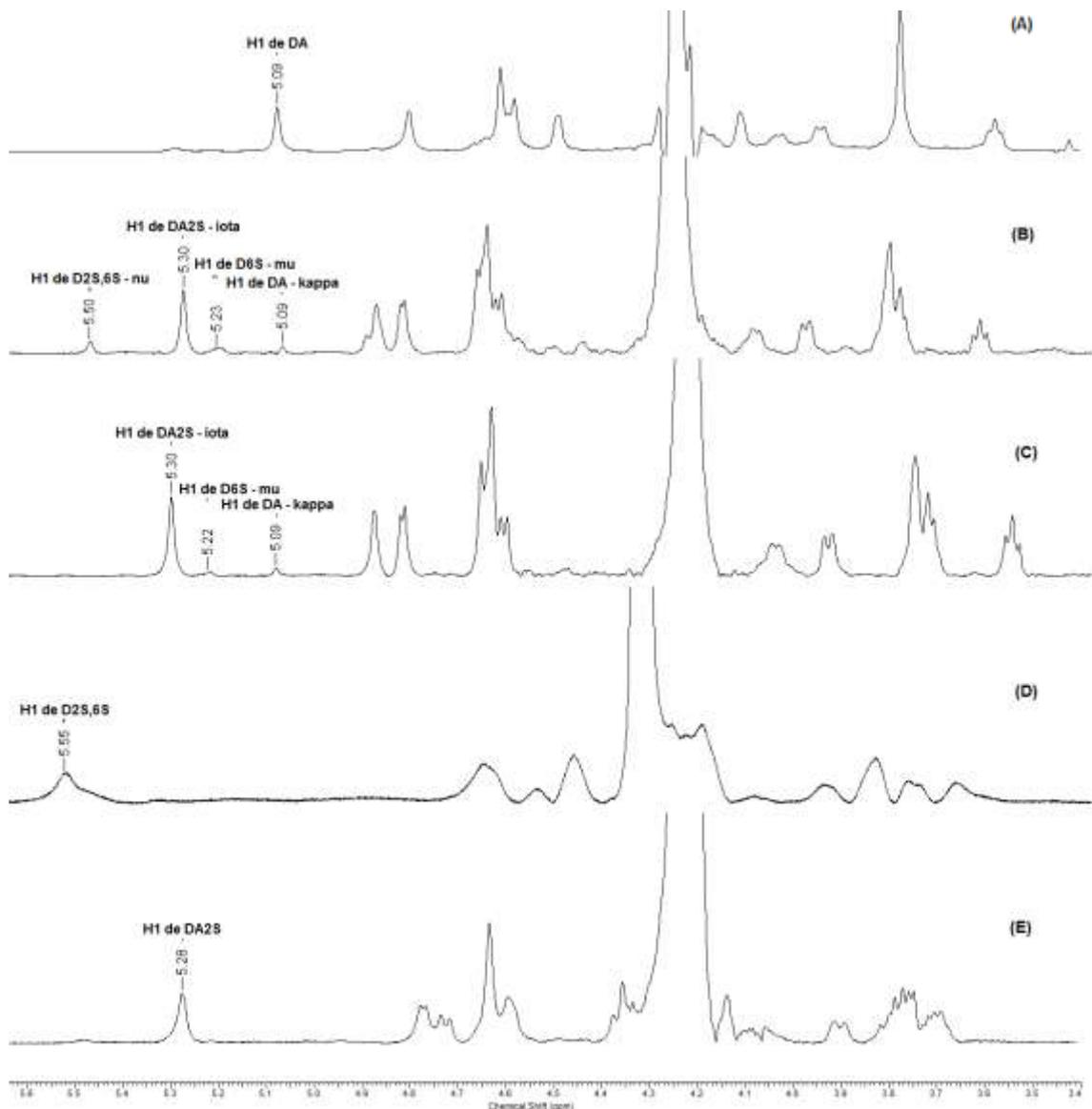


FIGURA 15- ESPECTROS DE RMN ^1H DAS FRAÇÕES κNR (A), 70°C, 600 MHz, $i/v\text{NR}$ (B), 70°C, 600 MHz, $i\text{N}$ (C), 70°C, 600 MHz, λN (D), 55°C, 400 MHz E θN (E), 70°C, 400 MHz. Solvente: D_2O , acetona como padrão interno ($\delta = 2,208$ ppm)

FONTE: O autor (2015)

6.2.2 Oxidação seletiva da *kappa*-carragenana monitorada por titulometria (κ OTT)

Diversos trabalhos na literatura têm relatado a oxidação seletiva de polissacarídeos utilizando o radical TEMPO e um co-oxidante, geralmente o hipoclorito de sódio (BRAGD; BEKKUM; BESEMER, 2004; BRETON *et al.*, 2007; DING *et al.*, 2008; BAE *et al.*, 2011; DELATTRE *et al.*, 2014).

Neste trabalho foi desenvolvida uma metodologia para a oxidação seletiva de C6 em carragenanas utilizando o ácido tricloroisocianúrico como co-oxidante em meio básico.

Inicialmente foi utilizada a *kappa*-carragenana como substrato inicial (FIGURA 16) e baseado nos estudos realizados por Nooy; Besemer; Bekkum (1995); Thaburet *et al.* (2001); Kato, Matsuo, Isogai (2003); Perez, Montanari, Vignon (2003) e Bragd; Bekkum; Besemer (2004), foi adaptada uma metodologia por titulação como forma de controle do pH reacional e acompanhamento da reação.

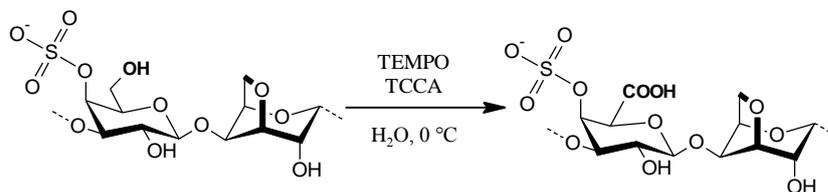


FIGURA 16- OXIDAÇÃO DA *KAPPA*-CARRAGENANA
 FONTE: O autor (2015)

Durante a reação, com a formação do ácido urônico ocorre a diminuição do pH, que é mantido constante pela adição de NaOH. Em teoria, o volume de solução de NaOH adicionado poderia fornecer a quantidade de ácido urônico formado em função do tempo de reação e assim seria possível acompanhar a cinética da reação e obter carragenanas com diferentes graus de oxidação seletiva por meio do controle do tempo reacional.

Dessa forma, durante a reação foram avaliadas três variáveis: o tempo reacional, o pH e o volume de NaOH adicionado (TABELA 9).

TABELA 9- VOLUMES DE NaOH E VALORES DE pH DURANTE A OXIDAÇÃO SELETIVA C6 DA KAPPA-CARRAGENANA

Tempo (min)	Vol de NaOH (mL)	pH
3	10	10
13	14,5	10
25	17,5	10
40	23,3	10
58	-	9,6
120	-	9,6

FONTE: O autor (2015)

O pH inicial no tempo 0' era 10. Como se observa na TABELA 9, o pH alterou-se rapidamente principalmente durante os três primeiros minutos da reação, sendo adicionado 4,5 mL de NaOH para restabelecimento deste. O volume máximo de NaOH teórico calculado para 100% da oxidação do polissacarídeo foi 5,9 mL, entretanto, este volume foi consumido nos primeiros minutos de reação (FIGURA 17). De acordo com o mecanismo de oxidação proposto por LUCA *et al.* (2003), o TCCA pode formar em meio aquoso o ácido hipocloroso e o ácido clorídrico. Dessa forma, o consumo de hidróxido de sódio durante a reação seria bem maior que o necessário para neutralizar o ácido urônico produzido. Assim, a utilização de titulometria para monitorar a produção de *kappa*-carragenana com diferentes graus de oxidação seletiva C6 seria difícil de ser executada.

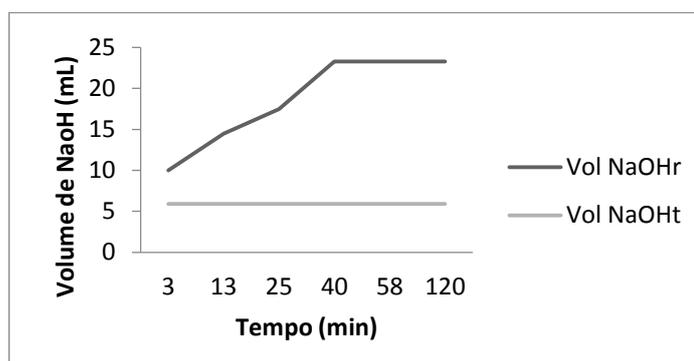


FIGURA 17- VOLUMES DE NAOH UTILIZADO (NAOH_R) E TEÓRICO MÁXIMO (NAOH_T) EM FUNÇÃO DO TEMPO REACIONAL

FONTE: O autor (2015)

Para confirmar que a oxidação ocorreu, o polissacarídeo foi isolado apresentando um rendimento de 76%. Este produto foi nomeado como KOTT.

Essa fração foi positiva para dosagem de ácido urônico de acordo com a metodologia de Filisetti-Cozzi e Carpita (1991). A análise de RMN ^1H do produto de reação indicou que a oxidação em G6 ocorreu, pois houve uma diminuição no sinal em 3,79 ppm. De acordo com a literatura (USOV; SHASHKOV, 1985; VELDE *et al.*, 2002a, 2004), este sinal corresponde aos hidrogênios de G6 e G5 na *kappa*-carragenana (FIGURA 18). Com a oxidação do polissacarídeo, estes sinais devem desaparecer ou diminuir de acordo com o grau de oxidação alcançado. A determinação do grau de oxidação ($\text{DS}_{\text{Oxidação}}$) foi realizada por RMN ^1H utilizando a Equação 3 e indicou uma taxa de oxidação de C6 >95%.

$$\text{DS}_{\text{Oxidação}} = \left[\frac{\left(\frac{G_{5,6}}{G_2} \right)_{\text{Oxidado}}}{\left(\frac{G_{5,6}}{G_2} \right)_{\text{Nativo}}} \times 100 \% \right] - 100 \% \quad (3)$$

onde:

G 5,6 = representa a área de integração correspondente aos H6 e H5 das unidades β -D-galactopiranosose 4-sulfato;

G 2 = representa a área de integração correspondente ao H2 das unidades β -D-galactopiranosose 4-sulfato.

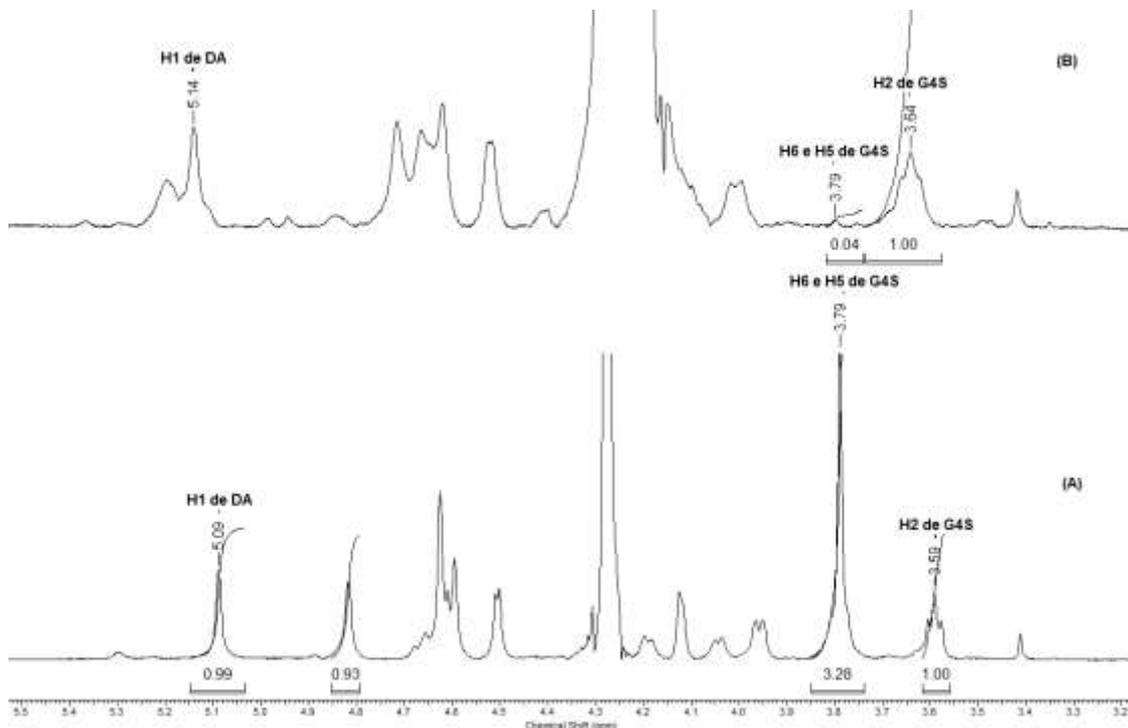


FIGURA 18- ESPECTROS DE RMN ^1H DAS FRAÇÕES $\kappa\text{NP(A)}$ e $\kappa\text{OTT (B)}$. 70 °C, 400 MHz. Solvente D_2O , acetona como padrão interno ($\delta = 2,208$ ppm)
 FONTE: O autor (2015)

No espectro de ^1H da FIGURA 18A, o sinal em 3,79 ppm corresponde aos H6 do C6 da unidade G4S (local da oxidação) e ao H5 das unidades G4S, sendo então a somatória de três sinais (H6, H6' e H5). Para a quantificação da oxidação por RMN ^1H é necessário estabelecer uma relação com um sinal que seja correspondente somente a um hidrogênio e que tenha se mantido sem deslocamento tanto na fração nativa (κNP) quanto na oxidada (κOTT). Neste caso, foi escolhido o sinal em 3,59 ppm correspondente ao hidrogênio do C2 da unidade G4S, que possui o menor deslocamento após a oxidação (FIGURA 18B) (de 3,59 ppm para 3,64 ppm).

Nos mapas de correlação bidimensionais heteronucleares sobrepostos de HSQC das frações nativa e oxidada (FIGURA 19), foi observado o desaparecimento no espectro da fração oxidada das correlações 3,79/63,3 e 3,79/76,7 ppm, correspondentes a H6/G6 e H5/G5 da G4S, respectivamente. Com a oxidação, o hidrogênio ligado ao G5 é submetido a um novo ambiente químico, causando o deslocamento do seu sinal de 3,79 ppm para campo menor (4,27 ppm). Ainda foi observado o deslocamento do H4 ligado ao G4 de 4,81/76,2 para 5,15/77,4 ppm, indicando a permanência do grupo sulfato na estrutura polissacarídica, importante para várias atividades biológicas relatadas para as carragenanas (OPOKU; QIU; DOCTOR, 2006; SILVA, 2010; ARAÚJO *et al.*, 2013).

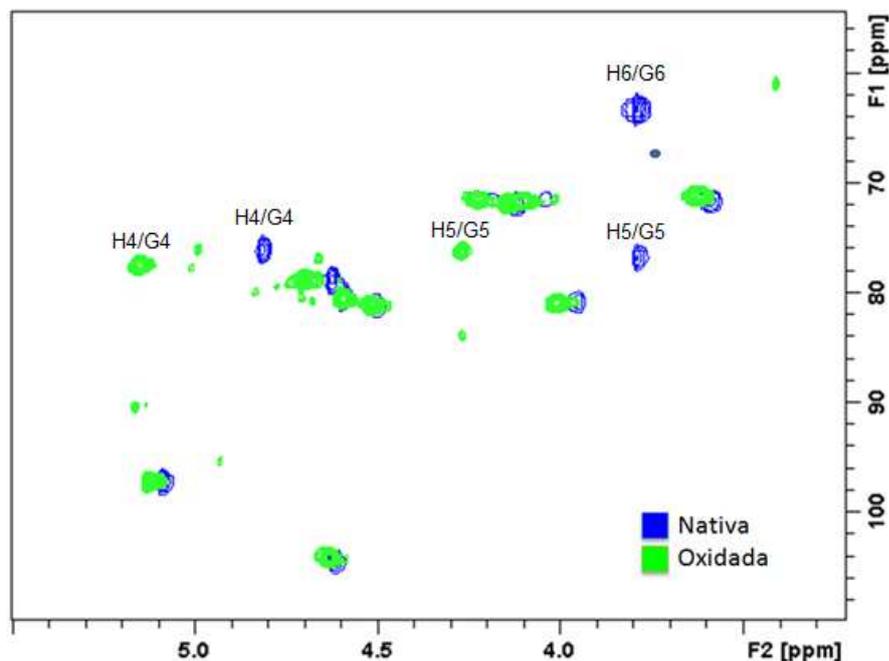


FIGURA 19- MAPAS DE CORRELAÇÃO BIDIMENSIONAIS HETERONUCLEARES HSQC DAS FRAÇÕES κNP (70 °C) E κOTT (55 °C), 600 MHz. Solvente: D_2O , acetona como padrão interno ($\delta = 2,208$ e $32,69$ ppm para ^1H e ^{13}C)
 FONTE: O autor (2015)

Na TABELA 10 estão os assinalamentos da *kappa*-carragenana oxidada obtidos através da comparação com dados da literatura (USOV; SHASHKOV, 1985; VELDE *et al.*, 2002a, 2004) e dos mapas de correlação da FIGURA 19.

TABELA 10- DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DE ^1H E ^{13}C DAS DÍADES DE *KAPPA*-CARRAGENANA NATIVA (κNP) E OXIDADA (κOTT) EM C6

Diade ^a	Unidade ^b	1	2	3	4	5	6
Nativa	G4S	4,61 104,5	3,59 71,5	3,95 80,9	4,81 76,2	3,79 76,7	3,79 63,3
	DA	5,09 97,2	4,12 71,9	4,50 81,2	4,59 80,3	4,62 78,8	4,04/4,19 71,4
Oxidada	GU4S	4,63 104,1	3,63 71,2	4,00 80,9	5,15 77,4	4,27 76,1	- 174,5 ^c
	DA	5,13 97,2	4,14 71,9	4,51 81,2	4,60 80,4	4,70 78,7	4,11/4,22 71,6/71,5

FONTE: O autor (2015)

NOTAS: ^aDeslocamentos químicos a partir de experimentos de RMN 2D

^bNomenclatura adaptada do código de letras desenvolvido por Knutsen *et al.* (1994)

^cDeslocamento obtido em pH 4 a partir do espectro de ^{13}C

GU4S = β -D-galactopiranosidurônico 4-sulfato

6.2.3 Estudo da oxidação seletiva utilizando *kappa*-carragenana como substrato

A fim de produzir diferentes proporções de oxidação na *kappa*-carragenana, optou-se pela variação dos equivalentes do co-oxidante TCCA, pois como observado no experimento de oxidação seletiva controlada por titulometria a obtenção dessas frações alterando o tempo reacional seria de difícil execução devido à velocidade da reação.

Para facilitar o procedimento de oxidação seletiva, a metodologia tradicional foi adaptada substituindo a titulação por um sistema tampão $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_3^{2-}$, 1 M, pH 9,6. Todo o meio reacional foi inicialmente solubilizado na solução tampão ao invés de água destilada. Contudo o polissacarídeo não se dissolveu, provavelmente devido à alta força iônica presente no meio com inevitável formação de agregados (MORRIS; REES; ROBINSON, 1980). Com isso, foi encontrada a menor quantidade de água destilada em que o polissacarídeo fosse completamente solúvel, nesse

caso, 50 mg (1 equivalente) em 7 mL de água destilada.

A TABELA 11 apresenta as reações envolvidas e os valores de oxidação calculados através da Equação 3 para o estudo de oxidação seletiva com a *kappa*-carragenana.

TABELA 11– REAÇÕES DE OXIDAÇÃO SELETIVA UTILIZANDO A *KAPPA*-CARRAGENANA COMO SUBSTRATO

Entrada	[TCCA] (equiv.)	Tempo (h)	DS _{Oxidação} (%) ^a
κNR (Nativa)	0	0	0
1	0,2	2	23
2	0,5	2	37
3	1,0	2	87
4	2,0	2	84
5	3,0	2	95
6	0,2	15	11
7	0,5	15	20
8	1,0	15	42
9	1,8	15	84
10	3,0	15	88

FONTE: O autor (2015)

NOTAS: Entrada: Diferentes condições avaliadas

^a% de oxidação calculadas a partir do espectro de RMN ¹H utilizando a Equação 3

Para as entradas de 1-5 (TABELA 11) as reações foram realizadas em duas horas. O tempo de reação foi definido por meio do experimento da seção 6.2.2 (tempo de reação que garante não haver mais formação de produto devido a estabilização do pH).

Os produtos formados foram positivos para a presença de ácidos urônicos e através dos espectros de RMN ¹H (FIGURA 20) pode-se observar o aumento da oxidação com o aumento do número de equivalentes de TCCA.

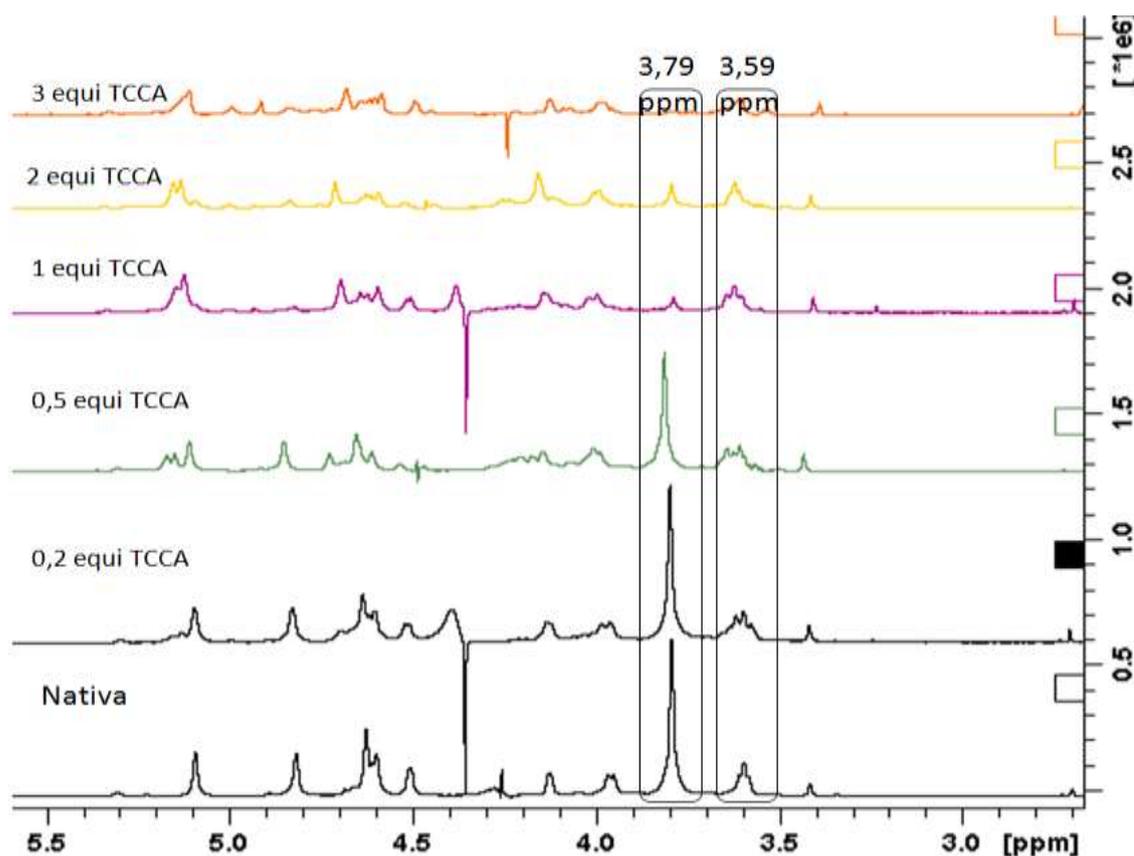


FIGURA 20- ESPECTROS DE RMN ^1H DAS FRAÇÕES κNR (NATIVA) (600 MHz, 70 °) E OXIDADAS COM DIFERENTES QUANTIDADES DO REAGENTE TCCA EM 2 HORAS (Entrada 1 e 3: 400 MHz, 55 °C; Entrada 2 e 4: 600 MHz, 50 °C, Entrada 5: 600 MHz, 70 °C). Solvente D_2O , acetona como padrão interno ($\delta = 2,208$ ppm)
 FONTE: O autor (2015)

Assim, conforme o aumento do número dos equivalentes de TCCA, há a diminuição do sinal em 3,79 ppm (H6, H6' e H5 das unidades de G4S) e a permanência do sinal em 3,59 ppm (H2 ligado das unidades G4S). A quantificação da oxidação foi realizada por meio da integração das áreas correspondentes a esses sinais utilizando a Equação 3.

De acordo com os valores de integração obtidos para as oxidações, a oxidação seletiva com 1 equivalente foi quase completa e com 0,5 equivalentes apresentou oxidação parcial. Dessa forma, foi padronizado para as oxidações seletivas em escala preparativa as concentrações de 3 e 0,5 equivalentes de TCCA para obtenção de polissacarídeos oxidados totalmente e parcialmente, respectivamente.

Inicialmente, as carragenanas κ -, ι -, θ - e λ foram oxidadas com o sistema tampão em 2 horas utilizando 3 equivalentes de TCCA. Foram geradas as

carragenanas κ OT, ι OP, θ OP e λ OP. A FIGURA 9 apresenta esquemas mostrando a origem das frações (p. 49).

Posteriormente, foi utilizado 0,5 equivalentes para oxidar parcialmente a *kappa*-carragenana em escala preparativa. Contudo, a oxidação ocorreu com uma porcentagem de oxidação bem abaixo do esperado (6%). O mesmo efeito foi observado após a caracterização das demais carragenanas oxidadas com 3 equivalentes, com exceção da oxidação preparativa da *kappa*-carragenana, gerando polissacarídeos oxidados parcialmente (OP) ao invés de totalmente (OT).

Dessa forma, as reações com a *kappa*-carragenana em escala analítica foram repetidas, aumentando o tempo de reação de 2h para 15 horas (entradas 6-10, TABELA 11). Ver FIGURA 9 (p. 49)

A FIGURA 21 apresenta um perfil semelhante ao da FIGURA 20, onde a entrada do grupo carboxila ocorreu de acordo com o aumento do número de equivalentes de TCCA, mas para a reação ser quase completa (84-88%) necessitou de 2 equivalentes de TCCA, onde 1 equivalente gerou apenas oxidação parcial, com aproximadamente 42% de oxidação.

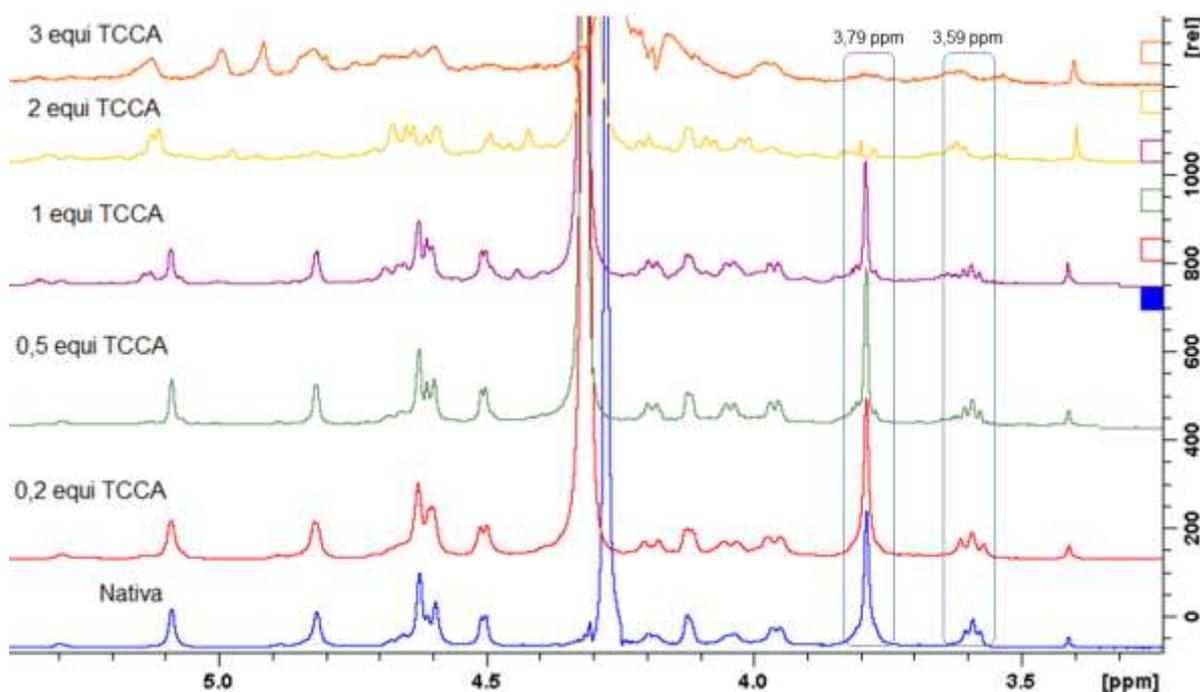


FIGURA 21- ESPECTROS DE RMN ^1H DAS FRAÇÕES κ NR (NATIVA) (600 MHz) E OXIDADAS COM DIFERENTES QUANTIDADES DO REAGENTE TCCA EM 15 HORAS (Entrada 6 e 10: 400 MHz; Entrada 7-9: 600 MHz). Solvente D_2O , 70 $^\circ\text{C}$, acetona como padrão interno ($\delta = 2,208$ ppm)
 FONTE: O autor (2015)

Buscando compreender o que pudesse estar interferindo nas reações de oxidação preparativas, foram realizados alguns estudos com o reagente TEMPO. Esse reagente promove alta taxa de reação em pH entre 9,5 e 11 (NOOY; BESEMER; BEKKUM, 1995), possui a estabilidade diminuída com o aumento de temperatura e sobre 0 °C sua estabilidade é praticamente constante (ANELLI *et al.*, 1987; TILSTAM; WEINMANN, 2002). Assim, foi testado se o tempo de dissolução do reagente TEMPO, que é realizado em temperatura ambiente, estaria causando a diminuição de sua reatividade e conseqüentemente afetando o sucesso da reação.

Utilizando a κ-carragenana como substrato, o reagente TEMPO foi solubilizado nos tempos indicados na TABELA 12 em temperatura ambiente (Entradas 1 e 2) e sob ação de temperatura elevada (Entrada 3). Após as dissoluções, foi adicionado a κ-carragenana, facilmente solúvel, e em seguida o TCCA já dissolvido no tampão. Nessas reações foram utilizados 1 equivalente de TCCA, tampão $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2^{2-}$ pH = 9,6, durante 2 horas.

TABELA 12– REAÇÕES TESTE PARA AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DO REAGENTE TEMPO

Entrada	Temperatura ^b (°C)	Tempo (min) ^a	% Oxidação ^c
1	25	10	21
2	25	20	18
3	70	20	6

FONTE: O autor (2015)

NOTAS: ^aTempo de solubilização do reagente TEMPO. Todas as reações foram realizadas por 2 horas a 0°C em banho de gelo

^bTemperatura de solubilização do reagente TEMPO

^cDados obtidos a partir da dosagem de ácidos urônicos realizadas em triplicata 2 vezes (FILISSETTI-COZZI; CARPITA, 1991)

O tempo médio gasto para dissolução do reagente TEMPO e início da reação são 10 minutos. Como se pode observar na TABELA 12, o aumento no tempo de dissolução do reagente não alterou muito os rendimentos da reação, mas sobre a ação de temperatura elevada a taxa de rendimento é 3 vezes menor nas mesmas condições (Entrada 2 e 3).

Então, para testar o efeito da temperatura ambiente não somente na dissolução do reagente TEMPO, mas na reação completa, o reagente TEMPO e os demais reagentes foram dissolvidos como de costume e foi realizada uma reação de

6.2.4 Síntese e caracterização da oxidação seletiva C6 tamponada da *kappa*-carragenana (κ OT)

A partir da oxidação seletiva em escala preparativa da *kappa*-carragenana com 3 equivalentes de TCCA, em 2 horas, foi obtida a fração nomeada como κ OT com 83% de rendimento.

Essa fração foi positiva para dosagem de ácidos urônicos e grau de sulfatação. A análise do produto formado por RMN ^1H (FIGURA 23) assim como na oxidação monitorada por titulometria (FIGURA 18), apresentou diminuição do sinal em 3,79 ppm correspondente a H6', H6 e H5 de G4S, evidenciando a oxidação em C6. O valor estimado do grau de oxidação através do espectro de RMN ^1H foi de 87%.

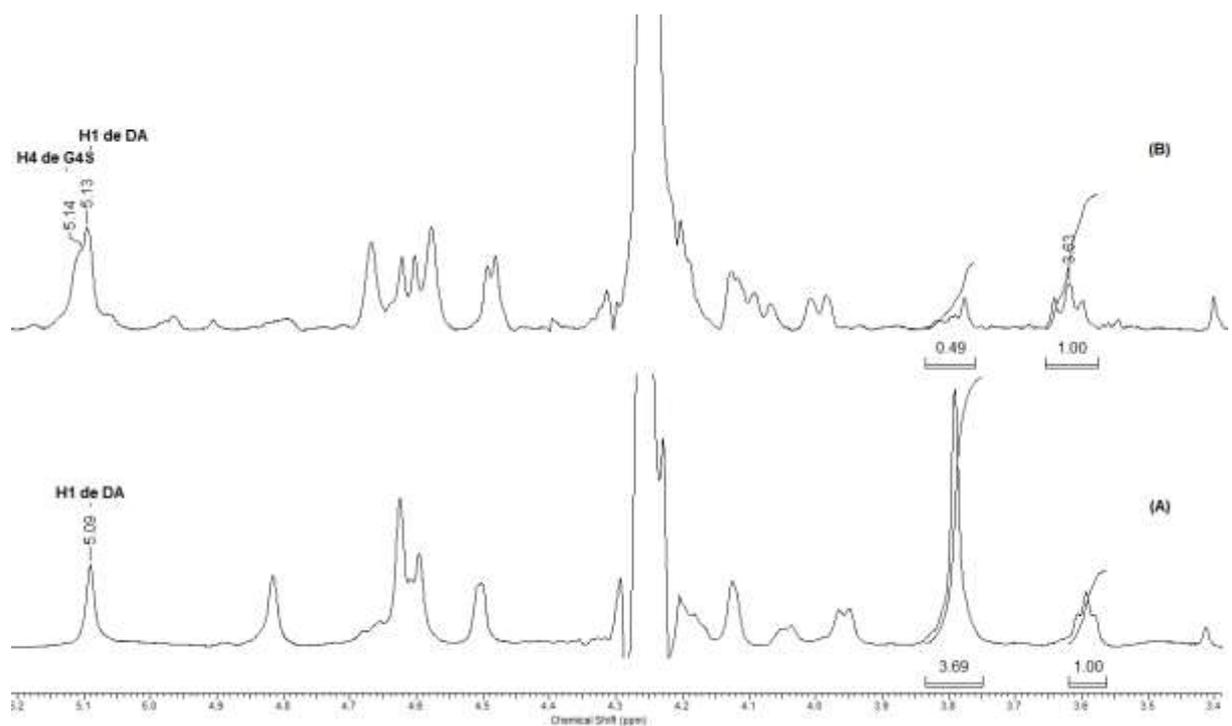


FIGURA 23 - ESPECTROS DE RMN ^1H DAS FRAÇÕES κ NR (A), 600 MHz E κ OT (B), 400 MHz. 70°C. Solvente D_2O , acetona como padrão interno ($\delta = 2,208$ ppm)
 FONTE: O autor (2015)

A FIGURA 24 apresenta os espectros de RMN ^{13}C da fração κ OT. No espectro da FIGURA 24B verifica-se a diminuição do sinal de C6 de G4S em 63,3 ppm em

relação ao espectro da fração κN (FIGURA 24A), indicando que a oxidação seletiva ocorreu. O sinal correspondente à carboxila (C6 de G4S) em 174,5 ppm apresentou baixa intensidade em comparação aos outros sinais. Assim, foi realizadas mudanças nos parâmetros experimentais para aquisição do espectro com o intuito de aumentar essa intensidade. Foi utilizada a sequência de pulsos zgpg30, mas não foi observado melhora na obtenção do sinal.

Dois experimentos (FIGURA 24C e D) foram realizados utilizando um tratamento com resina ácida para protonação da carboxila. O objetivo deste procedimento foi trocar cátions que pudessem estar ligados como contra-íons na carboxila.

No experimento da FIGURA 24D não houve neutralização com o NaOH, portanto a carboxila permaneceu protonada em pH 1. Foram observados os sinais em 89,8; 86,9; 75,3; e 72,7 ppm, correspondentes a C1, C4, C5, C2 e C6 de unidades de 3,6 anidro-galactose presentes em extremidades reductoras (DUCATTI *et al.*, 2011), indicando a hidrólise parcial do polissacarídeo, provavelmente devido ao forte meio ácido (pH 1) e à temperatura elevada (70 °C) durante a realização do experimento.

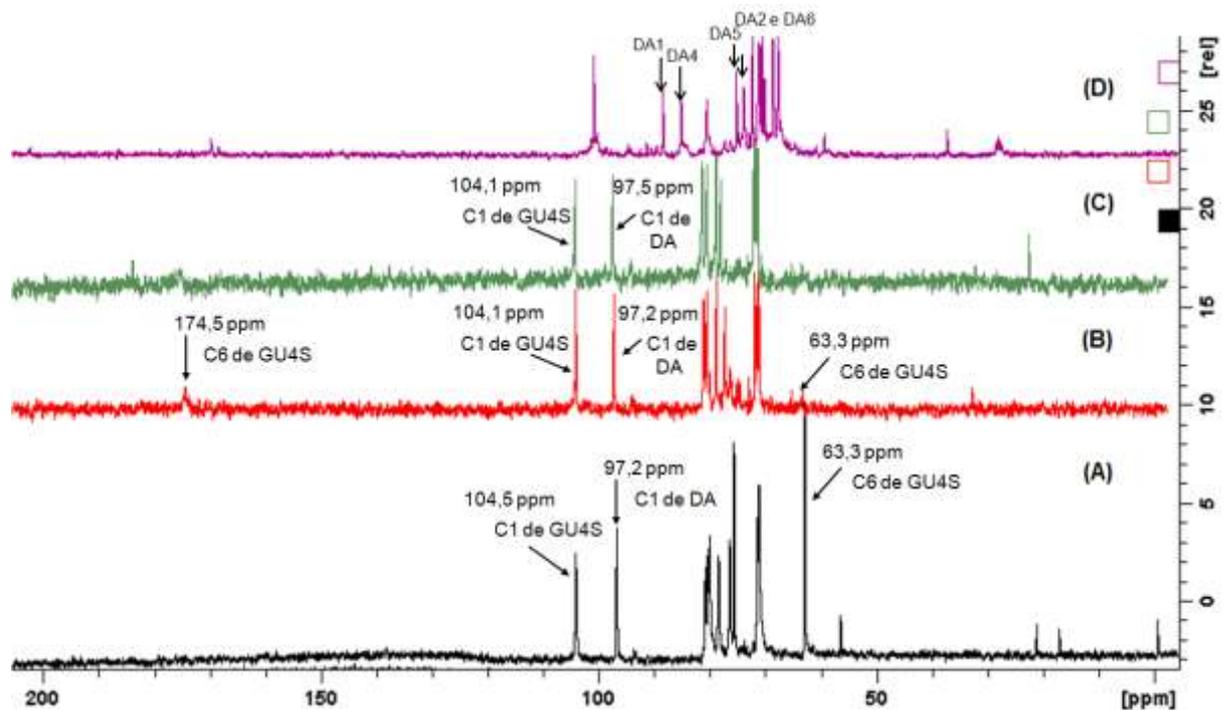


FIGURA 24- ESPECTROS DE RMN ^{13}C DAS FRAÇÕES κN (A), 100 MHz, 60°C, κOT (B), pH 4, 400 MHz, 70°C, κOT (C), TRATADA COM RESINA ÁCIDA E TITULADA, pH 5, 100 MHz, 70°C E κOT (D), TRATADA COM RESINA ÁCIDA, pH 1, 100 MHz, 70°C. Solvente: D_2O ; acetona como padrão interno ($\delta = 32,69$ ppm). O espectro (a) foi obtido por Araújo *et al.* (2013) sendo o DSS padrão interno $\delta = 0,0$ ppm

FONTE: O autor (2015)

No experimento da FIGURA 24C, após a realização do tratamento com a resina ácida, a solução foi titulada para pH 5 com NaOH substituindo o H⁺ pelo contra-íon Na⁺. A FIGURA 25 apresenta os espectros B e C da FIGURA 24. Observa-se que houve uma alteração nos deslocamentos após a mudança no pH de C4 de GU4S de 77,4 ppm em pH 4 para 78,0 ppm em pH 5 e para C4 de DA de 80,4 ppm em pH 4 para 80,2 ppm em pH 5. Sabe-se que a diminuição do pH tem o efeito de provocar deslocamentos para campo alto em ácidos β-D-galacturônicos (RAMOS *et al.*, 1996). Esse efeito foi observado após a diminuição do pH de 5 para 4, onde ocorreu o deslocamento de 0,6 ppm para campo alto do C4 de GU4S.

Como resultado, o tratamento com a resina ácida e neutralização para pH 5 também não contribuiu para aquisição do sinal da carboxila (C6 de G4S) com maior intensidade.

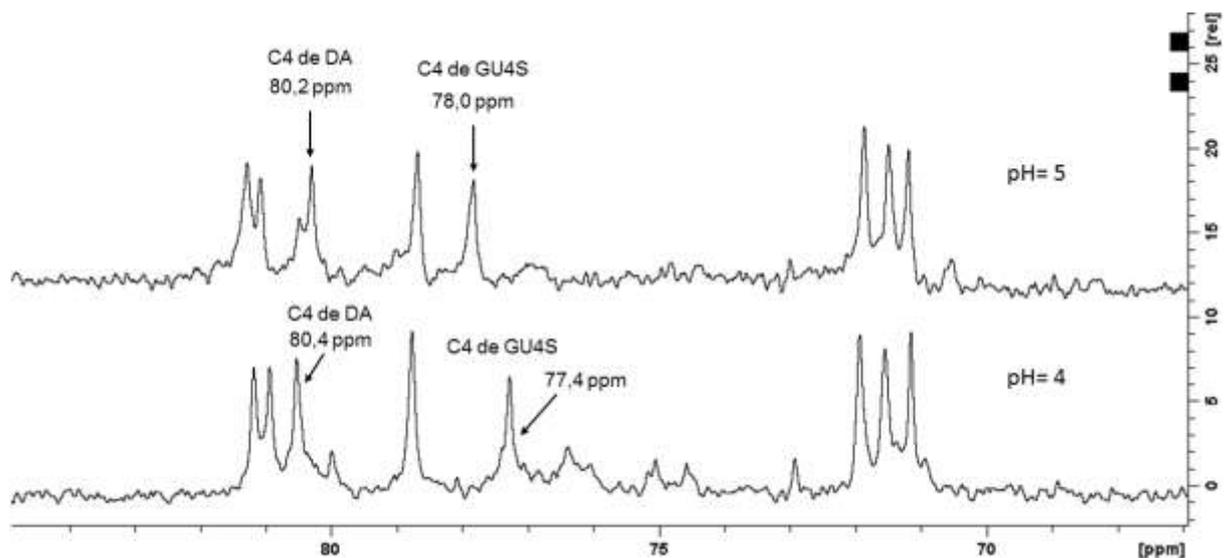


FIGURA 25- ESPECTROS DE RMN ¹³C DAS FRAÇÕES κOT, pH 4, 400 MHz, 70°C E κOT TRATADA COM RESINA ÁCIDA E TITULADA, pH 5, 100 MHz, 70°C. Solvente: D₂O, acetona como padrão interno (δ = 32,69 ppm)
 FONTE: O autor (2015)

A análise da fração κOT por espectroscopia de infravermelho (FIGURA 26) apresenta uma leve banda de absorção em 1738 cm⁻¹ da ligação C=O e outra em 1420 cm⁻¹ proveniente da deformação angular de C-O-H (SILVERSTEIN; BASSLER; MORILL, 1994; PRADO-FERNÁNDEZ *et al.*, 2003) corroborando que a oxidação ocorreu. O espectro também apresenta as ligações características da κ-carragenana, ou seja, a ligação C4-O-S na unidade G4S em 846 cm⁻¹ e a presença

da ligação C-O referente à ponte 3,6-anidro- α -D-galactopiranosose em 928 cm^{-1} (PRADO-FERNÁNDEZ *et al.*, 2003).

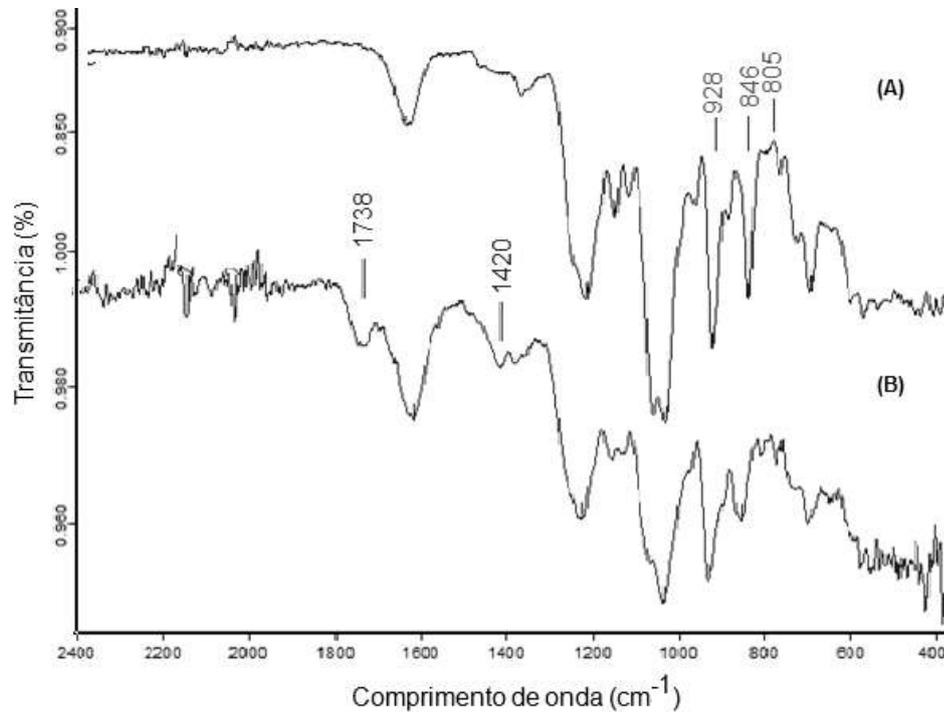


FIGURA 26- ESPECTROS DE INFRAVERMELHO DAS FRAÇÕES κ NR (A) E κ OT (B). Região entre 2400 e 400 cm^{-1}
 FONTE: O autor (2015)

A TABELA 13 apresenta o $DS_{\text{Oxidação}}$ encontrado a partir das integrações por RMN ^1H e da Equação 3, $DS_{\text{Sulfatação}}$ e porcentagem de sulfato para a fração κ OT em comparação com a fração κ NR. Ao comparar os valores de $DS_{\text{Sulfatação}}$ podemos observar uma pequena variação, indicando que a condição tamponada e preparativa não removeu os grupos sulfatos.

TABELA 13 – GRAU DE OXIDAÇÃO, PORCENTAGEM DE SULFATO E GRAU DE SULFATAÇÃO DA FRAÇÃO κ OT

Fração	$DS_{\text{Oxidação}}$ (%)	$DS_{\text{Sulfatação}}$	$\%SO_4^-$
κ NR	0	1,00	22
κ OT	87	0,91	20

FONTE: O autor (2015)

NOTAS: $DS_{\text{Oxidação}}$ calculado a partir da Equação 3; $DS_{\text{Sulfatação}}$ e $\%SO_4^-$ calculados a partir da Equação 1, metodologia de Dogson; Price (1962)

6.2.5 Síntese e caracterização das frações oxidadas seletivamente iOT, iOP e i/vOT

Utilizando as concentrações de reagentes encontradas para *kappa*-carragenana (TCCA 3 equiv, TEMPO 0,2 equiv, tampão carbonato pH = 9,6, 0 °C), foram realizadas duas reações em escala preparativa (300 mg) utilizando a *iota*-carragenana (iN) como substrato (FIGURA 27). A reação com 15 horas produziu a fração iOT com 60% de rendimento, enquanto a reação de 2 horas gerou a fração iOP com 73% de rendimento.

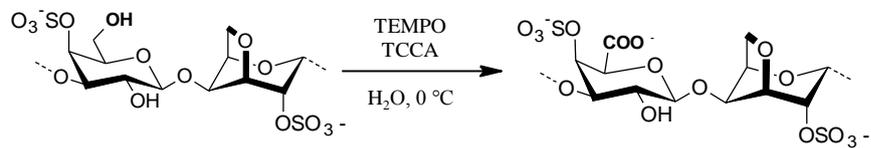


FIGURA 27- OXIDAÇÃO DA FRAÇÃO iN
 FONTE: O autor (2015)

A colorimetria para ácidos urônicos foi positiva para estas frações. A análise dos espectros de RMN ^1H das frações iOT e iOP (FIGURA 28) indicou a oxidação de C6 da unidade G4S. Foi observado a diminuição dos sinais em 3,79 e 3,81 ppm correspondentes aos H6 e H5 das unidades G4S nas duas frações, mas em diferentes intensidades. De modo a quantificar o grau de oxidação, os sinais de H5 e H6 e H2 (3,62 ppm) foram integrados e utilizados na Equação 3.

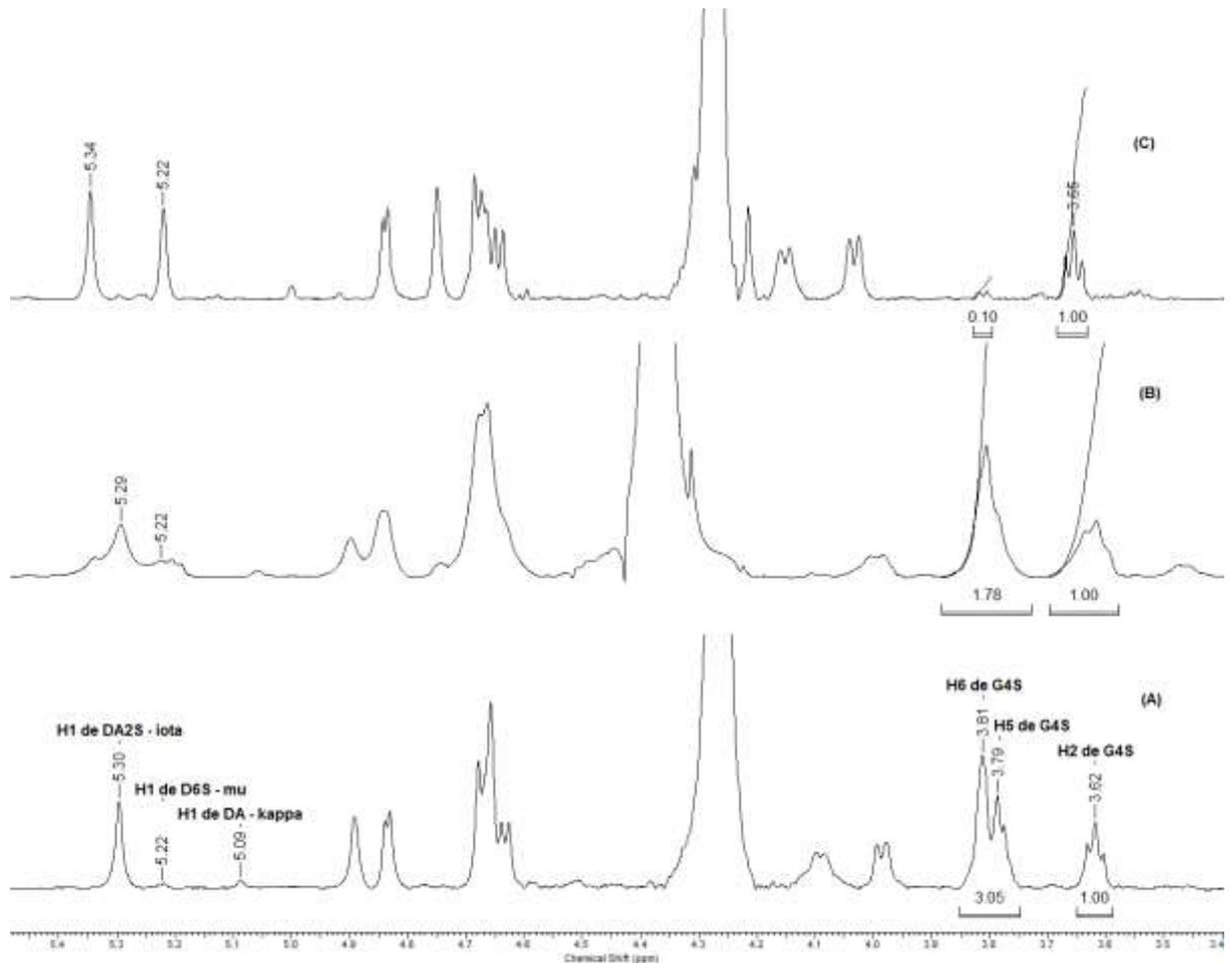


FIGURA 28- ESPECTROS DE RMN ^1H DAS FRAÇÕES iN (A), 70 °C, 600 MHz, iOP (B), 400 MHz, 60 °C E iOT (C), 70 °C, 600 MHz. Solvente D_2O , acetona como padrão interno ($\delta = 2,208$ ppm)
 FONTE: O autor (2015)

Os valores calculados indicaram 42% de oxidação para iOP e uma taxa >95% para iOT (TABELA 14).

TABELA 14- GRAU DE OXIDAÇÃO, PORCENTAGEM DE SULFATO, GRAU DE SULFATAÇÃO DOS PRODUTOS DE OXIDAÇÃO DA IOTA-CARRAGENANA

Fração	$\text{DS}_{\text{Oxidação}}$ (%)	$\text{DS}_{\text{Sulfatação}}$	$\%\text{SO}_4^-$
iN	0	1,8	33
iOP	42	1,4	28
iOT	>95	1,5	29

FONTE: O autor (2015)

NOTAS: $\text{DS}_{\text{Oxidação}}$ calculado a partir da Equação 3; $\text{DS}_{\text{Sulfatação}}$ e $\%\text{SO}_4^-$ calculados a partir da Equação 1, metodologia de Dogson; Price (1962)

De acordo com a TABELA 14, o $\text{DS}_{\text{Sulfatação}}$ diminuiu mas ainda apresenta o

sulfato na estrutura do polissacarídeo. Esse dado contrasta com os obtidos no espectro de RMN ^1H (FIGURA 28), onde não foram observados nenhuma evidencia de díades dessulfatadas. Sabe-se através de estudos de hidrólise parcial em carragenanas para obtenção de oligossacarídeos (GONÇALVES *et al.*, 2005; DUCATTI *et al.*, 2011), que o grupo sulfato apresenta labilidade em meio ácido dependente da posição de substituição na cadeia polissacarídica. Assim, a inserção do grupo carboxila pode estar afetando a taxa de hidrólise das ligações éster sulfato causando uma menor quantidade de sulfato disponível em solução para a precipitação com o Ba^{2+} .

A fração iOT foi analisada através dos mapas de correlação heteronucleares sobrepostos de HSQC (FIGURA 29) e apresentou deslocamentos já observados na oxidação da *kappa*-carragenana, como de 4,89/74,1 ppm para 5,21/75,2 ppm na fração iOT relativos a correlação G4/H4 da unidade GU4S e 3,79/76,9 ppm para 4,22/76,0 ppm para a correlação G5/H5 da unidade GU4S. Não foi observado a correlação H6/G6 em 4,24/4,09/71,8 ppm da unidade G4S indicando completa oxidação.

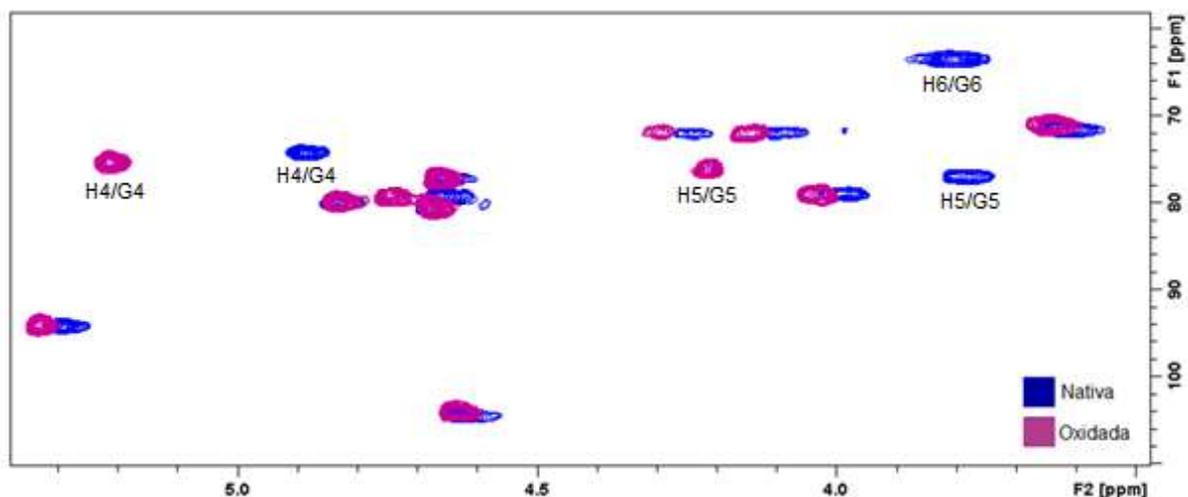


FIGURA 29- MAPAS DE CORRELAÇÃO BIDIMENSIONAIS HETERONUCLEARES HSQC DAS FRAÇÕES iN, 70 °C E iOT, 55 °C. 400 MHz, pH 5. Solvente D_2O , acetona como padrão interno ($\delta = 2,208$ e $32,69$ ppm para ^1H e ^{13}C)
 FONTE: O autor (2015)

A FIGURA 30B apresenta o espectro de RMN de ^{13}C da fração iOT. Foi observado o desaparecimento do sinal em 63,2 ppm relativo ao C6 de G4S (FIGURA 30A). Entretanto, ao contrário do relatado a fração kOT não foi observado o sinal

correspondente ao carbono carbonílico (G6 de GU4S) que ocorre em torno de 180 ppm, nem mesmo em baixa intensidade.

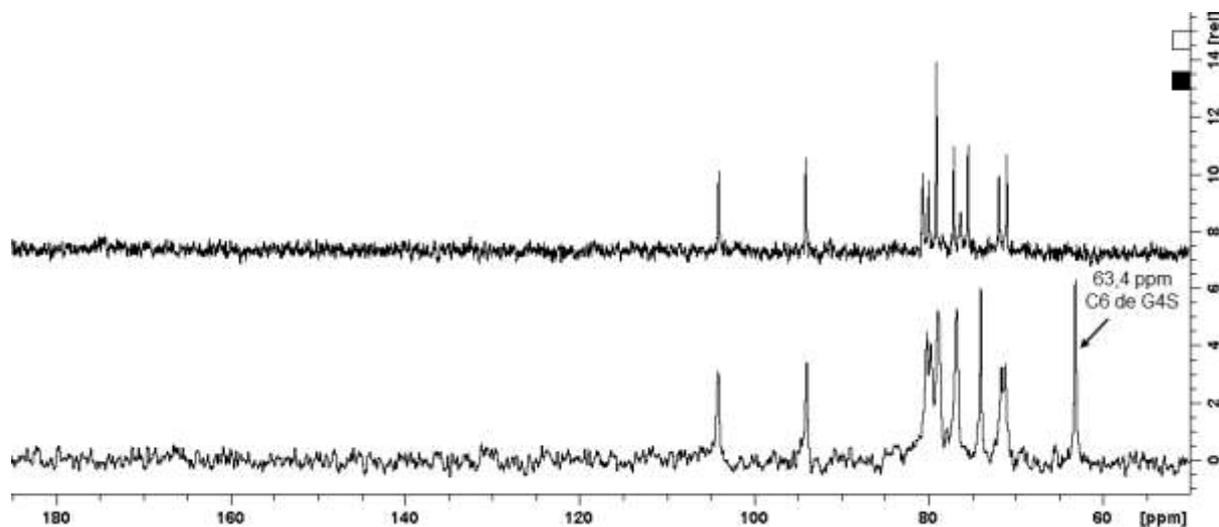


FIGURA 30- ESPECTROS DE RMN ^{13}C DAS FRAÇÕES iN (A) E iOT (B). 100 MHz, 70°C. Solvente D_2O , acetona como padrão interno ($\delta = 32,69$ ppm para ^{13}C - referente ao DSS - $\delta = 0,0$ ppm)
FONTE: O autor (2015)

Desse modo, através dos mapas de correlação (FIGURA 29) e de dados da literatura (USOV, 1984; USOV; SHASHKOV, 1985; VELDE *et al.*, 2002a, 2004;) foram determinados os assinalamentos da díade correspondente a *iota*-carragenana oxidada em C6 presente na fração iOT (TABELA 15).

TABELA 15- DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DE ^1H E ^{13}C RMN DAS DÍADES DE *IOTA*-CARRAGENANA NATIVA (iN) E OXIDADA (iOT) EM C6

Diade ^a	Unidade ^b	1	2	3	4	5	6
Nativa	G4S	4,62	3,62	4,00	4,89	3,79	3,81
		104,3	71,4	78,9	74,1	76,9	63,4
	DA2S	5,30	4,66	4,83	4,68	4,66	4,24/4,09
		94,1	79,1	79,9	80,4	77,0	71,8
Oxidada	GU4S	4,63	3,65	4,02	5,21	4,22	-
		103,8	70,9	79,0	75,2	76,0	n.d. ^c
	DA2S	5,33	4,74	4,83	4,68	4,66	4,30/4,14
		93,9	79,0	79,8	80,4	77,0	71,8

FONTE: O autor (2015)

NOTAS:^aDeslocamentos químicos a partir de experimentos de RMN 2D

^bNomenclatura adaptada do código de letras desenvolvido por Knutsen *et al.*(1994)

GU4S = β -D-galctopiranosidurônico 4-sulfato

^cn.d. = não detectado

A FIGURA 31 apresenta o espectro de infravermelho para as espécies oxidadas seletivamente (iOP e iOT) e nativa (iN) onde é possível observar o aparecimento de uma leve banda em 1732 cm^{-1} característico da ligação C=O de grupos carboxila e em 1400 cm^{-1} da ligação C-O-H de acordo com o aumento da oxidação. Ainda há a presença de bandas típicas de i-carragenana em 805 cm^{-1} , característico de C2-O-S em 3,6-anidro- α -D-galactopirranose, 846 cm^{-1} referente à ligação C4-O-S na unidade G4S e em 930 cm^{-1} da ligação C-O referente à ponte 3,6-anidro- α -D-galactopirranose (SILVERSTEIN; BASSLER; MORILL, 1994; PRADO-FERNÁNDEZ *et al.*, 2003).

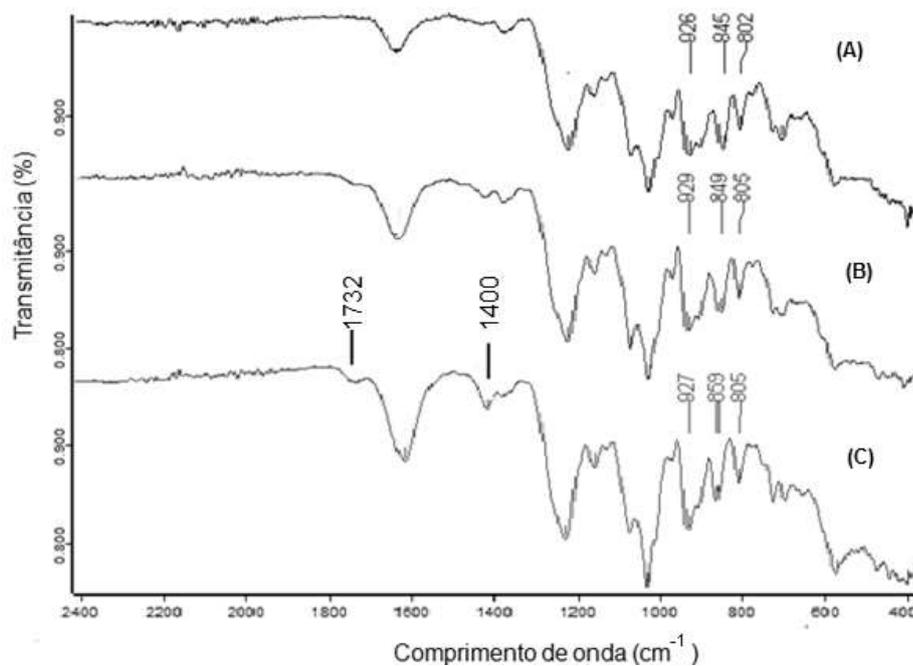


FIGURA 31- ESPECTROS DE INFRAVERMELHO DAS FRAÇÕES iN (A), iOP (B) E iOT (C). Região entre 1400 e 600 cm^{-1}
 FONTE: O autor (2015)

A fração i/vOT foi obtida a partir da oxidação seletiva tamponada ($\text{pH} = 9,6$) utilizando 3 equiv de TCCA e 0,2 equiv do reagente TEMPO, 15 horas, em escala preparativa (300 mg) utilizando a fração i/vNR como substrato (FIGURA 32). A reação recuperou 46% de produto e apresentou resultados positivos para a dosagem de ácido urônico.

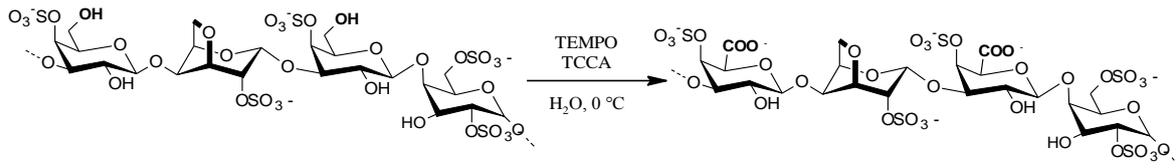


FIGURA 32 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA OXIDAÇÃO DA FRAÇÃO i/vNR
 FONTE: O autor (2015)

A FIGURA 33 apresenta os espectros de ^1H das frações i/vNR (A) e iOT (B), onde observa-se a diminuição dos sinais em 3,79 e 3,81 ppm, correspondes aos H6 e H5 das unidades G4S. Eles foram integrados juntamente com o sinal de H2 desta mesma unidade em 3,65 ppm, e assim o grau de oxidação foi estimado em 95% através da Equação 3. No espectro foi observado ainda o deslocamento de H1 de DA2S de 5,30 para 5,35 ppm corroborando com os dados dos mapas de correlação (FIGURA 34).

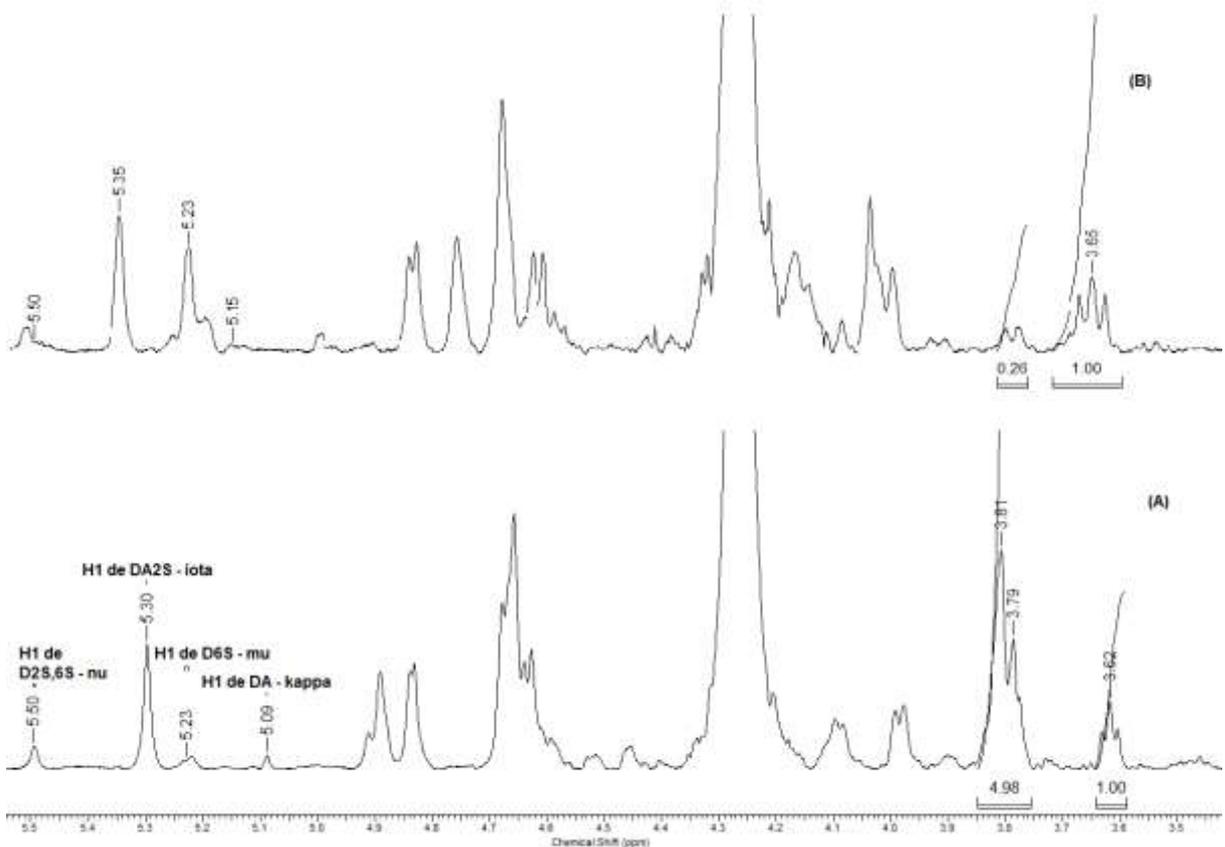


FIGURA 33- ESPECTROS DE RMN ^1H DAS FRAÇÕES i/vNR (A) E iOT (B). 600 MHz, $70\text{ }^\circ\text{C}$, Solvente: D_2O , acetona como padrão interno ($\delta = 2,208\text{ ppm}$)
 FONTE: O autor (2015)

Como caracterizado na seção 6.1.2, p. 69, (FIGURA 11), a *ι*/vNR é constituída em 71% de *iota*-carragenana, sendo sua principal diferença da díade de *iota*-carragenana, a presença do sinal em 5,50 ppm, correspondente ao H1 da unidade de D26,6S (USOV; SHASHKOV, 1985).

Nos mapas de correlação heteronucleares sobrepostos de HSQC editado (SASSAKI *et al.*, 2011) (FIGURA 34) pode-se observar a correlação C6/H6 (3,81/63,2 ppm) da unidade G4S na amostra nativa em fase negativa (azul), pois neste experimento as correlações pertencentes a carbonos CH₂ aparecem invertidos.

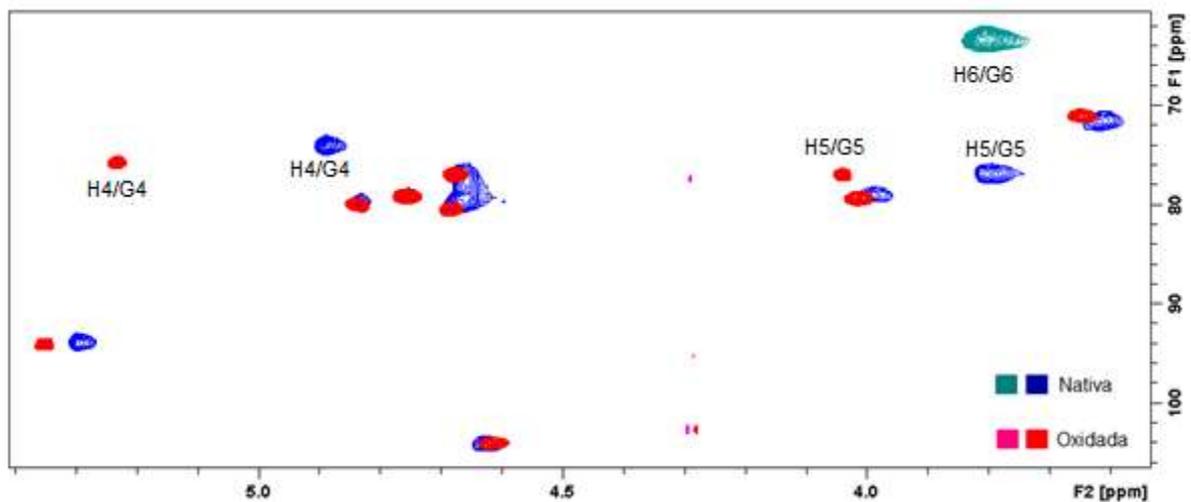


FIGURA 34- MAPAS DE CORRELAÇÃO BIDIMENSIONAIS HETERONUCLEARES HSQC EDITADOS DAS FRAÇÕES *ι*/vNR, 400 MHz, 70°C, pH 4 E *ι*/vOT, 600 MHz, 70 °C, pH 7. Solvente D₂O, acetona como padrão interno ($\delta = 2,208$ e $32,69$ ppm para ¹H E ¹³C)
 FONTE: O autor (2015)

Utilizando os mapas de correlação da FIGURA 34, foi realizado o assinalamento para a fração *ι*/vOT. As correlações observadas foram semelhantes à descrita para a fração *ι*OT da díade de *iota*-carragenana oxidada em C6 (TABELA 15), com algumas diferenças na unidade G4US, especificamente na correlação de C5/H5 (4,04/ 76,8 ppm) e na unidade DA2S, nas correlações de C2/H2 (4,68/80,4) e C6/H6 (4,29/77,3) quando comparada a díade oxidada G4US-DA2S da fração *ι*OT (TABELA 15).

A dosagem de sulfato para a amostra *ι*/vNR apresentou o DS_{Sulfatação} de 2,7. Após a oxidação a amostra *ι*/vOT apresentou um DS_{Sulfatação} de 1. Esse resultado confirma a presença de sulfato na fração *ι*/vOT e foi realizado três vezes. O baixo

$DS_{\text{Sulfatação}}$ encontrado para a fração oxidada pode ter sido influenciado pela metodologia de determinação de sulfato.

O espectro de Infravermelho (FIGURA 35) apresentou as bandas características de *iota*-carragenana, sendo uma em 805 cm^{-1} , característica de C2-O-S em 3,6-anidro- α -D-galactopiranosose, outra em 857 cm^{-1} referente a ligação C4-O-S na unidade G4S e a banda em 930 cm^{-1} da ligação C-O referente à ponte 3,6-anidro- α -D-galactopiranosose. Foi possível notar o aparecimento de uma leve banda em 1400 cm^{-1} proveniente da deformação angular de C-O-H do íon carboxilato e outra leve ondulação em 1736 cm^{-1} característico da absorção da ligação C=O de grupos carboxila (SILVERSTEIN; BASSLER; MORILL, 1994; PRADO-FERNÁNDEZ *et al.*, 2003).

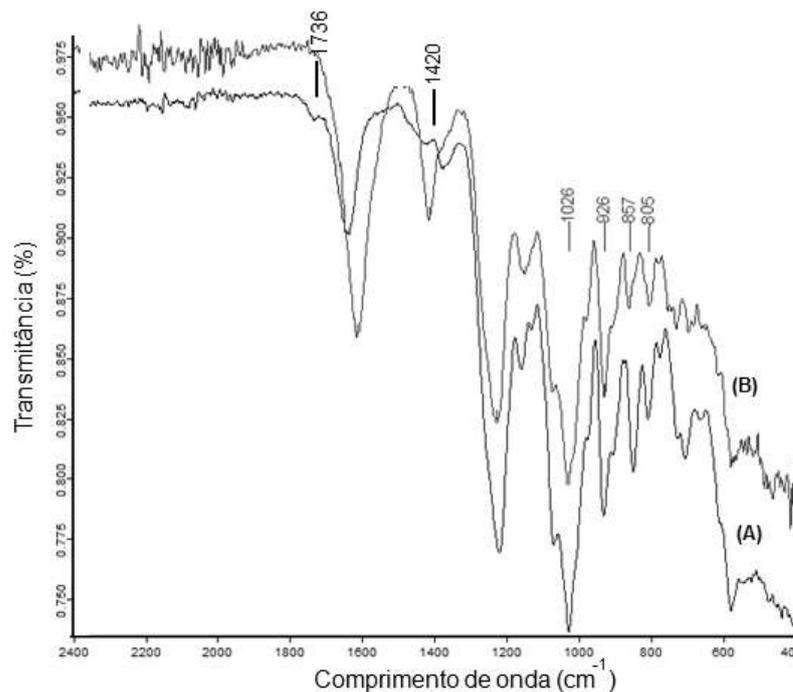


FIGURA 35- ESPECTROS DE INFRAVERMELHO DAS FRAÇÕES i/vNR (A), i/vOT (B). Região entre 2400 e 400 cm^{-1}
 FONTE: O autor (2015)

6.2.6 Síntese e caracterização das frações oxidadas seletivamente θOP e θOT

A fração θN foi oxidada seletivamente (FIGURA 36) em escalas preparativas utilizando 3 equivalentes de TCCA durante 2 horas produzindo a fração θOP com

74% de rendimento e 15 horas, reação que produziu a fração θ OT com 81% de rendimento. Ambas as frações oxidadas, mas em graus diferentes, apresentaram resultados positivos para a dosagem de ácido urônico.

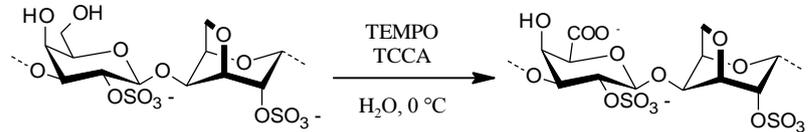


FIGURA 36- REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA OXIDAÇÃO DA FRAÇÃO θ N
 FONTE: O autor (2015)

Para a quantificação do grau de oxidação nas frações oxidadas foram utilizados os espectros de RMN ^1H (FIGURA 37). Os resultados estão apresentados na TABELA 16. Foram utilizadas para o cálculo a área dos sinais em 3,77 e 3,71 ppm, correspondente aos H6 e H5 da unidade G2S e o sinal de H1 da unidade DA2S em 5,30 ppm na seguinte equação:

$$\text{DS}_{\text{Oxidação}} = \left[\frac{\left(\frac{G_{5,6}}{H1_{\text{Oxidado}}} \right)}{\left(\frac{G_{5,6}}{H1_{\text{Nativo}}} \right)} \times 100 \% \right] - 100 \% \quad (4)$$

onde:

G 5,6 = representa a área de integração correspondente aos H6 e H5 das unidades β -D-galactopiranosose 2-sulfato;

H1 = representa a área de integração correspondente ao H1 das unidades 3,6-anidro- α -D-galactopiranosose 2-sulfato.

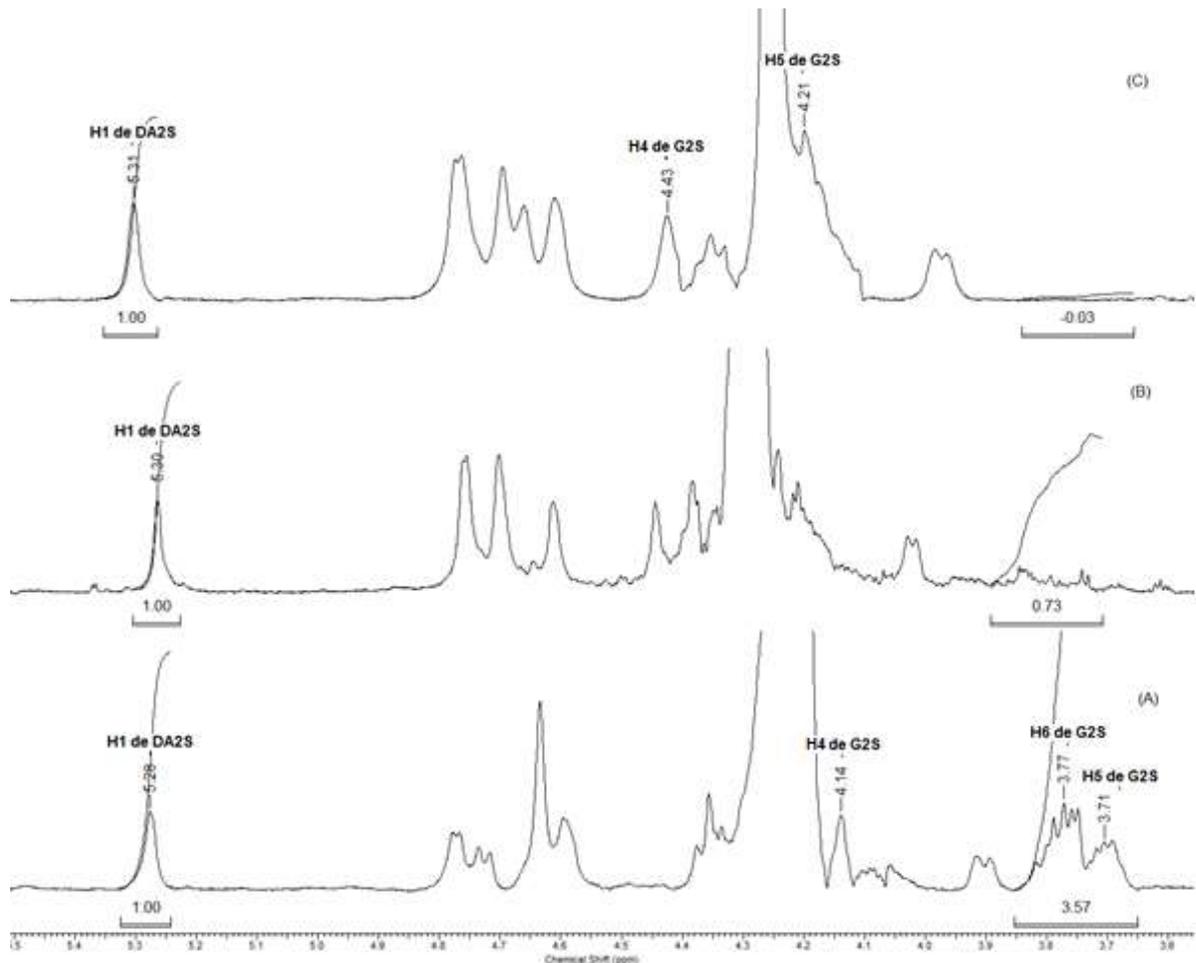


FIGURA 37- ESPECTROS DE RMN ^1H DAS FRAÇÕES θN (A), 70 °C, 400 MHz, θOP (B), 70 °C, 600 MHz E θOT (C), 70 °C, 400 MHz. Solvente D_2O , acetona como padrão interno ($\delta = 2,208$ ppm)
 FONTE: O autor (2015)

A TABELA 16 apresenta o $\text{DS}_{\text{Oxidação}}$, porcentagem e $\text{DS}_{\text{Sulfatação}}$ das frações θOP e θOT .

TABELA 16– GRAU DE OXIDAÇÃO, PORCENTAGEM DE SULFATO E GRAU DE SULFATAÇÃO DAS FRAÇÕES OXIDADAS A PARTIR DE *THETA*-CARRAGENANA

Fração	$\text{DS}_{\text{Oxidação}}$ (%)	$\text{DS}_{\text{Sulfatação}}$	$\%\text{SO}_4^-$
θN	0	3,0	42
θOP	80	2,1	36
θOT	>95	1,2	25

FONTE: O autor (2015)

NOTAS: $\text{DS}_{\text{Oxidação}}$ calculados a partir de espectro de RMN ^1H da FIGURA 37 utilizando a Equação 4; $\text{DS}_{\text{Sulfatação}}$ e $\%\text{SO}_4^-$ calculados a partir da Equação 1, metodologia de Dogson; Price (1962)

Observa-se que o $DS_{\text{Sulfatação}}$ diminuiu com o aumento da oxidação. Foram realizadas mais de uma dosagem e mesmo assim esses resultados se mantiveram. Contudo, as análises de RMN realizadas (^1H e ^{13}C) não indicam perda de sulfato, sugerindo interferências no método utilizado para a quantificação.

A fração θOT foi caracterizada através dos mapas de correlação bidimensionais heteronucleares sobrepostos de HSQC. A FIGURA 38 apresenta os mapas das frações θN e θOT .

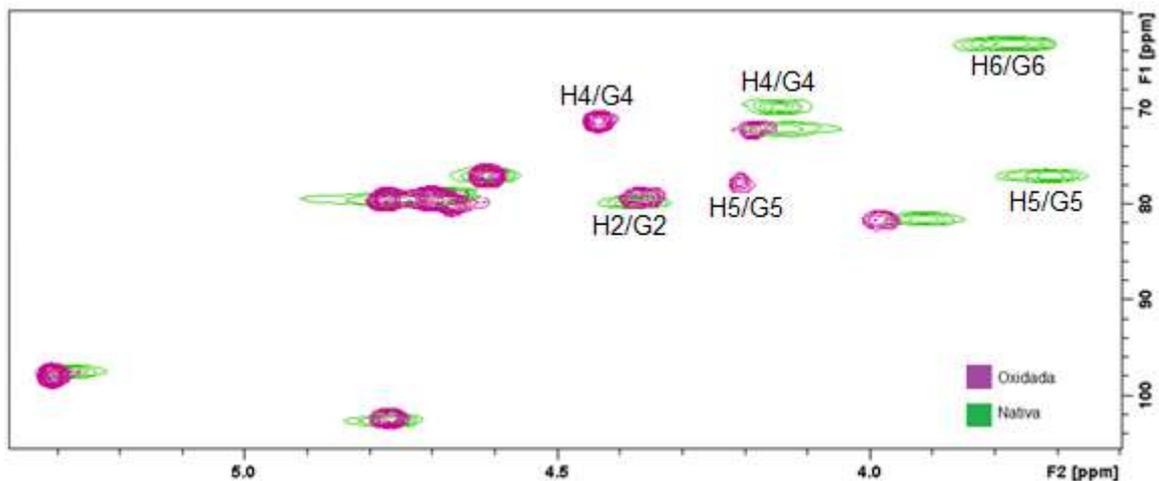


FIGURA 38- MAPAS DE CORRELAÇÃO BIDIMENSIONAIS HETERONUCLEARES HSQC DAS FRAÇÕES θN , 60 °C E θOT , 70 °C. 400 MHz. Solvente D_2O , acetona como padrão interno ($\delta = 2,208$ e 32,69 ppm para ^1H e ^{13}C)
 FONTE: O autor (2015)

Comparando os dois mapas de correlação acima, observa-se o deslocamento H5/C5 da unidade G2S de 3,71/77,0 ppm na fração θN para 4,21/77,6 ppm na fração θOT e o deslocamento da correlação C4/H4 da unidade G2S de 4,14/69,8 ppm para 4,43/71,3 ppm na unidade GU2S, similar ao observado para a unidade GU4S na oxidação de *kappa*- e *iota*-carragenanas. A ausência da correlação H6/G6 da unidade GU2S comprova a oxidação seletiva. A correlação C2/H2 da unidade DA2S apresenta os deslocamentos de 4,60/77,0 ppm na fração θN e 4,70/79,3 na fração θOT devido a presença do éster sulfato ligado em C2 de DA2S.

A FIGURA 39 apresenta a análise da fração θOT por RMN ^{13}C . Observa-se o desaparecimento do sinal referente ao C6 de G2S em 63,2 ppm e o deslocamento do C4 de G2S de 69,8 ppm para campo mais baixo, em 71,3 ppm, ambas evidências da oxidação. Não foi possível identificar o sinal do carbono carbonílico de C6 GU2S.

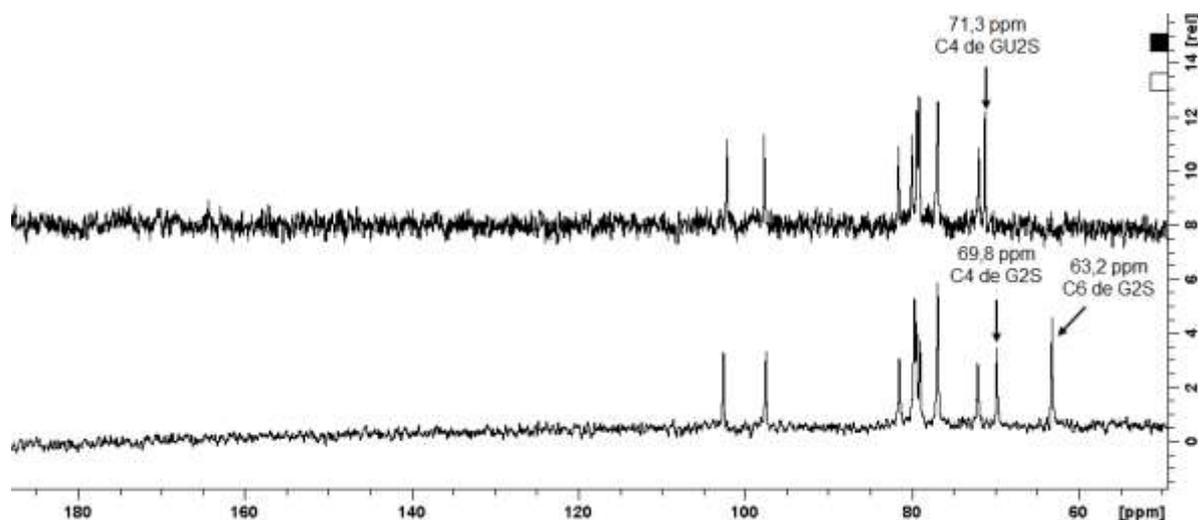


FIGURA 39- ESPECTROS DE RMN ^{13}C DAS FRAÇÕES θN (A) E θOT (B), pH 5, 100 MHz, 60°C , Solvente D_2O , acetona como padrão interno ($\delta = 32,69$ ppm para ^{13}C - Referente ao DSS - $\delta = 0,0$ ppm)
 FONTE: O autor (2015)

Através dos mapas de correlação (FIGURA 38) e de dados da literatura (USOV, 1984; FALSHAW; FURNEAUX, 1994; ARAÚJO *et al.*, 2013) foram determinados os assinalamentos da díade oxidada de *theta*-carragenana na fração θOT (TABELA 17).

TABELA 17- DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DE ^1H E ^{13}C DAS DÍADES DE *THETA*-CARRAGENANA NATIVA (θN) E OXIDADA (θOT) EM C6^{a}

Fração	Unidade ^b .	1	2	3	4	5	6
θN	G2S	4,76	4,36	3,91	4,14	3,71	3,77
		102,6	80,0	81,5	69,8	77,0	63,2
	DA2S	5,29	4,60	4,76	4,70	4,66	4,13
		97,5	77,0	79,4	79,6	79,0	72,0
θOT	GU2S	4,76	4,36	3,98	4,43	4,21	-
		102,3	79,2	81,6	71,3	77,6	n.d. ^c
	DA2S	5,30	4,70	4,77	4,77	4,61	4,19
		97,8	79,3	79,4	79,9	77,0	72,2

FONTE: O autor (2015)

NOTAS: ^aDeslocamentos químicos a partir de experimentos de RMN 2D

^bNomenclatura adaptada do código de letras desenvolvido por Knutsen *et al.*(1994)

GU2S = β -D-galctopiranosidurônico 2-sulfato

^cn.d. = não detectado

A FIGURA 40 apresenta o espectro de infravermelho das frações θ N (A), θ OP (B) e θ OT (C). Os espectros apresentam bandas características de θ -carragenana, como as bandas de absorção em 930 cm^{-1} referente à ponte 3,6-anidrogactose, em 805 cm^{-1} referente às ligações C2-O-S em GS2 e 830 cm^{-1} devido a C2-O-S na DA2S. A ausência de banda em 845 cm^{-1} (C4-O-S em G4S) e 820 cm^{-1} da ligação C6-O-S da unidade D2S,6S, mostra que não há contaminação significativa de κ -, ι - e λ -carragenana, respectivamente. Indicando a oxidação, aparecem leves bandas em 1732 cm^{-1} e 1420 cm^{-1} das ligações C=O e C-O-H da carboxila (SILVERSTEIN; BASSLER; MORILL, 1994; PRADO-FERNÁNDEZ *et al.*, 2003).

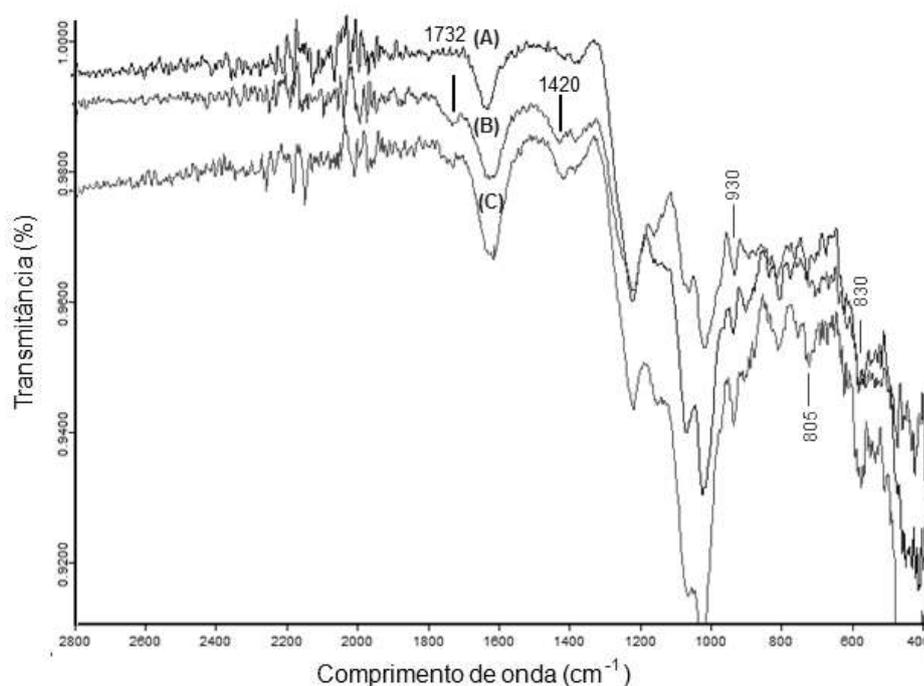


FIGURA 40- ESPECTROS DE INFRAVERMELHO DAS FRAÇÕES θ N (A), θ OP (B) E θ OT (C). REGIÃO ENTRE $2800\text{ E }400\text{ cm}^{-1}$
 FONTE: O autor (2015)

6.2.7 Síntese e caracterização das frações oxidadas seletivamente λ OP e λ OT

Foram realizadas oxidações seletivas na fração λ N utilizando o TEMPO e 3 equiv de TCCA, em tampão carbonato, pH 9,6, a $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ em escala preparativa (300 mg) (FIGURA 41). Uma reação foi realizada em 15 horas produzindo a fração λ OT com 75% de rendimento. A outra ocorreu em 2 horas obtendo um rendimento de 77% (λ OP).

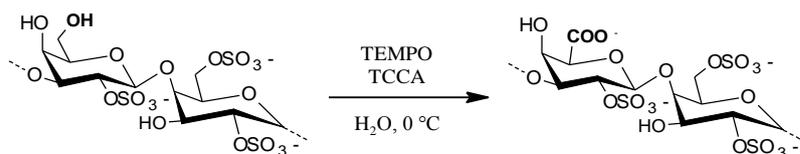


FIGURA 41- REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA OXIDAÇÃO DA FRAÇÃO λ N
 FONTE: O autor (2015)

Ambas as frações apresentaram resultado positivo na dosagem de ácidos urônicos. Para a quantificação das frações oxidadas foram utilizados os espectros de RMN ^1H da FIGURA 42. Para a fração λ OP (FIGURA 42B) foi observado a diminuição do sinal em 3,68 e 3,82 ppm, relativos aos H5 e H6 de G2S, respectivamente. Já para a fração λ OT foi observado o desaparecimento desses sinais no espectro da FIGURA 42C, indicando completa oxidação em C6. Os sinais de H5 e H3 de GU2S deslocam-se para 4,05 e 4,03 ppm e o sinal de H4 de GU2S apresenta um deslocamento de 4,25 (FIGURA 42A) para 4,49 ppm (FIGURA 42C).

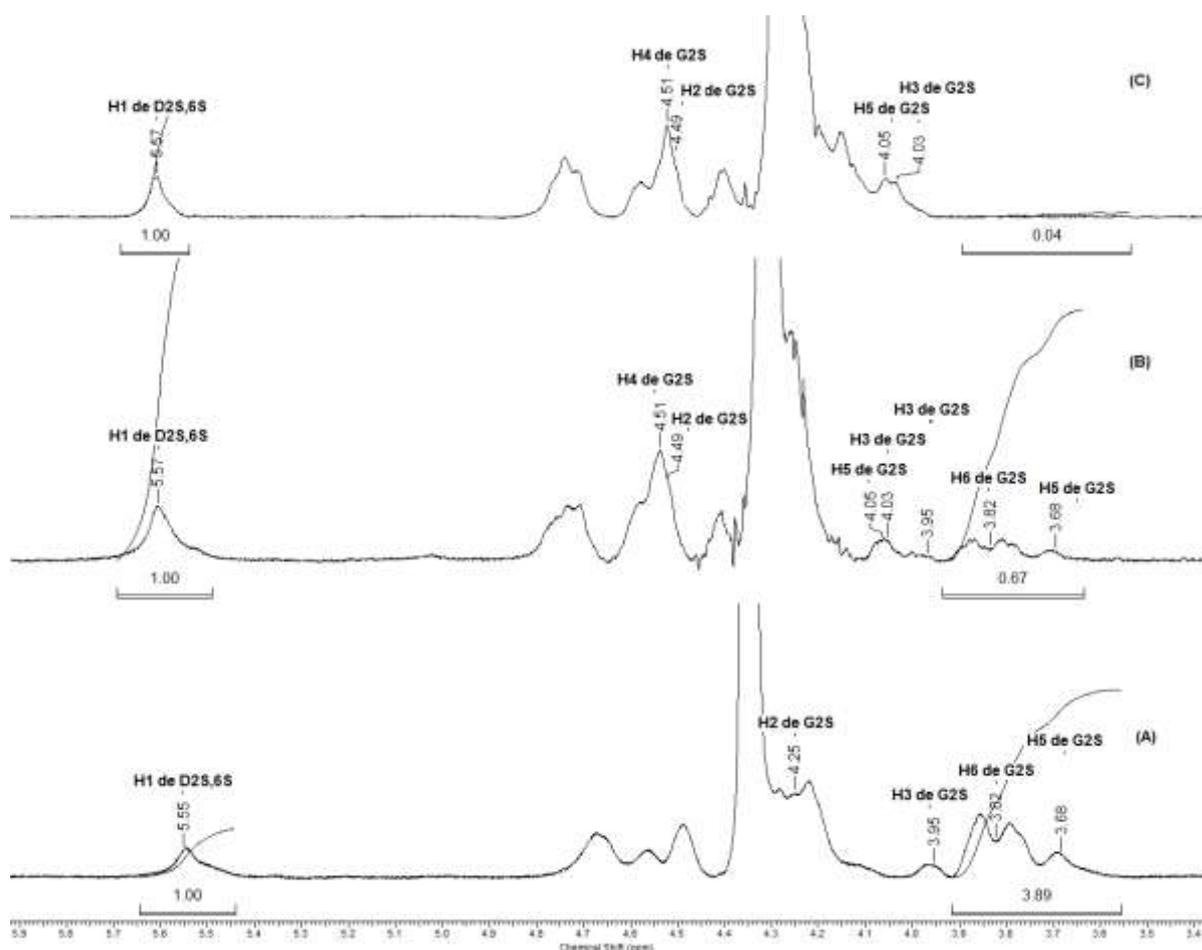


FIGURA 42- ESPECTROS DE RMN ^1H DAS FRAÇÕES λ N (A), 400 MHz, 55 ° C, λ OP (B), 400 MHz, 70 ° C E λ OT (C) 400 MHz, 70 ° C. Solvente D_2O , acetona como padrão interno ($\delta = 2,208$ ppm)
 FONTE: O autor (2015)

Para a quantificação da oxidação, foram utilizadas a área dos sinais correspondentes aos H6 e H5 da unidade G2S em 3,68 e 3,82 ppm, e o sinal de H1 da unidade D2S,6S em 5,55 ppm. Dessa forma foi possível obter os graus de oxidação das frações θ OP e θ OT. Assim, a TABELA 18 apresenta o $DS_{\text{Oxidação}}$, $DS_{\text{Sulfatação}}$ e a porcentagem de sulfato.

TABELA 18– GRAU DE OXIDAÇÃO, PORCENTAGEM DE SULFATO E GRAU DE SULFATAÇÃO DAS FRAÇÕES OXIDADAS A PARTIR DE *LAMBDA*-CARRAGENANA

Fração	$DS_{\text{Oxidação}}$ (%)	$DS_{\text{Sulfatação}}$	% SO_4^-
λ N	0	2,0	35
λ OP	83	2,0	35
λ OT	>95	1,8	32

FONTE: O autor (2015)

NOTAS: $DS_{\text{Oxidação}}$ calculado a partir da Equação 4; $DS_{\text{Sulfatação}}$ e % SO_4^- calculados a partir da Equação 1, metodologia de Dogson; Price (1962)

Ao comparar os valores de $DS_{\text{sulfatação}}$ observa-se uma pequena variação, indicando que a condição tamponada e preparativa não removeu os grupamentos sulfatos.

As frações da *lambda*-carragenana λ N e λ OT foram analisadas através dos mapas de correlação bidimensionais heteronucleares HSQC da FIGURA 43.

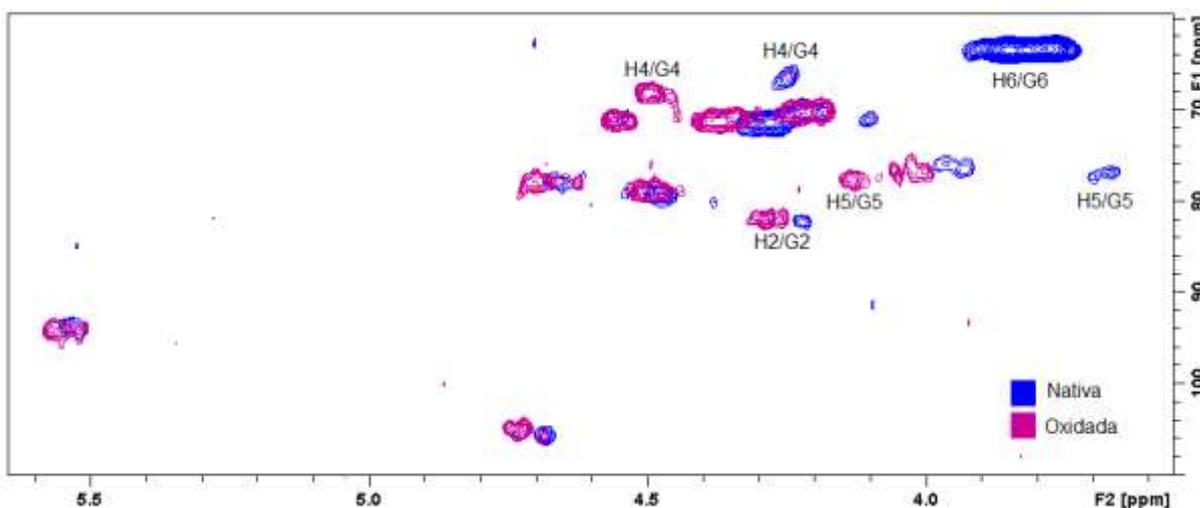


FIGURA 43- MAPAS DE CORRELAÇÃO BIDIMENSIONAIS HETERONUCLEARES HSQC DAS FRAÇÕES λ N E λ OT. 70 °C, 400 MHz. Solvente D_2O , acetona como padrão interno ($\delta = 2,208$ e $32,69$ ppm para ^1H e ^{13}C)

FONTE: O autor (2015)

A sobreposição dos dois mapas evidencia a ausência da correlação H6/C6 de GU2S. Os deslocamentos referentes à correlação C4/H4 de 4,25/66,4 ppm em G2S para 4,49/68,0 ppm em GU2S e de 3,68/76,8 ppm correspondentes a correlação C5/H5 ppm em G2S para 4,05/76,7 ppm em GU2S demonstram que a carragenana foi oxidada. Ainda podem ser destacados os deslocamentos de H2/C2 de 4,22/82,1 ppm em G2S para 4,28/82,0 ppm em GU2S.

No espectro de ^{13}C (FIGURA 44) foi observado a ausência do sinal em 63,3 ppm referente ao C6 de G2S. O sinal do C6 carbonílico (C6 de GU2S) em 176,0 ppm apresentou baixa intensidade.

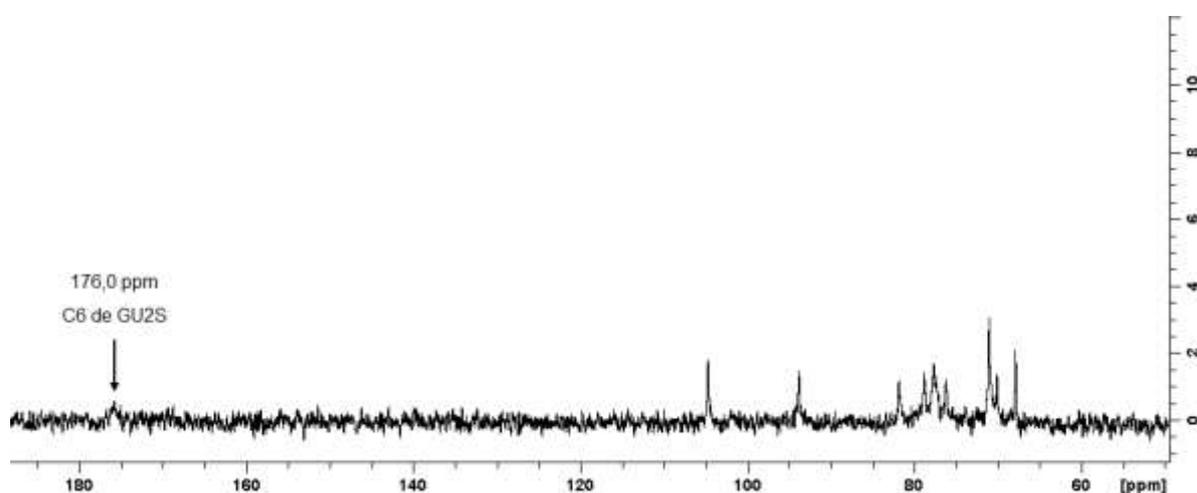


FIGURA 44- ESPECTRO DE RMN ^{13}C DA FRAÇÃO λOT , 100 MHz, 70°C. Solvente: D_2O ; acetona como padrão interno ($\delta = 32,69$ ppm para ^{13}C - referente ao DSS - $\delta = 0,0$ ppm)
 FONTE: O autor (2015)

Desse modo, por meio dos mapas de correlação da FIGURA 43 e da literatura (USOV, 1984; FALSHAW; FURNEAUX, 1994) foram obtidos os deslocamentos químicos da díade de *lambda*-carragenana oxidada em C6 (TABELA 19).

TABELA 19- DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DE ^1H E ^{13}C DAS DÍADES DE LAMBDA-CARRAGENANA NATIVA (λN) E C6 OXIDADA (λOT)

Díade ^a	Unidade ^b	1	2	3	4	5	6
Nativa λN	G2S	4,68	4,22	3,95	4,25	3,68	3,82
	D2S,6S	105,6	82,1	76,0	66,4	76,8	63,3
λOT	G2S	5,55	4,48	4,66	4,61	4,54	4,28/4,22
		93,6	79,3	77,9	77,2	77,3	71,3
	D2S,6S	4,72	4,28	4,03	4,49	4,05	-
		104,9	82,0	76,7	68,0	76,7	176,0
	D2S,6S	5,57	4,51	4,68	4,65	4,56	4,37/4,21
		93,9	78,9	77,8	77,5	71,0	71,1

FONTE: O autor (2015)

NOTAS: ^aDeslocamentos químicos a partir de experimentos de RMN 2D

^bNomenclatura adaptada do código de letras desenvolvido por Knutsen *et al.*(1994)

GU2S = β -D-galactopiranosidurônico 2-sulfato

A FIGURA 45 apresenta os espectros de infravermelho das frações λN (A), λOP (B) e λOT (C). Observa-se a presença das bandas de absorção em 821 cm^{-1} , característica de C6-O-S da unidade D2S,6S e a ausência de 930 cm^{-1} mostrando que não está ciclizada (PRADO-FERNÁNDEZ *et al.*, 2003). As bandas que evidenciam a oxidação em 1735 cm^{-1} das ligações C=O é melhor observada na fração λOP (FIGURA 45B) e a banda em 1400 cm^{-1} das ligações C-O-H é melhor observada na fração λOT (FIGURA 45A) (SILVERSTEIN; BASSLER; MORILL, 1994; PRADO-FERNÁNDEZ *et al.*, 2003).

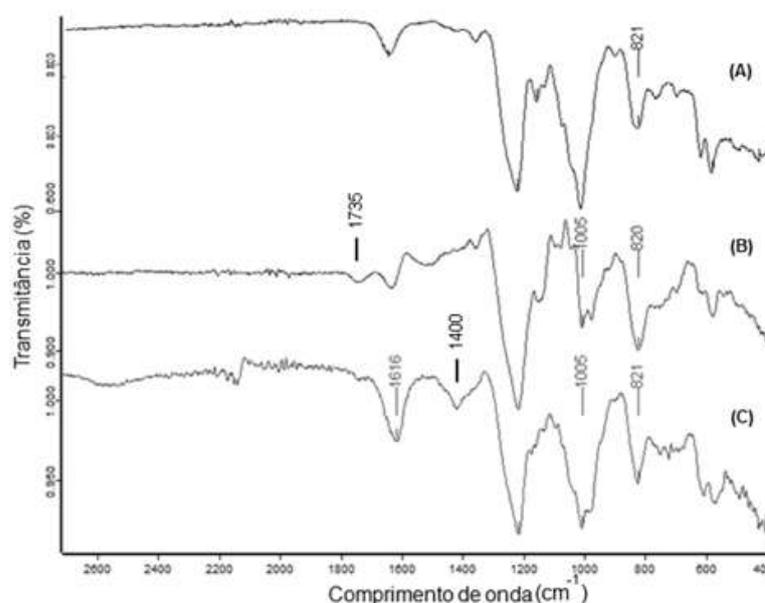


FIGURA 45- ESPECTRO DE INFRAVERMELHO DAS FRAÇÕES λN (A), λOP (B) E λOT (C). Região entre 2600 e 400 cm^{-1}

FONTE: O autor (2015)

A TABELA 20 apresenta os rendimentos e $DS_{\text{Oxidação}}$ de todas as frações obtidas após a redução e oxidação seletiva das frações κ NP, κ NR, ι/ν NR, ι N e θ N.

TABELA 20- RENDIMENTOS OBTIDOS NAS ETAPAS DE OBTENÇÃO DAS CARRAGENANAS*

Carragenana	Fração	Rendimento (%)	$DS_{\text{Oxidação}}$ (%)
κ -carragenana reduzida	κ NR	91	--
ι/ν -carragenana reduzida	ι/ν NR	90	--
κ -carragenana oxidada total por titulometria	κ OTT	76	>95
κ -carragenana oxidada total	κ OT	83	87
ι -carragenana oxidada parcial	ι OP	73	42
ι -carragenana oxidada total	ι OT	60	>95
ι/ν -carragenana oxidada total	ι/ν OT	46	95
θ -carragenana oxidada parcial	θ OP	74	83
θ -carragenana oxidada total	θ OT	81	>95
λ -carragenana oxidada parcial	λ OP	77	80
λ -carragenana oxidada total	λ OT	75	>95

FONTE: O autor (2015)

NOTAS: *Em relação à massa seca

$DS_{\text{Oxidação}}$ calculados a partir de espectro de RMN ^1H

Observando-se a TABELA 20 é possível comparar os rendimentos e $DS_{\text{Oxidação}}$ encontrados para as reações de oxidação seletiva realizadas nas carragenanas κ -, ι -, ι/ν -, θ - e λ .

A κ -carragenana em comparação as carragenanas ι -, ι/ν -, θ - e λ apresentou grande facilidade em ser solubilizada em água destilada, sendo a reação de oxidação seletiva mais rápida. Com 2 horas a reação foi completa. Comparando as metodologias utilizadas na oxidação seletiva da κ -carragenana, o processo que envolveu a titulação com NaOH (fração κ OTT) exibiu diminuição no rendimento em relação à massa seca quando comparada à reação realizada utilizando o meio tamponado (κ OT).

O aumento do tempo de reação de 2 para 15 horas para produzir as frações θ OT e λ OT nas carragenanas θ - e λ - não prejudicou os respectivos rendimentos em relação à massa seca. Essas duas carragenanas foram facilmente solúveis em água destilada e apresentaram fácil capacidade de oxidação, visto que com 2 horas as reações exibiram oxidação quase completa.

As carragenanas I- e I/v-carragenana apresentaram a menor solubilidade em água destilada, sendo necessário um tempo maior de solubilização ou aquecimento para completa solubilização. Apresentaram oxidação seletiva mais lenta que as demais carragenanas utilizadas, como observado para a fração IOP, sendo obtidos os menores rendimentos.

6.3 DETERMINAÇÃO DA MASSA MOLECULAR

6.3.1 Curvas padrão de polissacarídeos para estimação de massa molecular relativa

Foram utilizados padrões de dextrana e óxido de polietileno (utilizados na calibração das colunas do HPSEC-MALLS) para estimação da massa molecular. A utilização de padrões como dextransas e pululanas (GÓMEZ-ORDÓÑEZ; JIMÉNEZ-ESCRIG; RUPÉREZ, 2012), polímeros neutros, não é o método mais adequado para a determinação de massas moleculares de outros polissacarídeos (SPICHTIG; AUSTIN, 2008) visto que o HPSEC (Cromatografia de exclusão estérica de alta precisão) separa as moléculas pela forma e volume hidrodinâmico que ocupam em solução e não simplesmente pela massa molecular. Contudo, as tentativas iniciais para determinação das massas moleculares utilizando o HPSEC não foram satisfatórias, pois apenas algumas delas apresentaram espalhamento no detector MALLS.

Assim, os padrões e as carragenanas foram injetados no cromatógrafo de exclusão estérica HPSEC acoplado aos detectores: espalhamento de luz laser em multiângulos (MALLS) e índice de refração (IR).

Foi obtido o tempo de retenção (min) das carragenanas nativas e oxidadas, e por meio de regressão linear utilizando a equação da reta de cada curva dos padrões (TABELA 6) foram obtidas as estimativas das massas moleculares relativas para cada carragenana apresentadas na TABELA 21.

TABELA 21- TEMPOS DE RETENÇÃO (MIN) E MASSA MOLECULAR RELATIVA DAS CARRAGENANAS OBTIDAS ATRAVÉS DAS CURVAS PADRÕES DE CALIBRAÇÃO DE DEXTRANA E ÓXIDO DE POLIETILENO

Fração	DS _{Oxidação} (%)	Tempo de retenção (min)	MM _R (x10 ⁵ g/mol) Curva de dextrana	MM _R (x10 ⁵ g/mol) Curva de óxido de polietileno
κNR	*	43,67	4,30	2,22
κOT	87	51,42	0,19	0,17
ιN	*	48,25	0,69	0,48
ιOP	42	41,92	8,68	3,97
ιOT	>95	50,42	0,29	0,24
ι/νNR	*	47,75	0,84	0,57
ι/νOT	95	52,17	0,14	0,13
λN	*	42,33	7,34	3,46
λOP	80	44,25	3,41	1,83
λOT	>95	45	2,53	1,43
θN	*	44,83	0,84	0,57
θOP	83	45,92	1,75	1,05
θOT	>95	47,5	0,93	0,62

FONTE: O autor (2015)

NOTAS: *Frações não-oxidadas

Foi observado que as massas relativas obtidas pelas duas curvas são diferentes. Como algumas amostras apresentaram o espalhamento no detector MALLS, sendo elas λN, λOP, λOT, θN, θOP e θOT, foi construída uma curva padrão de calibração de carragenanas com estas com o propósito de determinação das massas moleculares das demais carragenanas. Os perfis de eluição obtidos por HPSEC-MALLS/IR podem ser visualizados no ANEXO 2. A TABELA 22 representa os dados.

TABELA 22- TEMPO DE RETENÇÃO, M_w E PARÂMETROS DA CURVA PADRÃO DE CALIBRAÇÃO DE CARRAGENANAS

Fração	M _w (x10 ³ g/mol)	Tempo de retenção (min)	Log M _w	Curva de calibração
λN	180900	42,33	5,26	$y = -0,1509x + 11,68$ $r^2 = 0,9012$
λOP	143500	44,25	5,16	
λOT	80050	45,00	4,90	
θN	68160	44,83	4,83	
θOP	48370	45,92	4,68	
θOT	34680	47,5	4,54	

FONTE: O autor (2015)

NOTAS: X= tempo de retenção (min); y= log M_w; r² = coeficiente de determinação

A curva padrão de calibração de carragenanas (ANEXO 3) foi plotada em uma escala de log de M_w contra o tempo de retenção (min). O gráfico apresentou o coeficiente de determinação, r^2 , 0,9012 e por meio de regressão linear da curva foi obtida a estimativa da massa molecular relativa para as carragenanas κ NR, κ OT, ι N, ι OP, ι OT, ι/ν NR e ι/ν OT apresentadas na TABELA 23.

TABELA 23- TEMPOS DE RETENÇÃO (MIN) E MASSA MOLECULAR RELATIVA DAS CARRAGENANAS OBTIDAS ATRAVÉS DAS CURVAS PADRÕES DE CARRAGENANAS

Fração	DS _{Oxidação} (%)	Tempo de retenção (min)	MM _R ($\times 10^5$ g/mol)
κ NR	*	43,67	1,23
κ OT	87	51,42	0,083
ι N	*	48,25	0,25
ι OP	42	41,92	2,26
ι OT	>95	50,42	0,12
ι/ν NR	*	47,75	0,30
ι/ν OT	>95	52,17	0,064

FONTE: O autor (2015)

6.3.2 Análise cromatográfica de exclusão estérica de alta precisão acoplada a espalhamento de luz laser em multiângulos (HPSEC-MALLS)

Durante os experimentos para estimação das massas moleculares utilizando os padrões, continuou-se a buscar pelos espalhamentos no detector MALLS para as carragenanas que ainda não haviam sido obtidos, sendo elas κ NR, κ OT, ι N, ι OP, ι OT, ι/ν NR e ι/ν OT. Após o aumento do tempo de solubilização de 24 para 48 horas, foi possível obter os espalhamentos que faltavam para determinação de M_w . Assim, as carragenanas nativas e oxidadas seletivamente em diferentes proporções foram submetidas às análises por HPSEC – MALLS/IR obtendo os parâmetros de massa molecular ponderal média em peso (M_w) e em número (M_n). Para o cálculo de dn/dc o detector MALLS foi desacoplado, e foi utilizado apenas o detector IR com as colunas.

A FIGURA 46 apresenta os perfis de eluição obtidos por HPSEC-MALLS/IR para as frações κ NR e κ OT e a FIGURA 47 para as frações ι/ν NR e ι/ν OT.

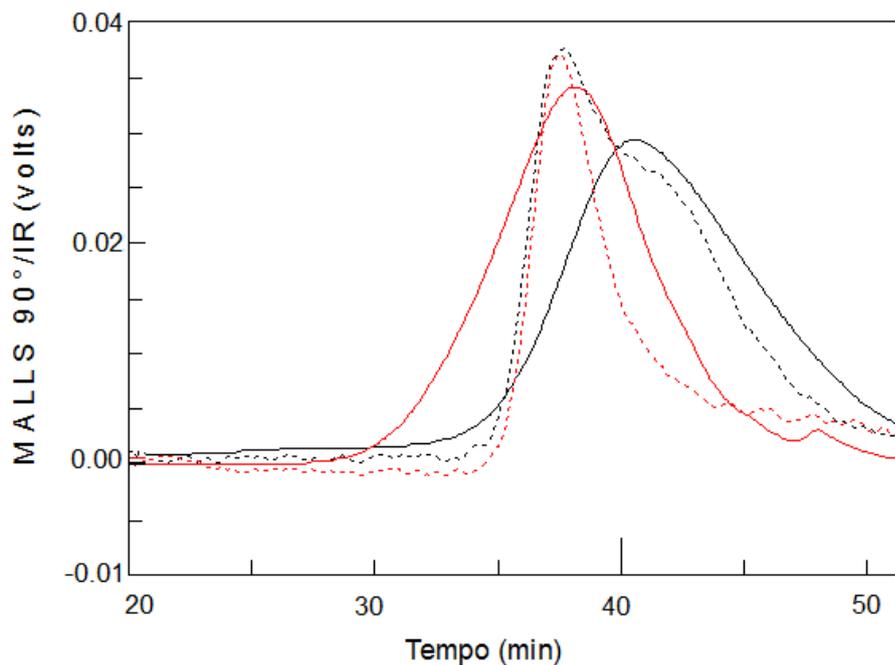


FIGURA 46- PERFIS DE ELUIÇÃO OBTIDOS POR HPSEC-MALLS (κ NR ---- κ OT ----) ACOPLADO AO DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO (IR) (κ NR — κ OT —) EM FUNÇÃO DO TEMPO DE ELUIÇÃO (MIN)
 FONTE: O autor (2015)

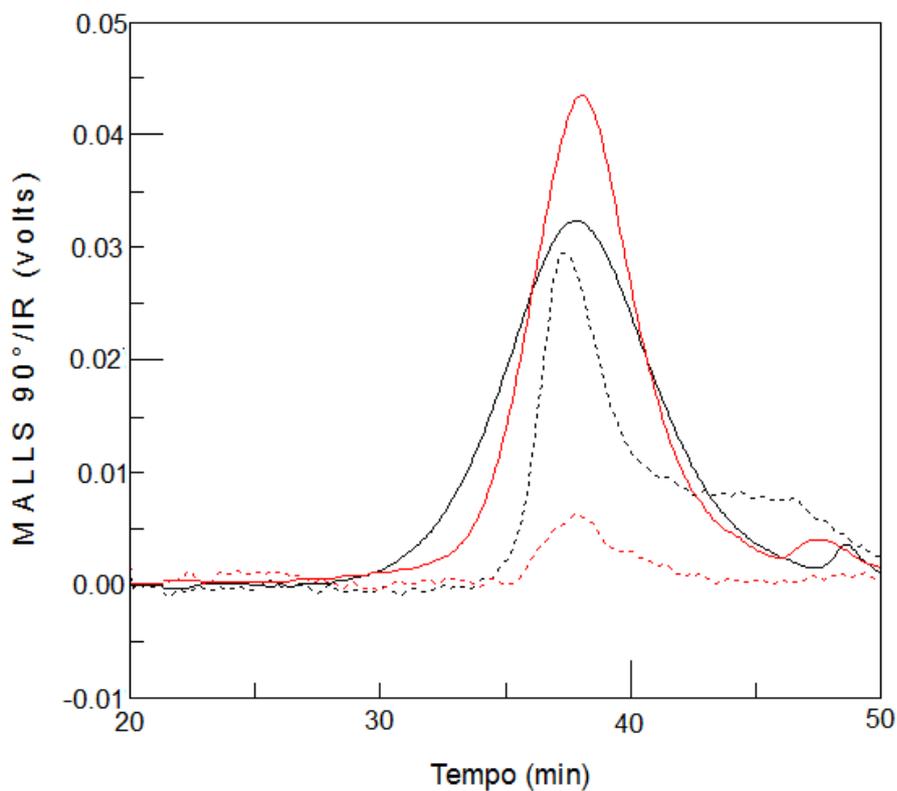


FIGURA 47- PERFIS DE ELUIÇÃO OBTIDOS POR HPSEC-MALLS (i/vNR ---- i/vOT ----) ACOPLADO AO DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO (IR) (i/vNR — i/vOT —) EM FUNÇÃO DO TEMPO DE ELUIÇÃO (MIN)
 FONTE: O autor (2015)

O perfil de eluição para a κ - possui a base alargada mostrando-se polidisperso. Após a oxidação, assim como para ι /v, há um perfil mais estreito, alongado e de base menor, indicando menor polidispersão (NETOPIÍK, PODZIMEK, KRATOCHVÍL, 2004).

Os perfis de eluição obtidos por HPSEC-MALLS/IR para as frações ι N, ι OP e ι OT podem ser visualizados na FIGURA 48.

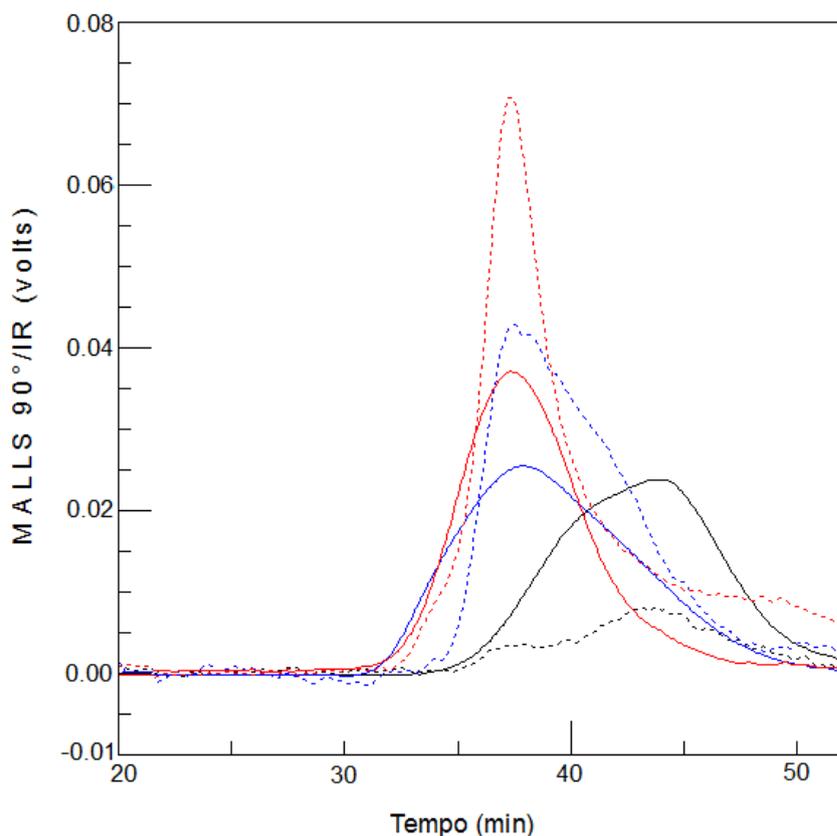


FIGURA 48- PERFIS DE ELUIÇÃO OBTIDOS POR HPSEC-MALLS (ι N ---- ι OP ---- ι OT ----) ACOPLADO AO DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO (IR) (ι N — ι OP — ι OT —) EM FUNÇÃO DO TEMPO DE ELUIÇÃO (MIN)
 FONTE: O autor (2015)

Como se observa na FIGURA 48, a fração ι N (A) apresentou uma base expandida e com grande deformação do pico evidenciando a presença de muitos agregados. No tempo de eluição (37 min) a fração ι N quase não apresenta espalhamento. Porém, conforme o aumento da oxidação, frações (B) ι OP e (C) ι OT, observa-se a mudança do perfil, aonde o pico vai se tornando mais uniforme, alongado e estreito indicando grupos de famílias de massas de tamanhos mais próximos e menos agregados diferentemente do que observado com a fração ι N.

A TABELA 24 apresenta os valores de dn/dc , resultados de massas

moleculares ponderais médias M_n e M_w , índice de polidispersão (M_w/M_n) e taxa de recuperação das frações nativas e oxidadas.

TABELA 24- PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DETERMINADOS POR HPSEC-MALLS/IR DAS CARRAGENANAS NATIVAS E OXIDADAS SELETIVAMENTE EM DIFERENTES PROPORÇÕES

Fração	DS _{Oxidação} (%)	dn/dc (mL/g)	M_w ($\times 10^5$ g/mol)	M_n ($\times 10^5$ g/mol)	M_w/M_n	%Recup
κ NR	*	0,109	1,98	1,66	1,2	108
κ OT	87	0,130	1,30	0,89	1,5	87
ι N	*	0,111	0,64	0,57	1,1	83
ι OP	42	0,109	2,46	1,73	1,4	94
ι OT	> 95	0,118	2,65	2,15	1,2	88
ι/ν NR	*	0,123	1,12	0,66	1,7	84
ι/ν OT	95	0,125	0,21	0,20	1,0	81
λ N	*	0,119	1,90	1,67	1,1	98
λ OP	83	0,111	1,43	1,33	1,0	95
λ OT	>95	0,121	0,80	0,72	1,1	86
θ N	*	0,142	0,65	0,60	1,1	70
θ OP	80	0,129	0,50	0,42	1,2	80
θ OT	>95	0,093	0,34	0,30	1,1	95

FONTE: O autor (2015)

NOTA: *Correspondem as carragenanas nativas; % Recup: taxa de recuperação

Todos os M_w foram calculados utilizando o método de Debye com formalização de Zimm. Os valores encontrados para as carragenanas nativas estão diferentes do valor para as carragenanas comerciais, que variam entre 400 e 600 KDa. Essa variação pode ser explicada pela idade da alga marinha colhida e principalmente pelas condições de extração e tratamento (HOFFMANN; RUSSELL; GIDLEY, 1995; GÓMEZ-ORDÓÑEZ; JIMÉNEZ-ESCRIG; RUPÉREZ, 2012).

De acordo com a TABELA 24, após a modificação houve diminuição de M_w para as carragenanas κ -, λ -, θ e ι/ν sugerindo degradação polimérica. Este fenômeno é caracterizado pela redução da massa molecular do polissacarídeo causado por quebras de ligações covalentes na cadeia principal (MICHEL, 1999) já

relatado na literatura. Araújo *et al.* (2013) observaram que após sulfatações químicas nas carragenanas κ -, ι - e θ - houve clivagem parcial das estruturas e da mesma forma, redução de M_w . O mesmo efeito de diminuição de M_w foi observado em oxidações seletivas utilizando o reagente TEMPO em polissacarídeos extraídos da *Grifola frondosa* (glucose, manose e galactose na proporção 6,5:1,0:2,6) (BAE *et al.*, 2011) e em oxidações com o hipoclorito de sódio em amido de milho (WANG; WANG, 2003). Assim, provavelmente um dos motivos da diminuição da massa molecular seja a despolimerização.

Em relação aos M_w das ι -carragenanas nativas e modificadas, eles apresentaram um perfil discrepante em relação ao M_w das demais carragenanas. Contrariamente, conforme aumentou a oxidação, ocorreu o aumento de M_w . Para melhor discussão desse efeito, foi analisado os dados de taxas de recuperação, calculados como a divisão da concentração real (detectado pelo IR) pela massa injetada, multiplicada por 100 (FUNAMI *et al.*, 2007).

Assim, para a ι -carragenana, após a oxidação, aumentaram as taxas de recuperação, indicando que houve uma menor perda de massa pela solução. Como o sinal do IR é diretamente proporcional a concentração do polímero que promove a determinação da massa molecular, qualquer alteração na concentração da solução leva a determinação incorreta da M_w .

Experimentalmente, a ι -carragenana nativa apresenta menor solubilidade que as demais carragenanas, sendo sentida grande dificuldade durante a filtração. Os estudos com oxidação mostram que após a oxidação, aumenta-se a solubilidade dos produtos. Por exemplo, no estudo realizado por Kim *et al.* (2013) eles utilizaram um resíduo de batata doce (celulose, curdlana e quitina) que possuía baixa solubilidade em água (<26,45%) e oxidaram seletivamente os álcoois primários utilizando TEMPO/NaOCl. Como resultado, observaram que os produtos oxidados apresentaram um grande aumento de solubilidade em água. O aumento de solubilidade também foi encontrado nas oxidações em polissacarídeos de Wang; Wang (2003) e Bae *et al.* (2011).

Assim, sugere-se que com a inserção do grupo carboxila na estrutura do polissacarídeo na fração IOP, a solubilidade foi aumentada e assim houve menor perda de massa durante a filtração, como observa-se com o aumento da taxa de recuperação, e, portanto, melhor determinação de M_w .

Contudo para a fração com >95% de oxidação (amostra IOT), a taxa diminuiu

um pouco. Uma explicação seria o aumento da força iônica proporcionado pelo aumento da oxidação, o que poderia estar levando a formação de agregados devido ao aumento da força iônica e perda de massa durante a filtração (MORRIS; REES; ROBINSON, 1980).

A λ -carragenana é a mais solúvel das carragenanas, tanto como observado em sua taxa de recuperação (98%), quanto em sua manipulação. Levando em consideração que possa estar sendo formados agregados pelo aumento da força iônica, esse fato também explicaria a diminuição da taxa de recuperação nesse caso.

A fração κ NR apresentou uma taxa maior que 100% de recuperação, o que pode ser explicado por inúmeros fatores como o teor de polímero presente na amostra e sua pureza (POLLARD; FISCHER, 2010).

Em relação aos índices de polidispersão (relação M_w/M_n) das amostras, elas variam de 1,0 a 1,7 não seguindo uma linearidade. O grupo menos polidisperso é o da λ -carragenana. Contudo, mais estudos precisam ser realizados, pois há variações nas taxas de recuperação, parâmetro essencial para a determinação de M_w que é utilizada na determinação deste índice.

6.4 ENSAIO DA ATIVIDADE ANTICOAGULANTE *IN VITRO* DA THETA-CARRAGENANA

Em uma investigação preliminar para avaliação da atividade anticoagulante, foram escolhidas as amostras nativas (θ N) e oxidadas (θ OP e θ OT) da *theta*-carragenana para um ensaio preliminar de aPTT (TABELA 25). A *theta*-carragenana foi escolhida, pois nos ensaios de aPTT *in vitro* realizados por Araújo *et al.* (2013), dentre as três carragenanas utilizadas (κ -, ι - e θ -), a ι -carragenana apresentou efeito pró-coagulante e para a κ -carragenana não foi obtida a fração de oxidação parcial.

Nos testes aPTT *in vitro* realizados com a fração θ N os resultados obtidos foram próximos aos obtidos por Araújo *et al.* (2013).

TABELA 25- ENSAIO DE APTT DAS FRAÇÕES θ N, θ OP E θ OT OBTIDAS A PARTIR DA *THETA*-CARRAGENANA

Fração	aPTT (s) ^b							DS (%) ^a
	Concentração do polissacarídeo (μ g/mL de plasma)							
	10 μ g	20 μ g	30 μ g	40 μ g	50 μ g	100 μ g	150 μ g	
θ N	34,4 \pm 0,5	45,8 \pm 1,0	50,2 \pm 0,1	61,3 \pm 0,2	59,0 \pm 0,4	69,4 \pm 0,1	81,7 \pm 0,9	0
θ OP	70,4 \pm 0,9	96,6 \pm 2,2	112,8 \pm 2,1	114,4 \pm 0,4	129,7 \pm 0,9	nd	289,2 \pm 3	80
θ OT	62,6 \pm 0,3	95,0 \pm 1,6	98,3 \pm 5,6	129,5 \pm 2,3	143,0 \pm 3,2	213,8 \pm 0,5	118,1 \pm 2	>95

FONTE: O autor (2015)

NOTAS: ^aDS_{Oxidação} determinado por RMN ¹H

^bTempos expressos em segundos (s) \pm Erro Padrão Médio. Solução salina (24 \pm 0,4 aPTT) utilizada como controle negativo e como controle positivo heparina não-fracionada (200,47 UI/mg), aPTT = 158 \pm 1 na concentração de 10 μ g/mL

nd: não determinado

De acordo com os resultados obtidos, todas as frações dessa carragenana foram capazes de prolongar o tempo de coagulação, sendo as frações θ N e θ OP dose-dependentes. Para a amostra θ OP, na concentração de 10 μ g/mL, o tempo de coagulação do plasma foi de 70,4 s, sendo 2,9 vezes maior que o grupo controle negativo (24 s). Nessa mesma dose, a amostra θ OT foi capaz de aumentar o efeito 2,6 vezes (62,6 s) quando comparados com os tempos de coagulação normais. Contudo, a fração θ OT acima da concentração de 150 μ g/mL deixou de apresentar efeito dose-dependente, sendo necessária uma futura investigação.

A FIGURA 49 apresenta curvas da concentração de cada uma das frações em função do aPTT (s) com o intuito de comparar a atividade anticoagulante entre as 3 amostras.

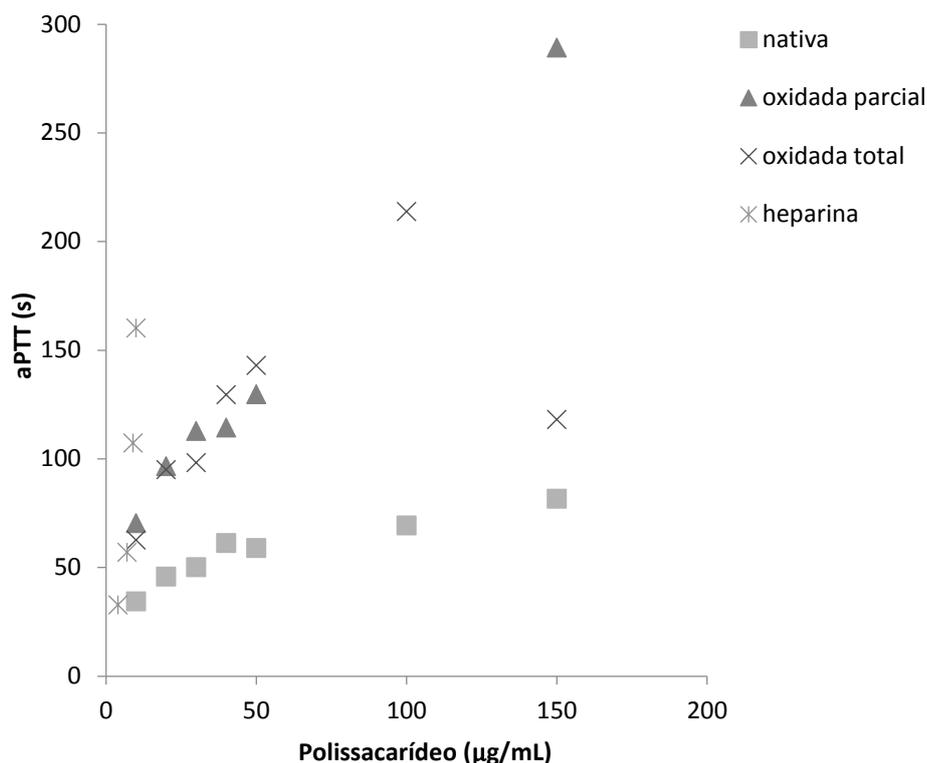


FIGURA 49- TEMPO DE TROMBOPLASTINA PARCIAL ATIVADA (APTT) PARA AS FRAÇÕES θ N, θ OP E θ OT. Plasma ovino com valores normais de aPTT foi incubado com concentrações diferentes dos polissacarídeos. Os resultados foram expressos em tempo de coagulação (s) \pm Erro Padrão Médio (n=3) e comparados com o grupo controle negativo (solução salina) e grupo controle positivo (heparina)

FONTE: O autor (2015)

Para a comparação, foi encontrada a concentração necessária de cada fração para triplicar o tempo da solução salina (3 x 24 s) estimada por meio de regressão linear das curvas (FIGURA 49). Para obtenção das curvas de calibração, foram utilizadas as concentrações de 10 a 150 μ g/mL para as frações θ N e θ OP e de 10 a 100 μ g/mL para a fração θ OT. A TABELA 26 representa os dados.

TABELA 26- CONCENTRAÇÃO NECESSÁRIA DE CADA FRAÇÃO PARA TRIPLICAR O TEMPO DE aPTT DA SOLUÇÃO SALINA

Fração	DS _{Oxidação} (%)	[] µg/mL plasma	Curva de calibração
θ N	0	107	$y = 0,2904x + 40,792$ $r^2 = 0,8728$
θ OP	80	8	$y = 1,5236x + 59,366$ $r^2 = 0,9936$
θ OT	>95	10	$y = 1,6246x + 56,018$ $r^2 = 0,9778$

FONTE: O autor (2015)

NOTAS: aPTT da solução salina = $24 \pm 0,4$

De acordo com os dados, a fração nativa θN necessitaria da concentração de 107 $\mu\text{g/mL}$ para triplicar o valor da salina, a *theta*-carragenana oxidada parcialmente (θOP) necessitaria da concentração de 8 $\mu\text{g/mL}$ e a totalmente oxidada (θOT) de 10 $\mu\text{g/mL}$. Assim, comparando-se a fração θOP com a fração θN , observa-se que a fração θOP é 13 vezes mais eficiente do que a fração θN , enquanto a fração θOT é 11 vezes melhor que a fração θN .

Assim, os dados mostraram que todos os polissacarídeos testados apresentaram atividade anticoagulante, porém que possuem potências diferentes, pois foram necessárias diferentes concentrações para ter-se o efeito anticoagulante. Os oxidados apresentaram uma potência maior em relação ao biopolímero nativo sugerindo que a oxidação agregou uma contribuição à atividade biológica anticoagulante. Contudo, para a avaliação do efeito causado pela carboxila nessas estruturas serão realizados testes com as demais carragenanas nativas e oxidadas.

7 CONCLUSÕES

A substituição da titulometria na metodologia de oxidação seletiva pelo meio tamponado ($\text{HCO}_3^-/\text{CO}_3^{2-}$) 1M, pH 9,6 foi eficiente na manutenção do pH durante toda a reação de oxidação apresentando-se como um método inovador e prático.

O estudo da reação de oxidação com a *kappa*-carragenana e utilizando diferentes equivalentes de TCCA (0,2; 0,5; 1; 2 e 3) foi eficiente na produção de polissacarídeos com diferentes proporções de oxidação em C6 da unidade G. A entrada do grupo carboxila ocorreu de acordo com o aumento do número de equivalentes de TCCA, sendo que a oxidação com 1 equivalente de TCCA (15 h) apresentou aproximadamente 50% de oxidação e acima de 2 equivalentes (15 h) a oxidação foi quase completa.

A utilização dos reagentes TEMPO e TCCA foram eficientes na oxidação das carragenanas, possibilitando altos graus de oxidação em reações em 15 horas e menores graus de oxidação em reações com 2 horas. O grau de oxidação obtido para as frações foram: κOT : 87%, ιVOT : 95%, ιOT e ιOP : >95% e 42%, θOT e θOP : >95 e 80% e λOT e λOP : >95 e 83%.

A partir dos mapas de correlação bidimensionais heteronucleares HSQC, dos espectros de RMN de ^{13}C e da literatura, foram obtidos os assinalamentos das díades produzidas após a oxidação seletiva C6 da *kappa*-, *iota*-, *theta*- e *lambda*-carragenanas.

As curvas padrões de dextrana e óxido de polietileno para determinação da massa molecular relativa das carragenanas apresentaram boa linearidade, porém apresentaram resultados díspares entre eles e destoantes dos valores de massa moleculares ponderais. As curvas padrão utilizando carragenanas apresentaram massas moleculares relativas mais próximas dos valores encontrados de M_w . As análises cromatográficas em HPSEC-MALLS revelaram diminuições no M_w após as oxidações e com o aumento dessas, assim como já relatado na literatura para outros polissacarídeos, indicando despolimerização. As carragenanas *iota*-, *iota/nu*- e *lambda*- apresentaram menores taxas de recuperação indicando perda de massa durante a filtração devido a formação de agregados. As oxidações proporcionaram aumento de solubilidade, porém com maiores graus de oxidação inicia-se o processo de formação de agregados verificado com a diminuição das taxas de

recuperação.

As amostras nativas e oxidadas da *theta*-carragenana apresentaram atividade anticoagulante dose-dependente, porém em potências diferentes. Os modificados apresentaram uma potência maior em relação ao biopolímero nativo, sendo o com 80% de oxidação o que apresentou maior efeito anticoagulante. Estes dados sugeriram que a presença de unidades de ácido β -D-galactourônico no polímero pode melhorar as propriedades anticoagulantes.

Como perspectivas futuras serão avaliadas as atividades de aPTT das demais carragenanas oxidadas para a avaliação do efeito causado pela carboxila nessas estruturas.

REFERÊNCIAS

AHMED, I.; MAJEED, A.; POWELL, R. Heparin induced thrombocytopenia: diagnosis and management update. **Postgraduate Medical Journal**, v. 83, p. 575–582, 2007.

AHSAN, A.; JESKE, W.; HOPPENSTEADT, D.; LORMEAU, J. C.; WOLF, H.; FAREED, J. Molecular profiling and weight determination of heparins and depolymerized heparins. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 84, n. 6, p. 724–727, 1995.

ANELLI, P. L.; BIFFI, C.; MONTANARI, F.; QUICI, S. Fast and selective oxidation of primary alcohols to aldehydes or to carboxylic acids and of secondary alcohols to ketones mediated by oxoammonium salts under two-phase conditions. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 52, n. 4, p. 2559–2562, 1998.

ANGELIN, M.; HERMANSSON, M.; DONG, H.; RAMSTRÖM, O. Direct, mild, and selective synthesis of unprotected dialdo-glycosides. **European Journal of Organic Chemistry**, p. 4323–4326, 2006.

ARAÚJO, C. A.; **Modificações químicas em carragenanas: estudo comparativo de diversos padrões de sulfatação na atividade anticoagulante**. 124 p, Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

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, n. 2, p. 483–91, 2013.

ASPINALL, G. O. Chemical characterization and structure determination of polysaccharides. In: __. **The polysaccharides**, v. 1. New York: Academic Press, 1982. p. 100–124.

ATHUKORALA, Y.; JUNG, W. K.; VASANTHAN, T.; JEON, Y. J. An anticoagulative polysaccharide from an enzymatic hydrolysate of *Ecklonia cava*. **Carbohydrate Polymers**, v. 66, p. 184–191, 2006.

BAE, I. Y.; KIM, H. Y.; LEE, S.; LEE, H. G. Effect of the degree of oxidation on the physicochemical and biological properties of *Grifola frondosa* polysaccharides. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, n. 3, p. 1298–1302, 2011.

BASU, N.; MAITY, S. K.; CHAUDHURY, A.; GHOSH, R. Trichloroisocyanuric acid (TCCA): an efficient green reagent for activation of thioglycosides toward hydrolysis. **Carbohydrate Research**, v. 369, p. 10–13, 2013.

BECKER, C. F.; GUIMARÃES, J. A.; MOURÃO, P. A. S.; VERLI, H. Conformation of sulfated galactan and sulfated fucan in aqueous solutions: implications to their anticoagulant activities. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 26, n. 1, p. 391–9, 2007.

BICO, S. L. S.; RAPOSO, M. F. J.; MORAIS, R. M. S. C.; MORAIS, A. M. M. B. Combined effects of chemical dip and/or carrageenan coating and/or controlled atmosphere on quality of fresh-cut banana. **Food Control**, v. 20, n. 5, p. 508–514, 2009.

BIXLER, H. J.; PORSE, H. A decade of change in the seaweed hydrocolloids industry. **Journal of Applied Phycology**, v. 23, p. 321-335, 2011.

BORDENAVE, N.; GRELIER, S.; COMA, V. Advances on selective C-6 oxidation of chitosan by TEMPO. **Biomacromolecules**, v. 9, n. 9, p. 2377–2382, 2008.

BRAGD, P. L.; BEKKUM, H. VAN; BESEMER, A. C. TEMPO-mediated oxidation of polysaccharides: survey of methods and applications. **Topics in Catalysis**, v. 27, n. 1-4, p. 49-66, 2004.

BRETON, T.; BASHIARDES, G.; LÉGER, J.; KOKOH, K. B. Selective oxidation of unprotected carbohydrates to aldehyde analogues by using TEMPO salts. **European Journal of Medicinal Chemistry**, p. 1567–1570, 2007.

BUCK, C. B.; THOMPSON, C. D.; ROBERTS, J. N.; MÜLLER, M. LOWY, D. R; SCHILLER, J. Carrageenan is a potent inhibitor of papillomavirus infection. **PLoS Pathogens**, v. 2, n. 7, p. 671–680, 2006.

CÁCERES, P. J.; CARLUCCI, M. J.; DAMONTE, E. B.; MATSUHIRO, B.; ZÚÑIGA, E. A. Carrageenans from chilean samples of *Stenogramme interrupta* (Phylloporaceae): Structural analysis and biological activity. **Phytochemistry**, v. 53, p. 81–86, 2000.

CAMPO, V. L.; KAWANO, D. F.; BRAZ, D.; CARVALHO, I. Carrageenans: Biological properties, chemical modifications and structural analysis – A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 77, n. 2, p. 167–180, 2009.

CAPILA, I.; LINHARDT, R. J. Heparin - Protein Interactions. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 41, p. 390–412, 2002.

CARLUCCI, M. J.; PUJOL, C. A.; CIANCIA, M.; NOSEDA, M. D.; MATULEWICZ, M. C.; DAMONTE, E. B.; CEREZO, A. 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.

CARRAGEENAN INDUSTRY REPORT 2012. CyberColloids Ltd., 2014. Disponível em <<http://www.cybercolloids.net/sites/default/files/private/downloads/Carrageenan%20market%20report%202012%20contents.pdf>> Acesso em 20/03/2015.

CHANDÍA, N. P.; MATSUHIRO, B. Characterization of a fucoidan from *Lessonia vadosa* (Phaeophyta) and its anticoagulant and elicitor properties. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 42, p. 235–240, 2008.

CHATTAWAY, F. D.; WADMORE, J. M. The constitution of hydrocyanic, cyanic, and cyanuric acids, __, p. 1045–1051, 1989.

CIANCIA, M.; NOSEDA, M. D.; MATULEWICZ, M. C.; CERESO, 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, 1993.

CODEX ALIMENTARIUS. International food standards. CARRAGEENAN, 2014, p. 114. Disponível em: <http://www.codexalimentarius.net/gsfaonline/docs/CXS_192e.pdf>. Acesso em 15/02/2015

COLMAN, R. W. Are hemostasis and thrombosis two sides of the same coin? **The Journal of Experimental Medicine**, v. 203, p. 493-495, 2006.

DELATTRE, C.; PIERRE, G.; GARDARIN, C.; TRAIKIA, M.; ELBOUTACHFAITI, R.; ISOGAI, A.; MICHAUD, P. Antioxidant activities of a polyglucuronic acid sodium salt obtained from TEMPO-mediated oxidation of xanthan. **Carbohydrate Polymers**, v. 116, p. 34–41, 2014.

DEVLIN, T. M. **Manual de bioquímica com correlações clínicas**. São Paulo: Ed. Blücher, 2007, 1186 p.

DING, B.; CHENG, J.; WANG, K.; LUO, J.; JIANG, B. TEMPO-mediated selective oxidation of substituted polysaccharides — an efficient approach for the determination of the degree of substitution at C-6. **Carbohydrate Research**, v. 343, n. 18, p. 3112–3116, 2008.

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

DODGSON, K.S; PRINCE, R. G. A note on the determination of the Ester sulphate content of sulphated polysaccharide. **Biochemical Journal**, v. 84, p. 106-110, 1962.

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

DUCATTI, D. R. B. **Hidrólise ácida de galactanas para produção de oligossacarídeos e c-glicosídeos: semi-síntese de n-alquil e c-dihidropiridina glicosídeos**. 120 p, Tese (Doutorado em Bioquímica) - Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

DUCATTI, D. R. B.; COLODI, F. G.; GONÇALVES, A. G.; DUARTE, M. E. R.; NOSEDA, M. D. Production of agaro- and- carraoligosaccharides by partial acid hydrolysis of galactans. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 21, n. 2, p. 296–304, 2011.

ESTEVEZ, M.; CIANCIA, M.; CEREZO, A. S. The system of galactans of the red seaweed, *Kappaphycus alvarezii*, with emphasis on its minor constituents. **Carbohydrate Research**, v. 339, p. 2575–2592, 2004.

FALSHAW, R.; FURNEAUX, R. Carrageenan from the tetra-sporic stage of *Gigartina decipiens* (Gigartinaceae, Rhodophyta). **Carbohydrate Research**, v. 252, p. 171–182, 1994.

FAN, Y.; SAITO, T.; ISOGAI, A. Chitin nanocrystals prepared by TEMPO-mediated oxidation of α -chitin. **Biomacromolecules**, v. 9, n. 1, p. 192–198, 2008.

FAN, Y.; SAITO, T.; ISOGAI, A. TEMPO-mediated oxidation of β -chitin to prepare individual nanofibrils. **Carbohydrate Polymers**, v. 77, n. 4, p. 832–838, 2009.

FDA Information on Adverse Event Reports and Heparin, 2009. Disponível em <<http://www.fda.gov/Drugs/DrugSafety/PostmarketDrugSafetyInformationforPatientsandProviders/ucm112669.htm>> Acesso 06/03/2015.

FILISSETTI-COZZI, T. M.; CARPITA, N. C. Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars. **Analytical Biochemistry**, v. 197, p. 157–162, 1991.

FRANCO, R. F. Fisiologia da coagulação, anticoagulação e fibrinólise. **Medicina, Ribeirão Preto**, v. 34, p. 229-237, jul./dez. 2001.

FREITAS, R. A.; MARTIN, S.; PAULA, R. C.; FEITOSA, J. P. A; SIERAKOWSKI, M. R. Effect of the oxidation level on the thermogravimetric kinetics of an oxidized galactoxyloglucan from *Hymenaea courbaril* (Jatobá) seeds. **Thermochimica Acta**, v. 409, p. 41–47, 2004.

FUNAMI, T.; KATAOKA, Y.; HIROE, M.; ASAI, I.; TAKAHASHI, R.; NISHINARI, K. Thermal aggregation of methylcellulose with different molecular weights. **Food Hydrocolloids**, v. 21, p. 46–58, 2007.

GÓMEZ-ORDÓÑEZ, E.; JIMÉNEZ-ESCRIG, A.; RUPÉREZ, P. Molecular weight distribution of polysaccharides from edible seaweeds by high-performance size-exclusion chromatography (HPSEC). **Talanta**, v. 93, p. 153–159, 2012.

GONÇALVES, A. G.; DUCATTI, D. R. B.; PARANHA, R. G.; DUARTE, M. E. R.; NOSEDA, M. D. Positional isomers of sulfated oligosaccharides obtained from agarans and carrageenans: preparation and capillary electrophoresis separation. **Carbohydrate Research**, v. 340, p. 2123–2134, 2005.

GRAHAM, L. E.; WILCOX, L. W. **Algae**. Upper Saddle River: Prentice-Hall, 2000. 640 p.

GRASSAUER, A.; WEINMUELLNER, R.; MEIER, C.; PRETSCH, A.; GRASSAUER, E. P.; UNGER, H. Iota-Carrageenan is a potent inhibitor of rhinovirus infection. **Virology Journal**, v. 5, p. 107, 2008.

GREER, C. W.; YAPHE, W. Characterization of hybrid (beta-kappa-gamma) carrageenan from *Eucheuma gelatinae* J. Agardh (Rhodanhyta, Solieriaceae) using carrageenases, infrared and ¹³C-nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Botanica Marina**, v. 27, p. 473–478, 1984.

GREINACHER, A.; WARKENTIN, T. E. Recognition, treatment, and prevention of heparin-induced thrombocytopenia: Review and update. **Thrombosis Research**, v. 118, p. 165–176, 2006.

GUO, J; SKINNER, G.W; HARCUM, W.W; BARNUM, P.E. Pharmaceutical applications of naturally occurring water-soluble polymers. **Pharmaceutical Science & Technology Today**, v. 1, n. 6, p. 254-261, 1998.

GUPTA, M.; PAUL, S.; GUPTA, R. General aspects of 12 basic principles of green chemistry with applications. **Current Science**, v. 99, p. 1341–1360, 2010.

HASSAN, R. M.; FAWZY, A.; AHMED, G. A.; ZAAFARANY, I. A.; ASGHAR, B. H. TAKAGI, H. D.; IKEDA, Y. Kinetics and mechanism of permanganate oxidation of iota- and lambda-carrageenan polysaccharides as sulfated carbohydrates in acid perchlorate solutions. **Carbohydrate Research**, v. 346, n. 14, p. 2260–2267, 2011.

HAYAKAWA, Y.; HAYASHI, T.; LEE, J. B.; SRISOMPORN, P.; MAEDA, M.; OZAWA, T.; SAKURAGAWA, N. Inhibition of thrombin by sulfated polysaccharides isolated from green algae. **Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1543, p. 86–94, 2000.

HOFFMANN, R., RUSSELL, A., & GIDLEY, M. Molecular weight distribution of carrageenans: Characterisation of commercial stabilisers and effect of cation depletion on depolymerisation. **Gums and Stabilisers for the Food Industry**, v. 8, p. 137–150, 1995.

INOUE, N.; YAMANO, N.; SAKATA, K.; NAGAO, K.; HAMA, Y; YANAGITA, T. The sulfated polysaccharide porphyran reduces apolipoprotein B100 secretion and lipid synthesis in HepG2 cells. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 73, n. 2, p. 447–9, 2009.

ISHAK, M. F.; PAINTER, T. The anomalous periodate oxidation limit of guaran. **Acta Chemica Scandinavica**, v. 27, p. 1268-1276, 1973.

JAUŠOVEC, D.; VOGRINČIČ, R.; KOKOL, V. Introduction of aldehyde vs. carboxylic groups to cellulose nanofibers using laccase/TEMPO mediated oxidation. **Carbohydrate Polymers**, v. 116, p. 74–85, 2014.

JIANG, B.; DROUET, E.; MILAS, M.; RINAUDO, M. Study on TEMPO-mediated selective oxidation of hyaluronan and the effects of salt on the reaction kinetics. **Carbohydrate Research**, v. 327, p. 455–461, 2000.

JIN, W.; ZHANG, Q.; WANG, J.; ZHANG, W. A comparative study of the anticoagulant activities of eleven fucoidans. **Carbohydrate Polymers**, v. 91, n. 1, p. 1–6, 2013.

JOINT FAO/WHO EXPERT COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES (JECFA). Sixty-eighth meeting: summary and conclusions. Geneva, 2007. Disponível em <http://www.nutfruit.org/summary-and-conclusions-of-the-68th-meeting-of-the-joint-fao-who-expert-committee-on-food-additives-jecfa-geneva-19-28-june-2007_47652.pdf> Acesso em 20/03/2015.

JONES, W. G. M. PEAT, S. The constitution of agar. **Journal Of The Chemical Society**, p. 225-231, 1942.

JUENGE, E. C.; BEAL, D. A.; DUNCAN, W. P. Chlorination of aromatic systems with trichloroisocyanuric acid under polar and free-radical conditions. **Journal of Organic Chemistry**, v. 35, n. 3, p. 1968–1971, 1968.

KATO, Y.; MATSUO, R.; ISOGAI, A. Oxidation process of water-soluble starch in TEMPO-mediated system. **Carbohydrate Polymers**, v. 51, p. 69–75, 2003.

KIM, Y. N.; PARK, K. M.; CHOI, S. J.; CHANG, P. S. Optimizing conditions for TEMPO/NaOCl-mediated chemoselective oxidation of primary alcohols in sweet potato residue. **Food and Bioprocess Technology**, v. 6, p. 690–698, 2013.

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.

LABTEST. Manual de bancada: Coagulação, 2010. Disponível em <<http://www.google.com.br/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0CB8QFjAA&url=http%3A%2F%2Fwww.labtest.com.br%2Fdownload.php%3Fa%3D6554&ei=febrVOiqClbHsQTdq4KoCQ&usq=AFQjCNFBYuk4ifgWutX-UkNosShv0LFAWw&bvm=bv.86475890,d.cWc>> Acesso em 06/02/2015.

LAHAYE, M. Developments on gelling algal galactans, their structure and physico-chemistry. **Journal of Applied Phycology**, v.13 , p. 173–184, 2001.

LAVAZZA, M.; FORMANTICI, C.; LANGELLA, V.; MONTI, D.; PFEIFFER, U.; GALANTE, Y. M. Oxidation of galactomannan by laccase plus TEMPO yields an elastic gel. **Journal of Biotechnology**, v. 156, n. 2, p. 108–116, 2011.

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.

LINDAHL, U.; HÖÖK, M. Glycosaminoglycans and their binding to biological macromolecules. **Annual Review of Biochemistry**, v. 47, p. 385-417, 1978.

LIU, H.; ZHANG, Z.; LINHARDT, R. J. Lessons learned from the contamination of heparin. **Natural Product Reports**, v. 26, n. 3, p. 313–321, 2009.

LUCA, L.; GIACOMELLI, G.; MASALA, S.; PORCHEDDU, A.; CHIMICA, D. Trichloroisocyanuric / TEMPO oxidation of alcohols under mild conditions: a close investigation. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 68 , n. 13, p. 4999–5001, 2003.

LUCA, L. DE; GIACOMELLI, G.; PORCHEDDU, A.; Very mild and chemoselective oxidation of alcohols to carbonyl compounds. **Organic Letters**, v.3, n.19, p. 3041-3043, 2001.

MAO, W.; LI, H.; LI, Y.; ZHANG, H.; QI, X.; SUN, H.; CHEN, Y.; GUO, S. Chemical characteristic and anticoagulant activity of the sulfated polysaccharide isolated from *Monostroma latissimum* (Chlorophyta). **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 44, p. 70–74, 2009.

MATSUBARA, K.; MATSUURA, Y.; HORI, K.; MIYAZAWA, K. An anticoagulant proteoglycan from the marine green alga, *Codium pugniformis*. **Journal of Applied Phycology**, v. 12, p. 9–14, 2000.

MATSUBARA, K.; MATSUURA, Y.; MORI, M.; MATSUMOTO, H.; HORI, K.; MIYAZAWA, K. Antiangiogenic properties of a sulfated galactan isolated from a marine green alga, *Codium cylindricum*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 28, p. 395–399, 2001.

MATULEWICZ, M. C., CIANCIA, M., NOSEDA, M. D., CEREZO, A. S. Carrageenan systems from tetrasporic and cystocarpic stages of *Gigartina skottsbergii*. **Phytochemistry**, v. 28, n. 11, p. 2937–2941, 1989.

McHUGH, D. J. A guide to the seaweed industry: FAO fisheries technical paper, n. 441. 2003. Disponível em: <<ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/006/y4765e/y4765e00.pdf>>. Acesso em: 15/11/2014.

McHUGH, D. J. Production and utilization of products from commercial seaweeds: FAO fisheries technical paper. In: STANLEY, N. **Production, properties and uses of carrageenan**. n. 288, 1987. Disponível em: < <http://www.fao.org/docrep/x5822e/x5822e05.htm>>. Acesso em: 20/04/2015.

McLEAN, J. The thromboplastic action of cephalin. **American Journal of Physiology**, v. 41, p. 250–257, 1916.

MELO, F. R.; PEREIRA, M. S.; FOGUEL, D.; MOURÃO, P. A S. Antithrombin-mediated anticoagulant activity of sulfated polysaccharides: different mechanisms for heparin and sulfated galactans. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 20, p. 20824–20835, 2004.

MENDONÇA, G. F.; MATTOS, M. C. S. Green chlorination of organic compounds using tichloroisocyanuric Acid (TCCA). **Current Organic Synthesis**, v.10, p. 820–836, 2013.

MERLI, G. Diagnostic assessment of deep vein thrombosis and pulmonary embolism. **The American Journal of Medicine**, v. 118 Suppl , p. 3S–12S, 2005.

MICHEL, R.C. **Processos de dissolução, agregação e degradação em polímeros hidrossolúveis – Acompanhamento por Difractometria Diferencial e por Espalhamento de Luz**. Tese (Doutorado em Ciências) Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1999.

MILLER, R. A.; HOERRNER, R. S. Iodine as a chemoselective reoxidant of TEMPO: application to the oxidation of alcohols to aldehydes and ketones. **Organic Letters**, v. 5, n. 3, p. 285–287, 2003.

MOLLION, M. J.; MOREAU, S.; CHRISTIAN, D. Isolation of a new type of carrageenan from *Rissoeulla verruculosa* (Bert) J. Agardh (Rhodophyta, Gigartinales). **Botanica Marina**, v. 29, p. 549–552, 1986.

MORRIS, E. R.; REES, D. A; ROBINSON, G. Cation-specific aggregation of carrageenan helices: domain model of polymer gel structure. **Journal of Molecular Biology**, v. 138, p. 349–362, 1980.

MURRAY, R. K.; GRANNER, D. K.; MAYES, P. A.; RODWELL, V. W. **Harper: bioquímica ilustrada**. 26 ed. São Paulo: Atheneu, 2006. 692 p.

NETOPILÍK, M.; PODZIMEK, S.; KRATOCHVÍL, P. Determination of the interdetector volume by s-detection in size-exclusion chromatography of polymers with on-line multiangle light-scattering detection. **Journal of Chromatography A**, v.1045, p. 37–41, 2004.

NOOY, A. E. J.; BESEMER, A. C.; BEKKUM, H. VAN. Highly selective nitroxyl radical-mediated oxidation of primary alcohol groups in water-soluble glucans. **Carbohydrate Research**, v. 269, n. 1, p. 89–98, 1995.

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

NOYORI, R.; AOKI M.; SATO K. Green oxidation with aqueous hydrogen peroxide. **Chemical Communications**, v. 16, p. 1977-1986, 2003.

OHNO, M.; NANG, H. Q.; HIRASE, S. Cultivation and carrageenan yield and quality of *Kappaphycus alvarezii* in the waters of Vietnam. **Journal of Applied Phycology**, v. 8, p. 431-437, 1996.

OPOKU, G.; QIU, X.; DOCTOR, V. Effect of oversulfation on the chemical and biological properties of kappa carrageenan. **Carbohydrate Polymers**. v. 65, n. 2, p. 134–138, 2006.

PAINTER, T. J. Control of depolymerisation during the preparation of reduced dialdehyde cellulose. **Carbohydrate Research**, v. 179, p. 259-268, 1988.

PANLASIGUI, L. N.; BAELLO, O. Q.; DIMATANGAL, J. M.; DUMELOD, B. D. Blood cholesterol and lipid-lowering effects of carrageenan on human volunteers. **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition**, v. 12, n. Oct. 2002, p. 209–214, 2003.

PASCHAPUR, M. S.; PATIL, M. B.; KUMAR, R.; PATIL, S. R. Influence of ethanolic extract of *Borassus flabellifer* L. male flowers (inflorescences) on chemically induced acute-inflammation and poly arthritis in rats. **International Journal of PharmTech Research**, v. 1, n. 3, p. 551–556, 2009.

PATEL, S.; BERRY, L.R.; CHAN, A. K. C. Covalent antithrombin heparin complexes. **Thrombosis Research**, v. 120, p. 151-160, 2007.

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

PENGZHAN, Y.; QUANBIN, Z.; NING, L.; ZUHONG, X.; YANMEI, W. Polysaccharides from *Ulva pertusa* (Chlorophyta) and preliminary studies on their antihyperlipidemia activity. **Journal of Applied Phycology**, v. 15, p. 21-27, 2003.

PEREZ, D.; MONTANARI, S.; VIGNON, M. R. TEMPO-mediated oxidation of cellulose III. **Biomacromolecules**, v. 4, p. 1417–1425, 2003.

PERRINAUD, A.; JACOBI, D.; MACHET, M. C.; GRODET, C.; GRUEL, Y.; MACHET, L. Bullous hemorrhagic dermatosis occurring at sites distant from subcutaneous injections of heparin: Three cases. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 54, p. 5–7, 2006.

PETITOU, M.; CASU, B.; LINDAHL, U. 1976-1983, a critical period in the history of heparin: the discovery of the antithrombin binding site. **Biochimie**, v. 85, p. 83–89, 2003.

PLASTINO, E. M.; URSI, S.; FUJII, M. T. Color inheritance , pigment characterization, and growth of a rare light green strain of *Gracilaria birdiae* (Gracilariales, Rhodophyta). **Phycological Research**, v. 51, p. 45-52, 2004.

PLOTTO, A.; GOODNER, K. L.; BALDWIN, E. A. Effect of polysaccharide coatings on quality of fresh cut mangoes (*Mangifera indica*). **Proceedings of the Florida State Horticultural Society**, v. 117, p. 382-388, 2004

PLOTTO, A; NARCISO, J.; BALDWIN, E. A. RATTANAPANONE. Edible coatings and other surface treatments to maintain color of lychee fruit in storage. **Proceedings of the Florida State Horticultural Society**, v. 119, p. 323-331, 2006

POLLARD, M.A.; FISCHER, P.A. Partial aqueous solubility of low-galactose-content galactomannans - What is the quantitative basis? **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 11, p. 184–190, 2006.

PONEDEL'KINA, I. Y.; KHAIBRAKHMANOVA, E. A.; ODINOKOV, V. N. Nitroxide-catalyzed selective oxidation of alcohols and polysaccharides. **Russian Chemical Reviews**, v. 63, p. 63–75, 2010.

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

PRAJAPATI, V. D.; MAHERIYA, P. M.; JANI, G. K.; SOLANKI, H. K. Carrageenan: a natural seaweed polysaccharide and its applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 105, p. 97–112, 2014.

PUSHPAMALI, W. A.; NIKAPITIYA, C.; ZOYSA, M. D.; WHANG, I.; KIM, S. J.; LEE, J. Isolation and purification of an anticoagulant from fermented red seaweed *Lomentaria catenata*. **Carbohydrate Polymers**, v. 73, p. 274–279, 2008.

RAMOS, M. L. D.; CALDEIRA, M. M. M.; GIL, V. M. S. NMR study of uronic acids and their complexation with molybdenum(VI) and tungsten(VI) oxoions. **Carbohydrate Research**, v. 286, p. 1–15, 1996.

REES, D. A. Enzymic synthesis of 3:6-anhydro-L-galactose within porphyran from L-galactose 6-sulphate units. **Biochemical Journal**, v. 81, p. 347–352, 1961.

RENN, D. Biotechnology and the red seaweed polysaccharide industry: status, needs and prospects. **Trends in Biotechnology**, v. 15, n. 1, p. 9–14, 1997.

RIBEIRO, R. S.; ESTEVES, P. M. MATTOS, M. C. S. Triiodoisocyanuric acid: a new and convenient reagent for regioselective iodination of activated arenes. **Journal of The Brazilian Chemical Society**, v. 19, n. 7, p. 1239–1243, 2008.

ROCHA, H. A. O.; FRANCO, C. R.C; TRINDADE, E. S; CARVALHO, L. C. M; VEIGA, S. S; LEITE, E. L; DIETRICH, C. P. NADER, H.B. A fucan from the brown seaweed *Spatoglossum schröderi* inhibits Chinese hamster ovary cell adhesion to several extracellular matrix proteins. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 34, p. 621–626, 2001.

RUITER, G. A. DE; RUDOLPH, B. Carrageenan biotechnology. **Trends in Food Science & Technology**, v. 8, n. Dec., p. 389–395, 1997.

SANDERCOCK, P. M. L.; BARNETT, J. S. Characterization of the products formed by the reaction of trichlorocyanuric acid with 2-propanol. **Journal of Forensic Sciences**, v. 54, n. 6, p. 1336–1340, 2009.

SASSAKI, G. L.; RITER, D. S.; SANTANA FILHO, A. P.; GUERRINI, M.; LIMA, M.; COSENTINO, C.; SOUZA, L. M.; CIPRIANI, T. R.; RUDD, T. R.; NADER, H. B; YATES, E. A.; GORIN, P. A. J.; TORRI, G.; IACOMINI, M. A robust method to quantify low molecular weight contaminants in heparin: detection of tris(2-n-butoxyethyl) phosphate. **The Analyst**, v. 136, p. 2330–2338, 2011.

SCHINDEWOLF, M.; LINDHOFF-LAST, E.; LUDWIG, R. J.; BOEHNCKE, W. H. Heparin-induced skin lesions. **The Lancet**, v. 380, n. 9856, p. 1867–1879, 2012.

S.F-TISCHER, P.; TALARICO, L.; NOSEDA, M.; GUIMARÃES, S. M. P.; Damonte, E. B; Duarte, M. E. R. Chemical structure and antiviral activity of carrageenans from *Meristiella gelidium* against herpes simplex and dengue virus. **Carbohydrate Polymers**, v. 63, n. 4, p. 459–465, 2006.

SHANMUGAM, M.; MODY, K. H. Heparinoid-active sulphated polysaccharides from marine algae as potential blood anticoagulant agents. **Current Science**, v. 79, n. 12, p. 1672–1683, 2000.

SHELDON, R. A. Catalysis: The key to waste minimization. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 50, p. 381-388, 1997.

SILVA, F. R. F.; DORE, C. M. P. G.; MARQUES, C. T.; NASCIMENTO, M. S. BENEVIDES, N. M B; ROCHA, H. A O; CHAVANTE, S. F.;LEITE, E. L. Anticoagulant activity, paw edema and pleurisy induced carrageenan: action of major types of commercial carrageenans. **Carbohydrate Polymers**, v. 79, n. 1, p. 26–33, 2010.

SILVERSTEIN, R. M; BASSLER, G. C; MORRILL, T. C. Espectroscopia no infravermelho **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. Guanabara Koogan SA.:1994. p. 107-108.

SOUZA, B. W. S.; CERQUEIRA, M. A.; BOURBON, 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 Hydrocolloids**, v. 27, n. 2, p. 287–292, 2012.

SOUZA, C. F. DE; LUCYSZYN, N.; FERRAZ, F. A.; SIERAKOWSKI, M. R. Oxidation and N-alkylation at the C-6 position of galactomannan extracted from *Caesalpinia ferrea var. ferrea* seeds. **Macromolecular Symposia**, v. 299-300, p. 66–73, 2011.

SOUZA, M. C. R; MARQUES, C. T.; DORE, C. M G; SILVA, F. R. F; ROCHA, H. A. O. R.; LEITE, E. L. Antioxidant activities of sulfated polysaccharides from brown and red seaweeds. **Journal of Applied Phycology**, v. 19, n. 2, p. 153–160, 2007.

SPICHTIG, V.; AUSTIN, S. Determination of the low molecular weight fraction of food-grade carrageenans. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 861, p. 81–87, 2008.

SPIELER, R. Seaweed compound's anti-HIV efficacy will be tested in southern Africa. **The Lancet**, v. 359, n. 9318, p. 1675, 2002.

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.

STORTZ, C. A.; CEREZO, A. S. The ^{13}C NMR spectroscopy of carrageenans: calculation of chemical shifts and computer-aided structural determination. **Carbohydrate Polymers**, v. 18, p. 237–242, 1992.

TAHIRI, C.; VIGNON, M. R. TEMPO-oxidation of cellulose: synthesis and characterisation of polyglucuronans. **Cellulose**, 7: 177–188, 2000.

TALARICO, L. B.; NOSEDA, M. D.; DUCATTI, D. R. B.; DUARTE, M. E. R.; DAMONTE, E. B. Differential inhibition of dengue virus infection in mammalian and mosquito cells by iota-carrageenan. **The Journal of General Virology**, v. 92, n. Pt 6, p. 1332–42, 2011.

TALARICO, L. B.; PUJOL, C. A; ZIBETTI, R. G. M.; FARÍA, 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 Research**, v. 66, n. 2-3, p. 103–10, 2005.

TALARICO, L. B.; ZIBETTI, R. G. M.; FARIA, P. C. S.; SCOLARO, L.; DUARTE, M. E R; NOSEDA, M. D; PUJOL, C. A; DAMONTE, E. B. Anti-herpes simplex virus activity of sulfated galactans from the red seaweeds *Gymnogongrus griffithsiae* and *Cryptonemia crenulata*. **International Journal of Biological Mmacromolecules**, v. 34, n. 1-2, p. 63–71, 2004.

THABURET, J. F.; MERBOUH, N.; IBERT, M.; MARSAIS, F.; QUEGUINER, G. TEMPO-mediated oxidation of maltodextrins and D-glucose: effect of pH on the selectivity and sequestering ability of the resulting polycarboxylates. **Carbohydrate Research**, v. 330, p. 21–29, 2001.

TERUEL, M. L. A; GONTIER, E.; BIENAIME, C.; SAUCEDO, J. E. N.; BARBOTIN, J. N. Response surface analysis of chlortetracycline and tetracycline production with K-carrageenan immobilized *Streptomyces aureofaciens*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 21, n. 97, p. 314–320, 1997.

TILSTAM, U.; WEINMANN, H. Trichloroisocyanuric acid: a safe and efficient oxidant. **Organic Process Research & Development**, v. 6, p. 384–393, 2002.

TOBACMAN, J. K. Review of harmful gastrointestinal effects of carrageenan in animal experiments. **Environmental Health Perspectives**, v. 109, p. 983–994, 2001.

TOLLEFSEN, D. M. Heparin cofactor II modulates the response to vascular injury. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 27, p. 454-460, 2007.

TROST, B. M. Atom economy - a search for synthetic efficiency. **Science**, v. 254, p. 1471–1477, 1988.

TURNBULL, J. E. Getting the farm out of pharma for heparin production. **Science**, v. 334, p. 462–463, 2011.

TURVILLE, S. G.; ARAVANTINO, M.; MILLER, T.; KENNEY, J.; TEITELBAUM, A.; HU, L.; CHUDOLIJ, A.; ZYDOWSKY, T. M.; PIATAK, M.; BESS, J. W.; LIFSON, J. D.; BLANCHARD, J.; GETTIE, A.; ROBBIANI, M. Efficacy of Carraguard[®]-based microbicides *in vivo* despite variable *in vitro* activity. **PLoS One**, v. 3, n. 9, p. 16-18, 2008

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

USOV, A. I. Polysaccharides of the red algae. **Advances In Carbohydrate Chemistry And Biochemistry**, v. 6, p. 115-217, 2011.

USOV, A. I.; SHASHKOV, A. S. Polysaccharides of Algae. XXXIV: Detection of iota-carrageenan in *Phyllophora brodiaei* (Turn.) J. Ag. (Rhodophyta) using ^{13}C -NMR spectroscopy. **Botanica Marina**, v. 28, n. 9, 1985.

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

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

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

VELDE, F. VAN DE; LOURENÇO, N. D.; PINHEIRO, H. M.; BAKKER, M. Carrageenan: A Food-Grade and Biocompatible Support for Immobilisation Techniques. **Advanced Synthesis and Catalysis**, v. 344, p. 815–835, 2002b.

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

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-carrageenan. **Carbohydrate Polymers**, v. 58, p. 455–460, 2004.

VO, T. S.; KIM, S. K. Potential anti-HIV agents from marine resources: an overview. **Marine Drugs**, v. 8, p. 2871–2892, 2010.

WANG, H.; LIU, Y. M.; QI, Z. M.; Wang, S. Y.; Liu, S. X.; Li, X.; Wang, H. J.; Xia, X. C. An overview on natural polysaccharides with antioxidant properties. **Current Medicinal Chemistry**, v.20, p. 2899–2913, 2013.

WANG, J.; ZHANG, Q.; ZHANG, Z.; SONG, H.; LI, P. Potential antioxidant and anticoagulant capacity of low molecular weight fucoidan fractions extracted from *Laminaria japonica*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 46, p. 6–12, 2010.

WANG, Y. J.; WANG, L. Physicochemical properties of common and waxy corn starches oxidized by different levels of sodium hypochlorite. **Carbohydrate Polymers**, v. 52, p. 207–217, 2003.

WANG, W.; WANG, S. X.; GUAN, H.-S. The antiviral activities and mechanisms of marine polysaccharides: an overview. **Marine drugs**, v. 10, n. 12, p. 2795–816, 2012.

WARNER, J. C.; CANNON, A. S.; DYE, K. M. Green chemistry. **Environmental Impact Assessment Review**, v. 24, p. 775–799, 2004.

WENGERT, M.; SANSEVERINO, A. M; MATTOS, M. C. S. Trichloroisocyanuric acid: an alternate green route for the transformation of alkenes into epoxides. **Journal Of The Brazilian Chemical Society**, v. 13, n. 5, p.700-703, 2002.

WIJESEKARA, I.; PANGESTUTI, R.; KIM, S. Biological activities and potential health benefits of sulfated polysaccharides derived from marine algae. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, n. 1, p. 14–21, 2011.

WHISTLER, R. L.; SPENCER, W. W. Sulfation. **Methods Carbohydrate Chemistry**, v. 4, p. 297-298, 1964.

WYATT, P.J. Light scattering and the absolute characterization of macromolecules. **Analytica Chimica Acta**, v. 272, p. 1-40, 1993.

YUAN, H.; SONG, J.; LI, X.; LI, N.; LIU, S. Enhanced immunostimulatory and antitumor activity of different derivatives of κ -carrageenan oligosaccharides from *Kappaphycus striatum*. **Journal of Applied Phycology**, v. 23, n. 1, p. 59–65, 2010.

YUAN, H.; ZHANG, W.; LI, X; LÜ, X.; LI, N.; GAO, X.; SONG, J. Preparation and *in vitro* antioxidant activity of κ -carrageenan oligosaccharides and their oversulfated, acetylated, and phosphorylated derivatives. **Carbohydrate Research**, v. 340, n. 4, p. 685–92, 2005.

ZACHAROPOULOS, V. R.; PHILLIPS, D. M. Vaginal formulations of carrageenan protect mice from herpes simplex virus infection. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 4, n. 4, p. 465–468, 1997.

ZHANG, Z.; ZHANG, Q.; WANG, J.; SONG, H.; ZHANG, H.; NIU, X. Regioselective syntheses of sulfated porphyrans from *Porphyra haitanensis* and their antioxidant and anticoagulant activities *in vitro*. **Carbohydrate Polymers**, v. 79, n. 4, p. 1124–1129, 2010.

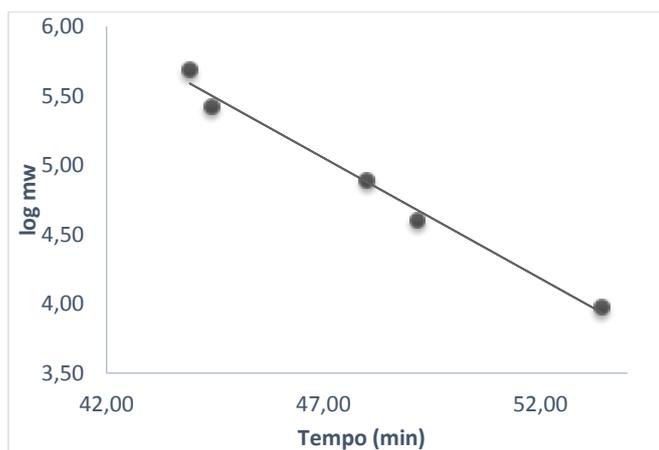
ZHOU, G.; SHENG, W.; YAO, W.; WANG, C. Effect of low molecular λ -carrageenan from *Chondrus ocellatus* on antitumor H-22 activity of 5-Fu. **Pharmacological Research**, v. 53, p. 129–134, 2006.

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, n. April 2002, p. 47–53, 2004.

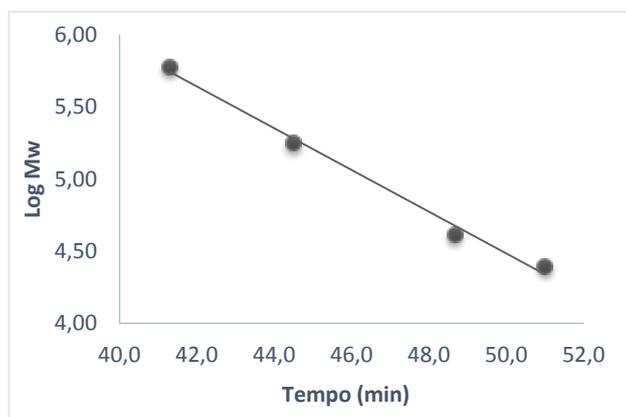
ZÚÑIGA, E. A.; MATSUHIRO, B.; MEJÍAS, E. Preparation of a low-molecular weight fraction by free radical depolymerization of the sulfated galactan from *Schizymenia binderi* (Gigartinales, Rhodophyta) and its anticoagulant activity. **Carbohydrate Polymers**, v. 66, p. 208–215, 2006.

ANEXOS

ANEXO 1 – CURVAS PADRÕES DE CALIBRAÇÃO PARA OS PADRÕES DE DEXTRANA E ÓXIDO DE POLIETILENO

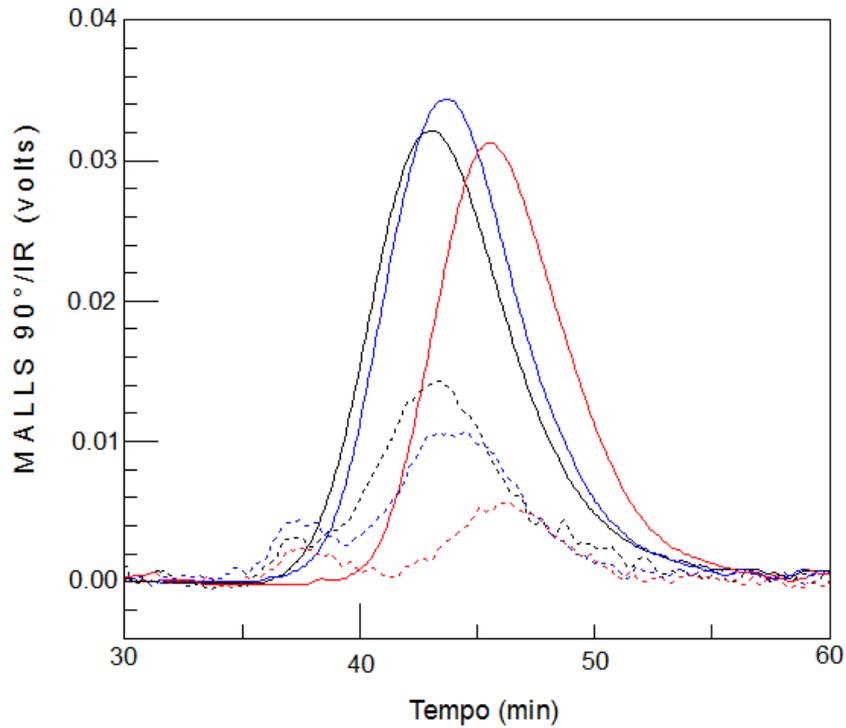


CURVA PADRÃO DE CALIBRAÇÃO DE DEXTRANAS

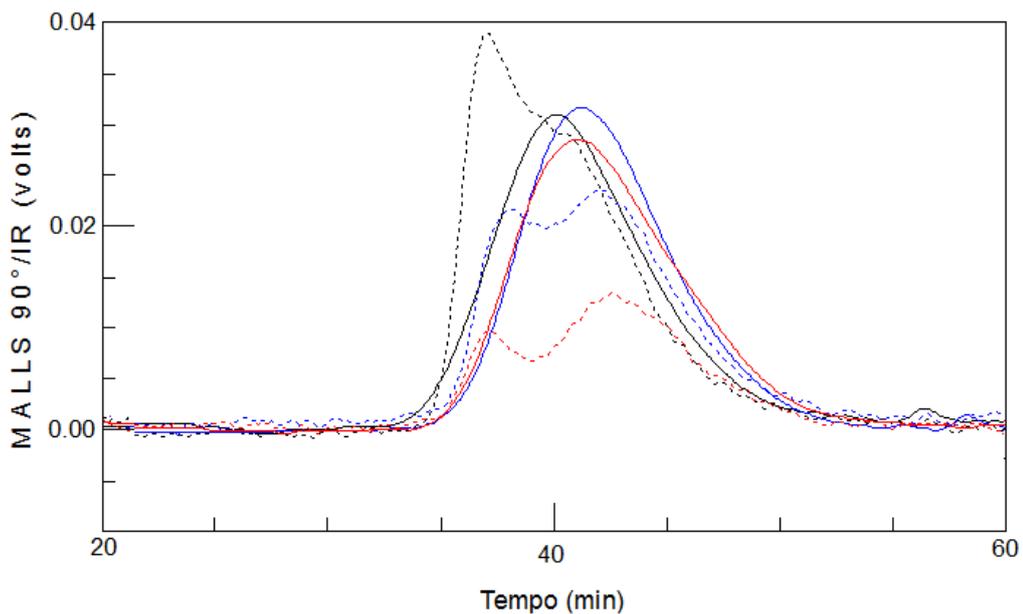


CURVA PADRÃO DE CALIBRAÇÃO DE ÓXIDO DE POLIETILENO

ANEXO 2 – DIFERENTES PERFIS DE ELUIÇÃO OBTIDOS POR HPSEC-MALLS/IR (V) EM FUNÇÃO DO TEMPO DE ELUIÇÃO (MIN)

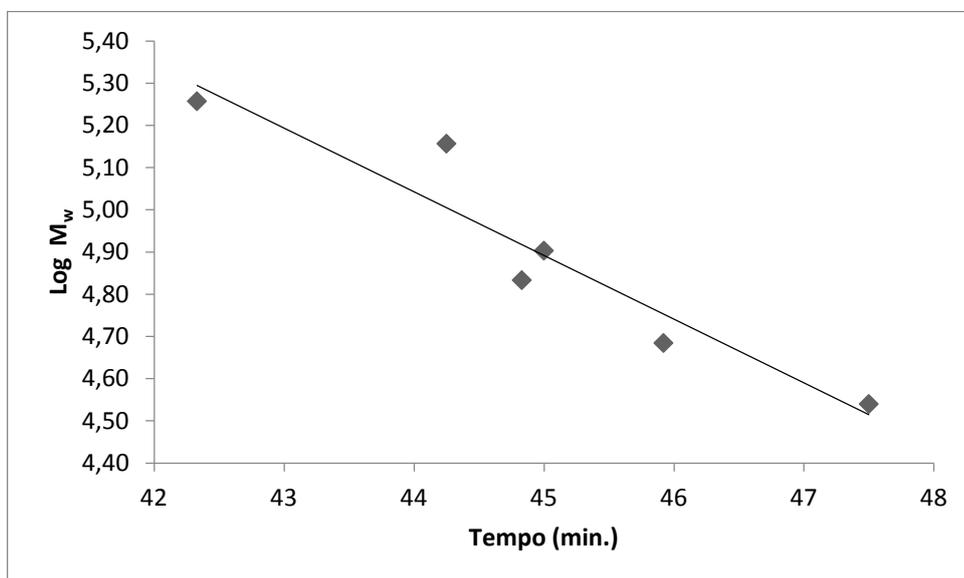


PERFIS DE ELUIÇÃO OBTIDOS POR HPSEC-MALLS (θN ---- θOP ---- θOT ----) ACOPLADO AO DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO (IR) (θN — θOP — θOT —) EM FUNÇÃO DO TEMPO DE ELUIÇÃO (MIN)



PERFIS DE ELUIÇÃO OBTIDOS POR HPSEC-MALLS (λN ---- λOP ---- λOT ----) ACOPLADO AO DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO (IR) (λN — λOP — λOT —) EM FUNÇÃO DO TEMPO DE ELUIÇÃO (MIN)

ANEXO 3 – CURVA PADRÃO DE CALIBRAÇÃO DE CARRAGENANAS



CURVA PADRÃO DE CALIBRAÇÃO DE CARRAGENANAS