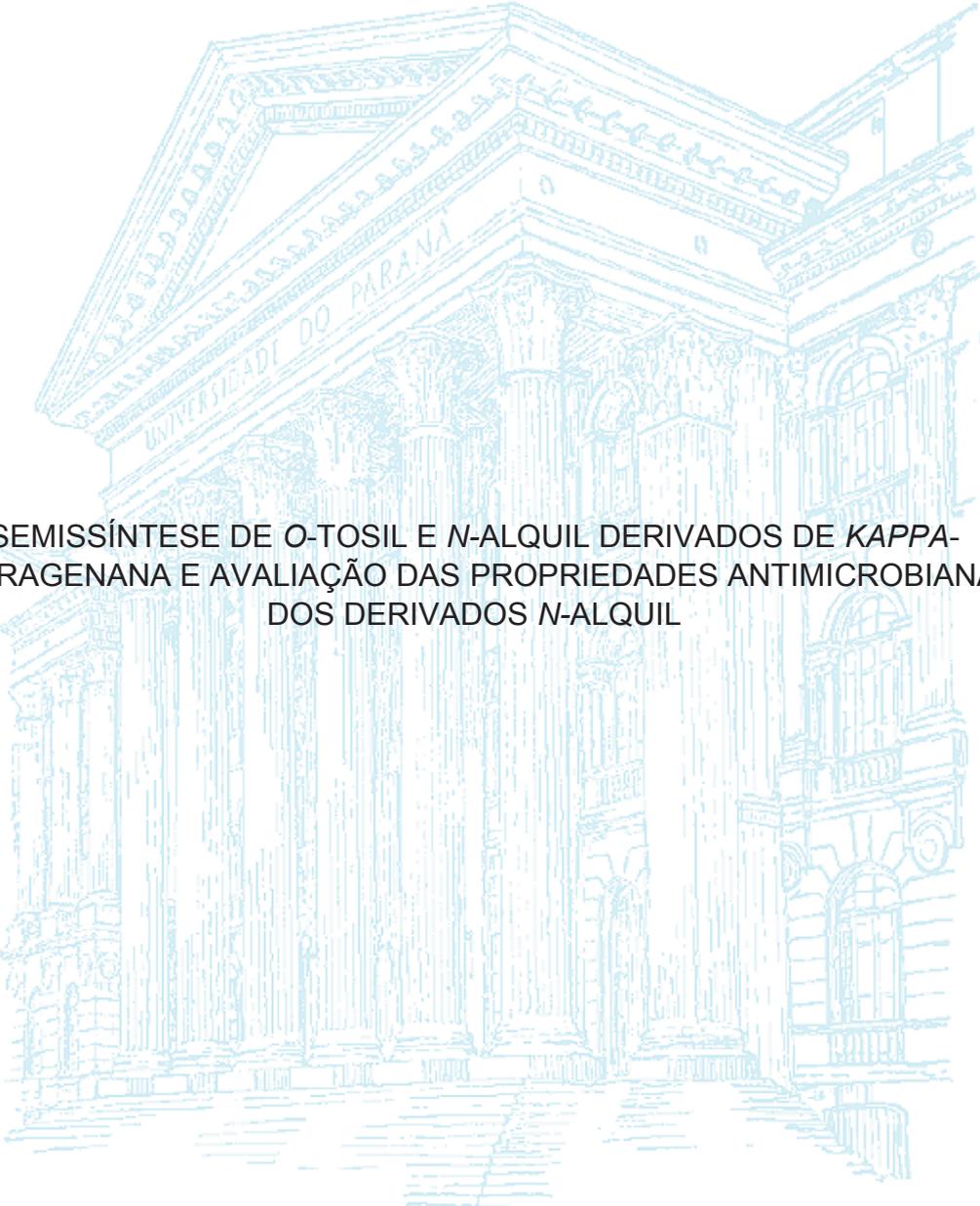


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

EDSON HIPÓLITO JÚNIOR



SEMISSÍNTESE DE O-TOSIL E N-ALQUIL DERIVADOS DE *KAPPA*-
CARRAGENANA E AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES ANTIMICROBIANAS
DOS DERIVADOS N-ALQUIL

CURITIBA

2019

EDSON HIPÓLITO JÚNIOR

SEMISSÍNTESE DE O-TOSIL E N-ALQUIL DERIVADOS DE *KAPPA*-
CARRAGENANA E AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES ANTIMICROBIANAS
DOS DERIVADOS N-ALQUIL

Tese apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Ciências (Bioquímica), no Curso de Pós-Graduação em Ciências – Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Diogo R. Bazan Ducatti

Coorientador: Prof. Dr. Alan Guilherme Gonçalves

CURITIBA

2019

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.
Biblioteca de Ciências Biológicas.
(Giana Mara Seniski Silva – CRB/9 1406)

Hipólito Júnior, Edson

Semissíntese de *O*-tosil e *N*-alquil derivados de *Kappa*-carragenana e avaliação das propriedades antimicrobianas dos derivados *N*-alquil / Edson Hipólito Júnior. – Curitiba, 2019.

118 p.: il.

Orientador: Diogo R. Bazan Ducatti

Coorientadores: Alan Guilherme Gonçalves

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

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

CDD (22. ed.) 572.566



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS
(BIOQUÍMICA) - 400010160/3P2

TERMO DE APROVAÇÃO

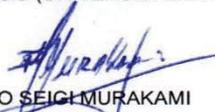
Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS (BIOQUÍMICA) da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **EDSON HIPOLITO JUNIOR** intitulada: **Semissíntese de O-Tosil e N-alquil derivados de Kappa-carragenana e avaliação das propriedades antimicrobianas dos derivados N-alquil**, sob orientação do Prof. Dr. DIOGO RICARDO BAZAN DUCATTI, que após terem inquirido o aluno e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 19 de Agosto de 2019.


DIOGO RICARDO BAZAN DUCATTI

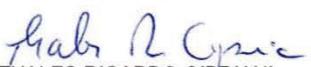
Presidente da Banca Examinadora (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)


FÁBIO SEIGI MURAKAMI

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)


ALEXANDRE ORSATO

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA)


THALES RICARDO CIPRIANI

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus.

A toda a minha família, principalmente aos meus pais Edson Hipólito e Regina H. M. Hipólito e minha esposa Laís D. Guanaes pelo amor, incentivo e apoio incondicional.

Às minhas colegas de laboratório Gislaine e Janaína por todas as dicas, discussões e amizade.

Ao meu orientador Prof. Dr. Diogo R. B. Ducatti pela paciência, determinação e dedicação ao ensino e pesquisa.

Ao meu coorientador Prof. Dr. Alan G. Gonçalves por todas as sugestões e contribuições.

Aos avaliadores deste trabalho durante a sua execução, Prof. Dr. Miguel Nosedá e Prof. Dr. Thales Cipriani, por todas as sugestões e contribuições.

Aos colegas dos laboratórios 248 e E3 pelos empréstimos de reagentes e ajuda.

A todo o departamento de pós-graduação em Ciências (Bioquímica) da UFPR.

Às agências de financiamento que ajudaram direta e indiretamente este trabalho, CAPES, CNPQ e PRONEX-Carboidratos.

RESUMO

A *Kappa*-carragenana é um polissacarídeo aniônico, sulfatado, linear e de alto peso molecular, extraído principalmente de algas vermelhas do filo *Rhodophyta* como a alga *Kappaphycus alvarezii*. Tanto a *Kappa*-carragenana quanto outros polissacarídeos possuem uma estrutura química definida e dificilmente alcançável através da síntese orgânica, tornando-os alvos de modificações químicas. O objetivo deste trabalho foi extrair e caracterizar o polissacarídeo híbrido obtido da alga vermelha *K. alvarezii* e realizar a semissíntese dos derivados *N*-alquil, *O*-tosila, Azido, *N*-dietil e pirrolidina, além de testar as atividades antimicrobianas dos derivados *N*-alquil. A κ -carragenana extraída (KC) foi submetida a hidrólise ácida parcial utilizando ácido trifluoroacético (TFA) a fim de promover a quebra seletiva das ligações glicosídicas α -(1 \rightarrow 3) entre a unidade 3,6-anidro- α -D-Galp e a β -D-Galp-4-sulfato. A fração KC foi hidrolisada e os seus terminais redutores foram submetidos a reação de aminação redutiva com a *N*-pentilamina (KAP), heptilamina (KAH), nonilamina (KAN e KAN1) e dodecilamina (KAD e KAD1). Estas frações foram testadas quanto à sua atividade antimicrobiana contra os microrganismos *S. aureus* (ATCC 6538), *P. aeruginosa* (ATCC 9027) e *E. coli* (ATCC 8738), onde as frações KAN1, KAD e KAD1 apresentaram atividade contra os microrganismos testados, sendo a fração KAD1 a mais ativa, principalmente contra a bactéria *E. coli* (CIM de 0,25 mg/mL e CBM de 1.56 mg/mL). Para a reação de tosilação a fração nativa (KC) foi hidrolisada gerando a fração (KCD) que foi submetida a tosilação (KCDT). Esta reação foi eficaz em solvente água/acetonitrila, atingindo DS_{soma} de 1.32 (KCDTP), com a substituição ocorrendo preferencialmente em C6 da unidade de β -D-Galp-4-sulfato. A fração tosilada (KCDT) foi submetida à reação de substituição com azida, dietilamina e pirrolidina, gerando as frações KDA, KDD e KDP, respectivamente, onde as substituições foram completas no C6 da unidade G4S.

Palavras-chave: *Kappa*-carragenana; Hidrólise Ácida Parcial; Aaminação Redutiva; Tosilação e Atividade Antimicrobiana.

ABSTRACT

Kappa-carrageenan is an anionic, sulfated, linear, high molecular weight polysaccharide extracted from red algae (Rhodophyta), such as *Kappaphycus alvarezii*. Polysaccharides present an interesting chemical structure hardly obtained through chemical synthesis thus these biopolymers are used as a starting material for chemical modifications. The objective of this work was the semi-synthesis of *N*-alkyl, *O*-tosyl, Azido, *N*-diethyl and pyrrolidine derivatives of *Kappa*-carrageenan. In addition, the *N*-alkyl derivatives were tested for their antimicrobial activities. The κ -carrageenan extracted (KC) from *K. alvarezii* was submitted to partial acid hydrolysis with trifluoroacetic acid (TFA), to promote the selective cleavage of α -(1 \rightarrow 3) glycosidic linkages between 3,6-anhydro- α -D-Galp and β -D-Galp-4-sulfate. The resulting products were submitted to reductive amination reaction with *N*-pentylamine (KAP), heptylamine (KAH), nonylamine (KAN and KAN1) and dodecylamine (KAD and KAD1) to yield six derivatives, and their antimicrobial properties were evaluated against *S. aureus* (ATCC 6538), *P. aeruginosa* (ATCC 9027) and *E. coli* (ATCC 8738), where KAN1, KAD and KAD1 showed activity against the microorganisms tested, being KAD1 the most active, especially against *E. coli* (MIC of 0.25 mg/ml and MBC of 1.56 mg/ml). In order to synthesize *O*-Tosyl derivatives, the native fraction (KC) was hydrolyzed to give KCD fraction, and then it was submitted to tosylation (KCDT). This reaction was effective in water/acetonitrile solvent, reaching DS_{total} equal to 1.32 (KCDTP). The modification was observed preferentially at C6 of β -D-Galp-4-sulfate units. The tosylated fraction (KCDT) was submitted to the substitution reaction with azide, *N*-diethylamine and pyrrolidine and these substitutions were complete at C6 of β -D-Galp-4-sulfate units.

Keywords: *Kappa*-carrageenan; Partial Acid Hydrolysis; Reductive Amination; Tosylation and Antimicrobial Activity.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – EXEMPLO DE ALGA MARINHA VERDE, VERMELHA E MARROM.	16
FIGURA 2 – MECANISMO DE GELIFICAÇÃO DAS CARRAGENANAS	21
FIGURA 3 - ESPECTRO DE RMN- ¹ H DA FRAÇÃO KC	48
FIGURA 4 - MAPA DE CORRELAÇÃO DE ¹ H- ¹³ C HSQC DA FRAÇÃO KC... ..	49
FIGURA 5 – ESPECTRO DE FTIR DA FRAÇÃO KC.....	50
FIGURA 6 - CROMATOGRAMAS DE KC, KCDR6 E KCDR1 OBTIDOS POR CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO ESTÉRICA (HPSEC-MALLS-RID).	51
FIGURA 7 - CURVA DE HIDRÓLISE ÁCIDA PARCIAL DA FRAÇÃO KC.....	52
FIGURA 8 - ESPECTRO DE RMN- ¹ H DAS FRAÇÕES KC, KTA1, KCDR1 E KCDR6.....	54
FIGURA 9 - MAPA DE CORRELAÇÃO ¹ H- ¹³ C HSQC DA FRAÇÃO KCDR6..	55
FIGURA 10 - MAPA DE CORRELAÇÃO ¹ H- ¹³ C HSQC-EDITADO DA FRAÇÃO KCDR1.....	56
FIGURA 11 - MAPA DE CORRELAÇÃO ¹ H- ¹³ C HSQC DA FRAÇÃO KAP.....	60
FIGURA 12 - MAPA DE CORRELAÇÃO ¹ H- ¹³ C HSQC DA FRAÇÃO KAH. ...	60
FIGURA 13 - MAPA DE CORRELAÇÃO ¹ H- ¹³ C HSQC DA FRAÇÃO KAN. ...	61
FIGURA 14 - MAPA DE CORRELAÇÃO ¹ H- ¹³ C HSQC DA FRAÇÃO KAD. ...	61
FIGURA 15 - MAPA DE CORRELAÇÃO ¹ H- ¹³ C HSQC DA FRAÇÃO KAN1. .	62
FIGURA 16 - MAPA DE CORRELAÇÃO ¹ H- ¹³ C HSQC DA FRAÇÃO KAD1. .	62
FIGURA 17 - CROMATOGRAMAS DAS FRAÇÕES KAP, KAH, KAN, KAN1 E KAD1, OBTIDOS POR CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO ESTÉRICA (HPSEC-MALLS-RID).	63
FIGURA 18 – ESPECTRO DE ¹³ C DAS FRAÇÕES LAC5, LAC7, LAC9 E LAC12,	67
FIGURA 19 – ESPECTRO DE RMN- ¹ H DA FRAÇÃO KC.....	85
FIGURA 20 - MAPA DE CORRELAÇÃO ¹ H- ¹³ C HSQC-EDITADO DA FRAÇÃO KCD.	86
FIGURA 21 – CROMATOGRAMA DA FRAÇÃO KCD, OBTIDO POR CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO ESTÉRICA (HPSEC-MALLS-RID).	87
FIGURA 22 - ESPECTRO DE FTIR DA FRAÇÃO KCD.	87
FIGURA 23 - ESPECTRO DE RMN- ¹ H DA AMOSTRA KCDST-1	90
FIGURA 24 – ESPECTRO DE RMN- ¹ H DA AMOSTRA KCDT-1	92
FIGURA 25 - MAPA DE CORRELAÇÃO DE ¹ H- ¹³ C HSQC DA AMOSTRA KCDT- 1.....	93
FIGURA 26 - MAPA DE CORRELAÇÃO DE ¹ H- ¹³ C HSQC DA AMOSTRA KCDT- 3.....	94
FIGURA 27 - MAPA DE CORRELAÇÃO DE ¹ H- ¹³ C HSQC DA AMOSTRA KCDT- 4.....	95
FIGURA 28 - MAPA DE CORRELAÇÃO DE ¹ H- ¹³ C HSQC DA AMOSTRA KCDT- 6.....	96
FIGURA 29 - MAPA DE CORRELAÇÃO DE ¹ H- ¹³ C HSQC DA AMOSTRA KCDT- 7.....	97

FIGURA 30 - MAPA DE CORRELAÇÃO DE ^1H - ^{13}C HSQC-EDITADO DA AMOSTRA KCDT-9.	98
FIGURA 31 - MAPA DE CORRELAÇÃO DE ^1H - ^{13}C HSQC DA AMOSTRA KCDT-10.....	99
FIGURA 32 - MAPA DE CORRELAÇÃO DE ^1H - ^{13}C HSQC DA AMOSTRA KCDTP.....	100
FIGURA 33 – ESPECTRO DE FTIR DA FRAÇÃO KCDTP.....	101
FIGURA 34 - COMPARATIVO ESPECTROS DE RMN- ^{13}C DAS FRAÇÕES KCDTP, KCDA, KCDD E KCDP.....	103
FIGURA 35 - MAPA DE CORRELAÇÃO DE ^1H - ^{13}C HSQC DA AMOSTRA KCDA.	104
FIGURA 36 - MAPA DE CORRELAÇÃO DE ^1H - ^{13}C HSQC DA AMOSTRA KCDP.	104
FIGURA 37 - MAPA DE CORRELAÇÃO DE ^1H - ^{13}C HSQC DA AMOSTRA KCDD.	105
FIGURA 38 – ESPECTRO DE FTIR DA FRAÇÃO KCDA.....	106
FIGURA 39 – ESPECTRO DE FTIR DA FRAÇÃO KCDD.....	106
FIGURA 40 – ESPECTRO DE FTIR DA FRAÇÃO KCDP.....	107

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - ESTRUTURA E PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DA <i>IOTA</i> -, <i>KAPPA</i> - E <i>LAMBA</i> -CARRAGENANA.	20
TABELA 2 – COMPARATIVO DE DS MÁXIMO DAS REAÇÕES DE TOSILAÇÃO EM DIFERENTES POLISSACARÍDEOS.	27
TABELA 3 – COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA, RENDIMENTO, DOSAGEM DE SULFATO E MASSA MOLAR PONDERAL MÉDIA (<i>MW</i>) DA FRAÇÃO KC.	47
TABELA 4 - PERCENTAGEM DAS DÍADES <i>KAPPA</i> -, <i>MU</i> - E <i>IOTA</i> - ENCONTRADAS NAS CARRAGENANAS DE KC, KCDR6 E KCDR1.	54
TABELA 5 - DESLOCAMENTOS QUÍMICOS (PPM) DE ¹ H E ¹³ C DAS DÍADES OBSERVADAS EM KCDR6.	56
TABELA 6 - DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DE ¹ H E ¹³ C DAS FRAÇÕES KAP, KAH, KAN, KAD, KAN1 E KAD1.	59
TABELA 7 - TEOR DE SULFATO, NITROGÊNIO E CARBONO, MASSA MOLAR PONDERAL MÉDIA (<i>MW</i>), CARBOIDRATO TOTAL E RENDIMENTO DE REAÇÃO DE TODAS AS FRAÇÕES OBTIDAS.	65
TABELA 8 – TAXA DE NITROGÊNIO/CARBONO DAS <i>N</i> -ALQUIL-LACTITOL CALCULADO TEORICAMENTE.	67
TABELA 9 - VALORES DE CIM E CBM DE KC E SUAS FRAÇÕES DERIVADAS.	71
TABELA 10 - VALORES DE CIM E CBM DAS <i>N</i> -ALQUIL-LACTITOIS.	72
TABELA 11 – CONDIÇÕES DE REAÇÃO SELECIONADAS COMO EXEMPLO PARA A TOSILAÇÃO EM MEIO ORGÂNICO DE KCD.	89
TABELA 12 - CONDIÇÕES DE REAÇÃO SELECIONADAS PARA A TOSILAÇÃO EM MEIO ÁGUA/ACETONITRILA DE KCD.	91
TABELA 13 – DESLOCAMENTO QUÍMICO DA UNIDADE G4S DAS FRAÇÕES KCDTP, KCDA, KCDD E KCDP.	100
TABELA 14 – CONDIÇÕES REACIONAIS (SN2).	102

LISTA DE ESQUEMAS

ESQUEMA 1 - ESTRUTURAS QUÍMICAS DA AGAROSE E KAPPA-CARRAGENANA.	17
ESQUEMA 2 - ESTRUTURA QUÍMICA DOS DIVERSOS TIPOS DE CARRAGENANAS.	19
ESQUEMA 3 – MECANISMO GERAL DA REAÇÃO DE TOSILAÇÃO UTILIZANDO A CELULOSE COMO EXEMPLO.	26
ESQUEMA 4 – REAÇÃO DO CLORETO DE TOSILA COM O DMAc.	27
ESQUEMA 5 – REAÇÃO DE OXIDAÇÃO DO CLORETO DE TOSILA NA PRESENÇA DO DMSO.	28
ESQUEMA 6 – HIDRÓLISE ÁCIDA PARCIAL DA <i>KAPPA</i> -CARRAGENANA .	30
ESQUEMA 7 - REAÇÃO DE AMINAÇÃO REDUTIVA DE UMA CETONA EM pH PROXIMO DE 6.	32
ESQUEMA 8 - REAÇÃO DE AMINAÇÃO REDUTIVA COM XILANAS DE BAIXA MASSA MOLAR.	33
ESQUEMA 9 - REAÇÃO DE AMINAÇÃO REDUTIVA COM A O-ACETIL-GALACTOMANANA.	34
ESQUEMA 10 - FLUXOGRAMA DO PROCEDIMENTO PARA A OBTENÇÃO DAS FRAÇÕES POLISSACARÍDICAS KCDR6 E KCDR1 POR HAP.	53
ESQUEMA 11 – HIDRÓLISE ÁCIDA PARCIAL DA FRAÇÃO KC SEGUIDA DA REAÇÃO DE AMINAÇÃO REDUTIVA.	58
ESQUEMA 12 – REAÇÃO DE AMINAÇÃO REDUTIVA REALIZADA POR DUCATTI, (2009).	66

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURA

ACN - Acetonitrila

CBM – Concentração bactericida mínima

CIM – Concentração inibitória mínima

DMAc – Dimetilacetamida

DMF – Dimetilformamida

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNS - Ácido dinitrosalicílico

DS – Grau de substituição

EM – Espectrometria de massas

FT-IR - Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier

TFA – Ácido Trifluoroacético

Galp - Galactopiranosose

GC – Cromatografia gasosa

GLC - Cromatografia gás-líquido

HAP – Hidrólise ácida parcial

HPSEC-MALLS - Cromatografia líquida de alta eficiência por exclusão por tamanho acoplada a espalhamento de luz multiângulos

HPV – Papiloma vírus Humano

HSQC - *Heteronuclear single quantum correlation spectroscopy*

HSV – Vírus do herpes simples

ι – *Iota*

κ – *Kappa*

λ – *lambda*

Mw – massa molar, “*molecular weight*”

RID – Detector de índice de refração

RMN - Ressonância magnética nuclear

SN_2 – Substituição nucleofílica bimolecular

TsCl – cloreto de tosila

TTC - Cloreto de trifeniltetrazólio

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1 POLISSACARÍDEOS DE ALGAS MARINHAS VERMELHAS	15
1.2 CARRAGENANAS	17
1.2.1 PRINCIPAIS APLICAÇÕES INDUSTRIAIS DAS CARRAGENANAS .	20
1.2.2 PRINCIPAIS APLICAÇÕES BIOLÓGICAS DAS CARRAGENANAS .	22
1.3 MODIFICAÇÕES QUÍMICAS EM POLISSACARÍDEOS	24
1.3.1 REAÇÃO DE TOSILAÇÃO EM POLISSACARÍDEOS.....	25
1.3.2 HIDRÓLISE ÁCIDA PARCIAL (HAP) DE GALACTANAS DE ALGAS VERMELHAS.....	29
1.3.3 REAÇÃO DE AMINAÇÃO REDUTIVA EM POLISSACARÍDEOS	31
2. OBJETIVOS	35
2.1 OBJETIVO GERAL:	35
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	35
CAPÍTULO 1	36
3. INTRODUÇÃO	37
4. MATERIAL E MÉTODOS	39
4.1 MATERIAIS E REAGENTES.....	39
4.1.1 MICRORGANISMOS	40
4.2 EXTRAÇÃO DO POLISSACARÍDEO	40
4.3 MÉTODO DO DINITRO-SALICILATO (DNS) E CURVA DE HIDRÓLISE.....	40
4.4 HIDRÓLISE ÁCIDA PARCIAL (HAP) DA FRAÇÃO KC E OBTENÇÃO DAS FRAÇÕES KCDR6 E KCDR1.	41
4.5 SÍNTESE DOS DERIVADOS AMINADOS ATRAVÉS DA HAP DA FRAÇÃO KC E OBTENÇÃO DAS FRAÇÕES KAP, KAH, KAN, KAD, KAN1 E KAD1.	42
4.6 MÉTODOS ANALÍTICOS	43
4.7 TESTES DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	45
4.7.1 PREPARO DO CLORETO DE 2,3,5-TRIFENILTETRAZÓLIO (TTC). 45	
4.7.2 MÉTODO DE MICRODILUIÇÃO	45
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	46

5.1	EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO POLISSACARÍDEO DA ALGA VERMELHA <i>KAPPAPHYCUS ALVAREZII</i>	46
5.2	HIDRÓLISE ÁCIDA PARCIAL (HAP) DA FRAÇÃO KC.....	51
5.3	INSERÇÃO DE GRUPOS HIDROFÓBICOS AO TERMINAL REDUTOR DE FRAGMENTOS POLISSACARÍDICOS OBTIDOS DE KC ATRAVÉS DE REAÇÕES DE AMINAÇÃO REDUTIVA.....	57
5.4	SÍNTESE DE AMINAS <i>N</i> -ALQUIL-1-DESÓXI-LACTITOL	65
5.5	ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS DERIVADOS <i>N</i> -ALQUIL-CARRAGENANAS E <i>N</i> -ALQUIL-LACTITOLS.....	67
6.	CONCLUSÃO	72
	CAPÍTULO 2	74
7.	INTRODUÇÃO	75
8.	MATERIAL E MÉTODOS	78
8.1	MATERIAIS E REAGENTES.....	78
8.2	HIDRÓLISE ÁCIDA PARCIAL (HAP) DA FRAÇÃO KC.....	78
8.3	SÍNTESES	79
8.3.1	TOSILAÇÃO DE KCD EM SOLVENTE ORGÂNICO.....	79
8.3.2	TOSILAÇÃO DE KCD EM MISTURA DE ÁGUA E ACETONITRILA. .	80
8.4	CÁLCULO DO GRAU DE SUBSTITUIÇÃO (DS) POR RMN- ¹ H E MAPA DE CORELAÇÃO ¹ H- ¹³ C HSQC	81
8.5	REAÇÕES DE SUBSTITUIÇÃO NUCLEOFÍLICA COM A FRAÇÃO TOSILADA DA K-CARRAGENANA (KCDT).	82
8.6	MÉTODOS ANALÍTICOS	83
9.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	84
9.1	OBTENCAO DA FRACAO KCD A PARTIR DA HIDRÓLISE ÁCIDA PARCIAL DE KC.....	84
9.2	TOSILAÇÃO DA FRAÇÃO KCD.....	88
9.2.1	TOSILAÇÃO DE KCD EM SOLVENTE ORGÂNICO.....	88
9.2.2	TOSILAÇÃO DE KCD EM ÁGUA/ACETONITRILA.	90
9.2.3	REAÇÕES DE SUBSTITUIÇÃO NUCLEOFÍLICA (SN2) NA FRAÇÃO KCDTP.....	101
10.	CONCLUSÃO	107
11.	CONCLUSÃO GERAL	109
	REFERÊNCIAS	111

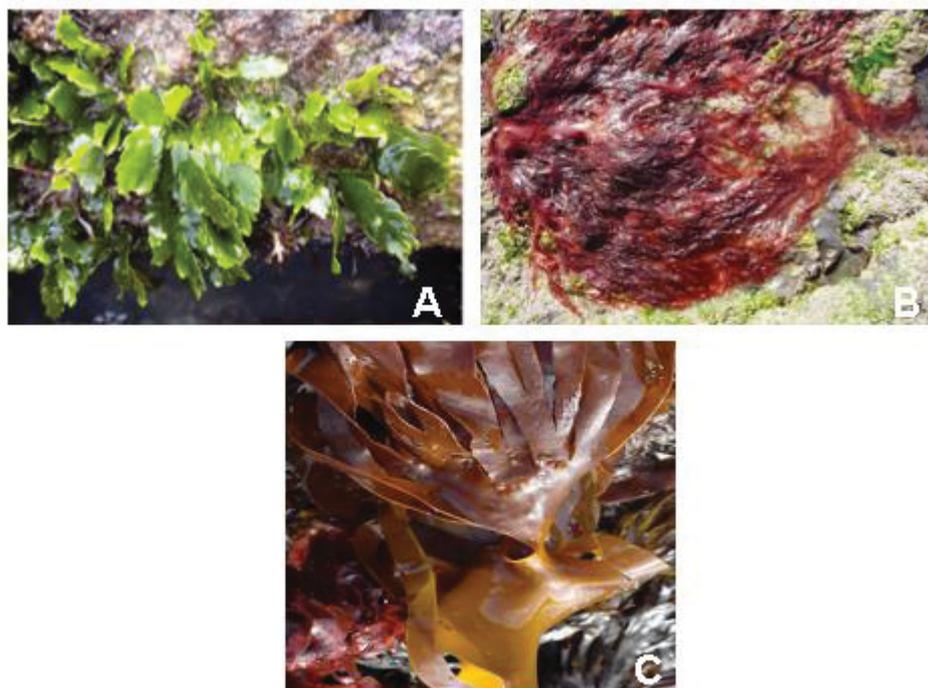
1. INTRODUÇÃO

1.1 POLISSACARÍDEOS DE ALGAS MARINHAS VERMELHAS

As algas marinhas possuem um papel importante nos componentes bióticos de diferentes ecossistemas. Sua distribuição é dependente de fatores físicos, químicos e biológicos. Em conjunto com os animais de coral, as algas marinhas são consideradas indicadores da saúde do ecossistema. Elas estão na base da cadeia alimentar marinha, sendo fonte de alimento direto para ouriços-do-mar e peixes. Além disso, fornecem abrigo e área reprodutiva para peixes, invertebrados, aves e mamíferos (BAWEJA et al., 2016).

A grande maioria das algas habitam nos sistemas marinhos, como as algas do filo *Chlorophyta* (verdes), *Rhodophyta* (vermelhas) e *Ochrophyta* (marrons) (FIGURA 1), contudo algumas espécies se adaptaram bem ao ambiente de água doce e salobra como as algas do gênero *Gracilaria* e *Ulva*. Deve-se considerar as condições de salinidade (hipo ou hipersalinidade) e fatores ambientais como luz e dessecação como fatores críticos para o desenvolvimento das algas em cada ambiente (KUMAR et al., 2014; BAWEJA et al., 2016). Dentre as diversas classes de algas marinhas, as algas vermelhas (filo *Rhodophyta*) se destacam por possuírem a maior diversidade de espécies, chegando a mais de 7.000 espécies. Dentre os principais tipos se encontram as algas do gênero *Coralline*, *Porphyra*, *Gracilaria*, *Polysiphonia*, *Rhodymeniales* e *Kappaphycus* (BAWEJA et al., 2016).

FIGURA 1 – EXEMPLO DE ALGA MARINHA VERDE, VERMELHA E MARROM.



A: *Caulerpa scalpelliformis*, B: *Halymenia* sp. e C: *Laminaria hyperborea*.

FONTE: BAWEJA et al. (2016)

Os polissacarídeos são produzidos pelas algas marinhas como produtos de armazenamento e como parte de suas paredes celulares, onde são encontrados tanto na parede fibrilar quanto na matriz intercelular. Estas moléculas geralmente estão presentes com outros biopolímeros e sua estrutura depende da espécie da alga (BAWEJA et al., 2016; COSENZA et al., 2017). De um modo geral, os polissacarídeos são moléculas amplamente disponíveis na natureza, e possuem vantagens como as de serem biocompatíveis, biodegradáveis e apresentar baixa toxicidade a organismos vivos (CHOPIN et al., 2014).

Alguns polissacarídeos são comumente produzidos pelas algas vermelhas, como o polissacarídeo de armazenamento conhecido como o amido das florídeas, alguns polissacarídeos fibrilares da parede celular como a celulose, mananas e xilanas (USOV, 2011; COSENZA et al., 2017). Contudo, as algas vermelhas diferem das demais algas por produzirem predominantemente galactanas sulfatadas na composição de suas paredes celulares e matrizes intercelulares. As galactanas possuem um esqueleto linear constituído de unidades alternadas de β -D-galactopiranosose substituídas em carbono 3 a α -

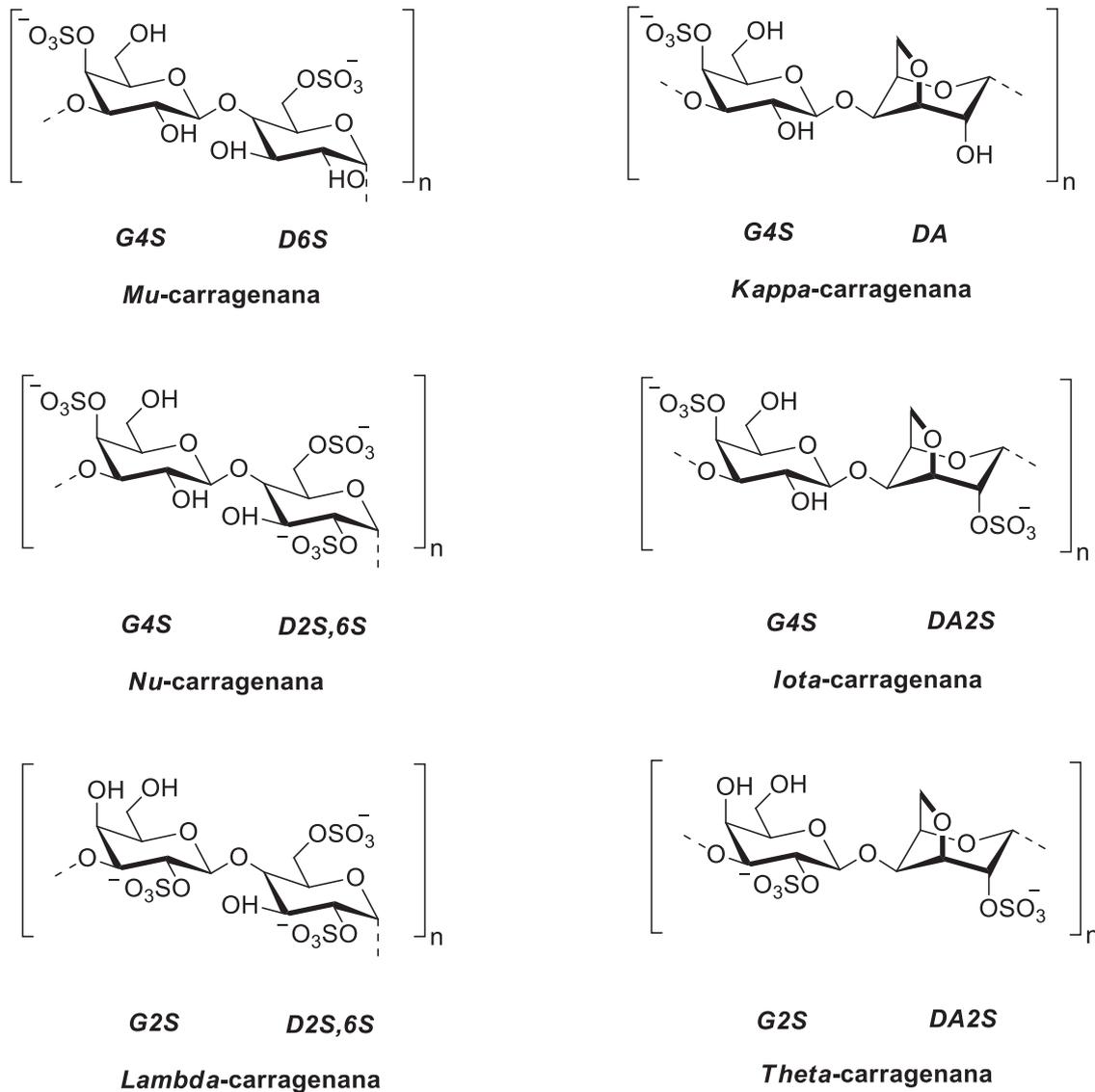
classificar as carragenanas em famílias, conforme a posição do grupamento sulfato na unidade de β -D-galactopiranosose (KNUTSEN et al., 1994). No ESQUEMA 2 são mostradas as estruturas químicas de algumas carragenanas, tais como a *Kappa* (κ), *Iota* (i), *lambda* (λ), *mu* (μ), *nu* (ν) e *theta* (θ) (CAMPO et al., 2009).

Dentre os tipos de carragenanas, a *Kappa*- e *Iota*-carragenana são as mais utilizadas pela indústria alimentícia e farmacêutica. Já a *theta*-carragenana é a mais rara e menos utilizada, sendo encontrada apenas em algumas espécies das famílias *Phyllophoraceae* e *Solieriaceae* (COSENZA et al., 2017).

As carragenanas são encontradas geralmente na forma de híbridos, onde mais de uma díade estrutural pode estar presente. Por exemplo, no híbrido κ/i -carragenana extraído da alga *K. alvarezii* tanto a díade de *Kappa* quanto *Iota*-carragenana são encontradas no biopolímero. Contudo, não se sabe precisamente se estas díades existem como heteropolímeros ou fazem parte de uma mesma cadeia polissacarídica (VAN DE VELDE et al., 2005; COSENZA et al., 2017).

Knutsen et al. (1994) propuseram uma sistematização da nomenclatura das carragenanas baseado no nome IUPAC, bem como um código de letras para representar as díades. Este código definiu que a unidade 3-ligada de β -D-galactopiranosose seria abreviada com a letra **G**, a unidade 4-ligada de α -D-galactopiranosose com a letra **D** e a unidade 4-ligada de 3,6-anidro- α -D-galactopiranosose utilizaria as letras **DA**. Os números corresponderiam aos carbonos da unidade de galactose e os substituintes éster de sulfato, 4,6-O-(1'-carboxietilideno) e grupos O-metil seriam definidos pelas letras **S**, **P** e **M**, respectivamente (ESQUEMA 2).

ESQUEMA 2 - ESTRUTURA QUÍMICA DOS DIVERSOS TIPOS DE CARRAGENANAS.



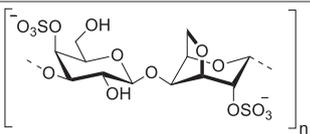
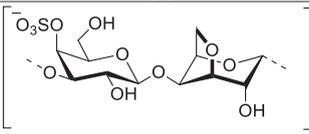
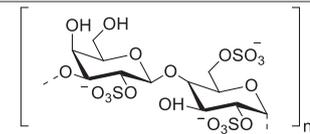
FONTE: Adaptado de CAMPO et al. (2009)

As carragenanas, por serem sulfatadas e apresentarem uma boa solubilidade em água, são extraídas em meio aquoso com aquecimento, seguido de uma precipitação com etanol ou 2-propanol, onde a matéria prima inicial é a alga de interesse que possui uma maior quantidade da carragenana desejada. As principais algas utilizadas para a extração de carragenanas são as algas do gênero *Chondrus*, *Gigartina* e *Euclima* (USOV, 2011; NECAS; BARTOSIKOVA, 2013).

As carragenanas extraídas destas algas apresentam geralmente uma massa molecular acima de 100 kDa e entre 22% a 35% de grupos sulfato

dependendo do tipo de carragenana (NECAS; BARTOSIKOVA, 2013). Algumas características físico-químicas das carragenanas *Iota*, *Kappa* e *lambda* podem ser encontradas na TABELA 1.

TABELA 1 - ESTRUTURA E PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DA IOTA-, KAPPA- E LAMBA-CARRAGENANA.

	<i>Iota-</i>	<i>Kappa-</i>	<i>Lambda-</i>
Estrutura			
Grupos Sulfato	32%	25%	35%
3,6-anidrogalactose	30%	34%	-
Temperatura de Solubilização	>70°C	>70°C	Frio
Gelificação	40-70°C	30-60°C	-
Fusão	50-80°C	40-75°C	-
Estabilidade (pH)	4-10	4-10	4-10
Cátion para formação de gel	Ca ²⁺	K ⁺ e Ca ²⁺	Não

FONTE: Adaptado de RIOUX e TURGEON (2015).

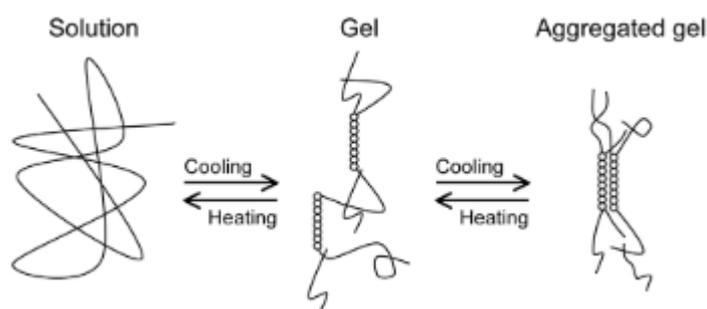
1.2.1 PRINCIPAIS APLICAÇÕES INDUSTRIAIS DAS CARRAGENANAS

As principais utilidades das carragenanas estão na indústria de alimentos, onde são utilizadas como espessante, gelificante e estabilizante. Na indústria farmacêutica são empregados como excipientes para comprimidos e para formulações de liberação controlada entre outras, onde o mercado total das carragenanas foi estimado em US \$300 milhões por ano (CAMPO et al., 2009; NECAS; BARTOSIKOVA, 2013).

As propriedades físico-químicas e reológicas das carragenanas são afetadas principalmente pela presença do contra íon do grupo sulfato, que normalmente são os íons de sódio, potássio, cálcio e magnésio. Outros fatores como a composição química e estrutural (quantidade de sulfato, substituintes e a posição destes na cadeia), concentração e temperatura em solução também são determinantes para as propriedades destes polissacarídeos. Como por exemplo, a *Kappa-* e *Iota-*carragenana em solução aquosa a uma temperatura

entre 40-60 °C tendem a formar géis, que são estáveis e termicamente reversíveis de acordo com o aquecimento/resfriamento da solução. Ainda, a presença dos cátions K^+ , Rb^+ , Cs^+ e NH_4^+ auxiliam na formação das hélices e das zonas de junção formadas pela agregação das cadeias gerando um gel firme e resistente (FIGURA 2) (CAMPO et al., 2009; RIOUX; TURGEON, 2015).

FIGURA 2 – MECANISMO DE GELIFICAÇÃO DAS CARRAGENANAS



FONTE: RIOUX e TURGEON (2015)

A presença da unidade 3,6-anidro- α -D-galactopiranosse e sulfato também é importante para a formação de gel, sendo esta propriedade inclusive utilizada para a separação de diferentes carragenanas como a *lambda*- e *Kappa*-carragenana. Por exemplo, as carragenanas extraídas de *Chondrus crispus* podem ser separadas, onde a λ -carragenana por apresentar baixas quantidades de 3,6-anidro-galactose e altos teores de sulfato é solúvel em uma solução de KCl, enquanto a *Kappa*-carragenana, mais rica neste monossacarídeo e com menor quantidade de sulfato é insolúvel nesta solução, havendo uma separação entre as duas carragenanas pela sua solubilidade (KNUTSEN et al., 1994).

As propriedades das carragenanas permitem que elas sejam usadas para compor a formulação de sobremesas gelificadas, glacê de bolo, produtos vegetarianos, géis feitos para carnes enlatadas, suco de frutas, alimentos para animais, onde as carragenanas formam géis estáveis a temperatura ambiente e afetam positivamente a textura e sabor destes alimentos. Especialmente na indústria de laticínios as carragenanas são utilizadas em pudins, cremes e mousses, onde a κ -carragenana interage com as proteínas do leite e permite um aumento da viscosidade, sendo o efeito espessante 5 a 10 vezes maior no leite que na água (RIOUX; TURGEON, 2015).

As carragenanas também atuam sinergicamente com outros polímeros, tais como a goma de alfarroba, formando géis fortes e elásticos, sendo esta combinação utilizada para manter em suspensão partículas como frutas em iogurtes. Em interação com a goma konjac forma um gel ainda mais forte do que com a goma de alfarroba, e com amido aumenta em quatro vezes a capacidade deste polissacarídeo em formar géis (RIOUX; TURGEON, 2015).

Na indústria farmacêutica a κ -carragenana também já foi utilizada na imobilização de *Streptomyces aureofaciens* para se aumentar a produção de antibióticos como as tetraciclina e clortetraciclina (NECAS; BARTOSIKOVA, 2013). As carragenanas também já foram estudadas para o desenvolvimento de sistemas de liberação controlada de drogas (*“drug delivery”*), como por exemplo na produção de micro/nanopartículas baseadas em carragenanas, onde através da carga negativa das carragenanas estas são utilizadas em combinação com polímeros catiônicos ou polieletrólito catiônico como um invólucro para microcápsulas. As carragenanas também podem ser usadas como microesferas para distribuir drogas de maneira controlada (LI et al., 2014).

1.2.2 PRINCIPAIS APLICAÇÕES BIOLÓGICAS DAS CARRAGENANAS

As carragenanas são conhecidas como agentes que causam inflamação. O edema de pata induzido pelas carragenanas é utilizado como um modelo clássico para o desenvolvimento de inflamação para avaliação de drogas, onde a *iota-* e *lambda-*carragenana possuem um potencial inflamatório maior que a κ -carragenana, provavelmente pelo maior teor de sulfato (SILVA et al., 2010).

Esses polissacarídeos sulfatados, assim como a heparina, apresentam também consideráveis atividades anticoagulantes (NAKATSUKASA; INAKURA; YABANA, 2009; POMIN, 2009). O aumento do teor de sulfato parece estar aliado a um maior efeito anticoagulante (OPOKU; QIU; DOCTOR, 2006; USOV, 2011) contudo, alguns estudos demonstram que não somente a quantidade mas a posição do grupamento sulfato pode estar relacionado à atividade anticoagulante desses polissacarídeos (USOV, 2011; DE ARAÚJO et al., 2013). Dentre as carragenanas, a λ -carragenana possui aproximadamente quatro vezes mais atividade que a κ -carragenana, no entanto a atividade da carragenana mais ativa

é muito inferior à capacidade anticoagulante da heparina (NECAS; BARTOSIKOVA, 2013).

As carragenanas apresentam-se também como inibidoras de infecção de célula hospedeira de vários vírus envelopados. Esta inibição está relacionada ao efeito da carga negativa destes polissacarídeos sulfatados, que interferem na ligação inicial do vírus às células alvo, provavelmente envolvendo interação entre proteínas externas carregadas positivamente dos vírus (WITVROUW; DE CLERCQ, 1997).

O Papiloma vírus humano (HPV) é um dos vírus que as carragenanas inibem com grande eficiência, provavelmente devido ao fato destas galactanas serem semelhantes ao sulfato de heparano, um fator de ligação celular do vírus. As λ -, ι - e κ -carragenanas demonstraram ser ativas contra uma variedade de tipos comuns de HPV que são sexualmente transmissíveis e podem causar câncer cervical e verrugas genitais. (BABA et al., 1988). Alguns estudos demonstraram também que algumas carragenanas como a λ -, ι - e κ -carragenanas possuem um potente efeito antiviral contra estirpes do vírus herpes simplex (HSV) do tipo 1 e 2, vírus da imunodeficiência humana (HIV) e vírus da influenza A (CAMPO et al., 2009; NECAS; BARTOSIKOVA, 2013).

No estudo de Yamashita et al. (2001), a λ -, ι - e κ -carragenanas foram analisadas em relação às suas atividades bacteriostáticas, onde estas demonstraram ter efeito contra as bactérias *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *Vibrio mimicus*, *Aeromonas hydrophila*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, sendo a *lota*-carragenana a mais ativa. Ainda neste estudo a *lota*-carragenana foi quimicamente dessulfatada em aproximadamente 90% e foi constatada com isto a perda de seu efeito bacteriostático, indicando um papel essencial do grupamento sulfato para a atividade bacteriostática deste polissacarídeo (YAMASHITA; KONISHI; SHIMIZU, 2001).

As carragenanas também demonstraram ter um efeito protetor contra os efeitos prejudiciais das endotoxinas de bactérias gram-negativas em ratos, estudo realizado *in vivo* e *in vitro*, aumentando a resistência dos camundongos à ação tóxica dos lipopolissacarídeos bacterianos, onde o grau de proteção dependeu da concentração do polissacarídeo, tempo e via de administração (ERMAK et al., 2006).

1.3 MODIFICAÇÕES QUÍMICAS EM POLISSACARÍDEOS

Os polissacarídeos possuem uma estrutura química definida e dificilmente alcançável através da síntese orgânica, são geralmente biocompatíveis, possuem uma baixa toxicidade, são biodegradáveis e abundantes na natureza. Contudo, alguns polissacarídeos não possuem uma bioatividade inerente de sua estrutura nativa, ou suas bioatividades não são satisfatórias, o que torna estes polímeros bons substratos para modificações químicas (DESFTISCHER et al., 2006; CHOPIN et al., 2014; LI et al., 2016).

Os polissacarídeos são alvos de modificações químicas há décadas, o que leva a uma ampla gama de conhecimento adquirido nesta área de estudo. Dentre as possibilidades de modificações químicas, podemos separar as reações em seletivas e não-seletivas, dependendo da especificidade do método de funcionalização e também em homogêneo ou heterogêneo, dependendo do modo de condução dessas reações, envolvendo a solubilidade dos reagentes e do polissacarídeo utilizado, onde a posição exata dos substituintes e a uniformidade das substituições ao longo da cadeia polissacarídica podem afetar as propriedades destas biomoléculas (YALPANI, 1988).

A atividade biológica dos polissacarídeos está relacionada à suas propriedades inerentes, como o tipo de ligação glicosídica, a sua solubilidade, massa molar média, monossacarídeos constituintes, a configuração espacial da molécula, entre outras. Deste modo, as modificações químicas que alterem a estrutura tridimensional dos polissacarídeos, a massa molar e os tipos de grupos substituintes (quantidade e posição) irão exercer impactos em suas características e atividades biológicas (LI et al., 2016).

De um modo geral, os biopolímeros possuem algumas dificuldades para serem alvos de modificações, entre elas a solubilidade dos reagentes e do polissacarídeo no meio reacional, a seletividade da reação, pois o polissacarídeo apresenta um alto número de grupamentos reativos e a possibilidade de um rendimento final baixo após as técnicas de purificação (CHOPIN et al., 2014).

Os polissacarídeos mais utilizados em reações de modificação são também os encontrados em maior abundância na natureza, como a celulose, quitina/quitosana, alginato, agarose e as carragenanas em uma menor proporção. Como estes polissacarídeos possuem uma presença dominante de

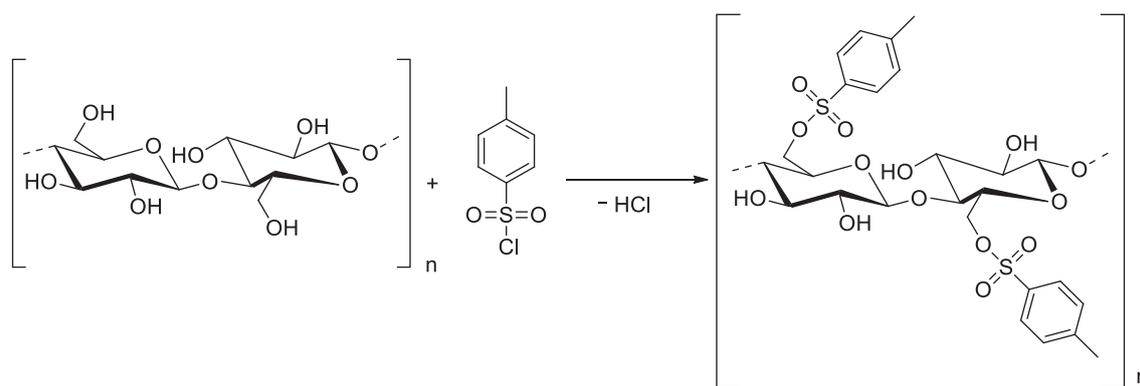
grupos funcionais hidroxila, alguns com a presença de aminas e grupos carboxílicos, as reações comumente realizadas com estes polissacarídeos são as reações acetilação/desacetilação, oxidação, sulfatação, fosforilação, tiolação, tosilação, amidação, carboxialquilação, eterificação e esterificação (DESFTISCHER et al., 2006; CHOPIN et al., 2014).

O grau de modificação dos polissacarídeos é comumente chamado de DS, que deriva da expressão em inglês “*degree of substitution*” traduzida livremente como grau de substituição. O DS pode ser definido pelo número de substituições realizadas por unidade monomérica, levando em consideração a estrutura do polissacarídeo e o tipo de reação que está sendo realizada. Como exemplo, podemos utilizar a celulose, formada por unidades repetitivas de [4- β -D-Glcp-(1 \rightarrow)], que contém três grupos hidroxila por monômero. Então, se considerarmos uma reação de acetilação os três grupos hidroxilas livres podem ser acetilados e o DS máximo seria 3. Contudo, em uma reação de oxidação, que atue somente em álcoois primários, o DS máximo seria 1, pois o monômero da celulose possui apenas um álcool primário (C6) em sua estrutura (CUMPSTEY, 2013).

1.3.1 REAÇÃO DE TOSILAÇÃO EM POLISSACARÍDEOS

A reação de tosilação é um tipo de reação de esterificação, onde o oxigênio do polissacarídeo atua como nucleófilo na reação e é retido no produto final (ESQUEMA 3) (CUMPSTEY, 2013). Para esta reação, o reagente utilizado é o cloreto de *p*-toluenossulfonila. Esta reação pode ser conduzida de maneira homogênea ou heterogênea. Algumas reações utilizando a celulose foram realizadas de forma heterogênea utilizando o cloreto de *p*-toluenossulfonila, em meio aquoso e NaOH como base. Também é relatada a tosilação deste polissacarídeo de forma completamente homogênea utilizando-se o solvente orgânico dimetilacetamida (DMAc) na presença de LiCl (HEINZE; LIEBERT; KOSCHELLA, 2006).

ESQUEMA 3 – MECANISMO GERAL DA REAÇÃO DE TOSILAÇÃO UTILIZANDO A CELULOSE COMO EXEMPLO.



FONTE: O autor.

Vale ressaltar que os ésteres derivados de ácido sulfônico são muito reativos e podem ser atacados por grupos hidroxila não modificados *in situ*, produzindo ligações cruzadas entre as cadeias polissacarídicas, gerando subprodutos que geralmente são insolúveis. Além disso, outro subproduto que pode ser gerado são os derivados clorados (cloro-desóxi-acúcares), isto ocorrendo pelo ataque nucleofílico dos íons cloreto (HEINZE; LIEBERT; KOSCHELLA, 2006).

Os ésteres de sulfonato atuam como um bom grupo de saída em reações de SN_2 e esta característica confere a estes derivados sua principal utilidade. A reação de tosilção tende a apresentar uma boa regiosseletividade, deste modo, o grupo tosil reage preferencialmente com hidroxilas primárias ao invés de hidroxila secundárias, contudo reações que conduzem a um alto grau de substituição (DS) nos polissacarídeos tendem a não serem totalmente regiosseletivas (CUMPSTEY, 2013).

Alguns polissacarídeos já foram estudados em relação a sua reatividade com o cloreto de tosil (TABELA 2), sendo os principais e mais recentes, a celulose em meio orgânico (RAHN et al., 1996), celulose em meio aquoso (ELCHINGER et al., 2012; SCHMIDT; LIEBERT; HEINZE, 2014), dextrana em meio orgânico (HEINZE; MICHEALIS; HORNIG, 2007), agarose em meio orgânico (GERICKE; HEINZE, 2015) e agarose em meio aquoso/acetonitrila (HEUKO, 2015).

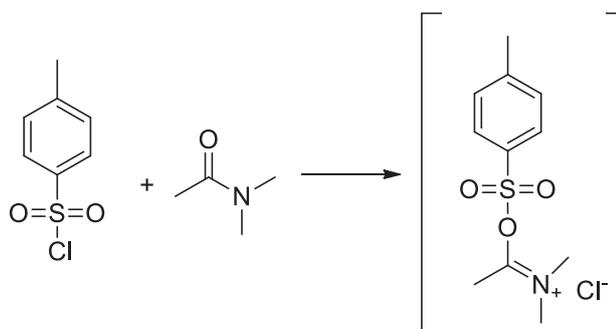
TABELA 2 – COMPARATIVO DE DS MÁXIMO DAS REAÇÕES DE TOSILAÇÃO EM DIFERENTES POLISSACARÍDEOS.

Polissacarídeo	Solvente	Base	Reagente	Tempo (h)	Temp. (°C)	DS max.
Celulose^a	H ₂ O/Ureia	NaOH	TsCl	5	0	1.68
Celulose^b	DMAc/LiCl	Et ₃ N	TsCl	24	8	2.30
Agarose^c	DMAc/LiCl	Et ₃ N	TsCl	24	25	1.81
Agarose^d	H ₂ O/ACN	NaOH	TsCl	24	30	0.82
Dextrana^e	DMAc/LiCl	Et ₃ N	TsCl	24	8	1.31

^aRAHN et al. (1996); ^bELCHINGER et al. (2012); SCHMIDT, LIEBERT e HEINZE, (2014); ^cHEINZE, MICHEALIS e HORNIG, (2007); ^dGERICKE e HEINZE, (2015); ^eHEUKO, (2015).

Em meio orgânico o principal solvente utilizado para esta reação é a dimetilacetamida (DMAc). Vale salientar que o cloreto de tosilato e o DMAc podem reagir formando sal de O-(p-toluenossulfonila)-*N,N*-dimetilacetiminium (ESQUEMA 4). Contudo, este intermediário também é reativo e consegue reagir com os grupos hidroxila existentes nos polissacarídeos (HEINZE; LIEBERT; KOSCHELLA, 2006).

ESQUEMA 4 – REAÇÃO DO CLORETO DE TOSILA COM O DMAc.



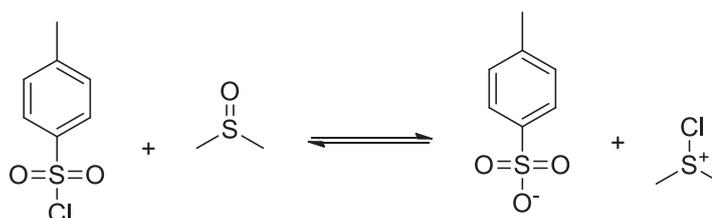
FONTE: O autor.

Como há formação de ácido clorídrico no meio reacional, normalmente há o emprego de uma base para neutralizar este ácido, contudo é sabido que o uso de bases fracas como a piridina ($pK_a=5,25$) pode favorecer a formação de compostos cloro-desóxi em altas temperaturas, já o uso de bases fortes como a trietilamina ($pK_a=10,65$) e a 4-dimetilaminopiridina ($pK_a=9,70$) favorece a diminuição da formação de espécies reativas, conduzindo assim a reação a uma

maior formação do éster sulfonado sem as indesejáveis reações secundárias (HEINZE; LIEBERT; KOSCHELLA, 2006).

O uso do solvente orgânico dimetilsulfóxido (DMSO), solvente polar aprótico, que geralmente solubiliza de forma eficiente a maioria dos polissacarídeos, é evitado. O cloreto de tosilato reage com o DMSO (ESQUEMA 5), produzindo toluenosulfonato, um subproduto que não promove a tosilatação (GERICKE; HEINZE, 2015).

ESQUEMA 5 – REAÇÃO DO CLORETO DE TOSILA NA PRESENÇA DO DMSO.



FONTE: O autor.

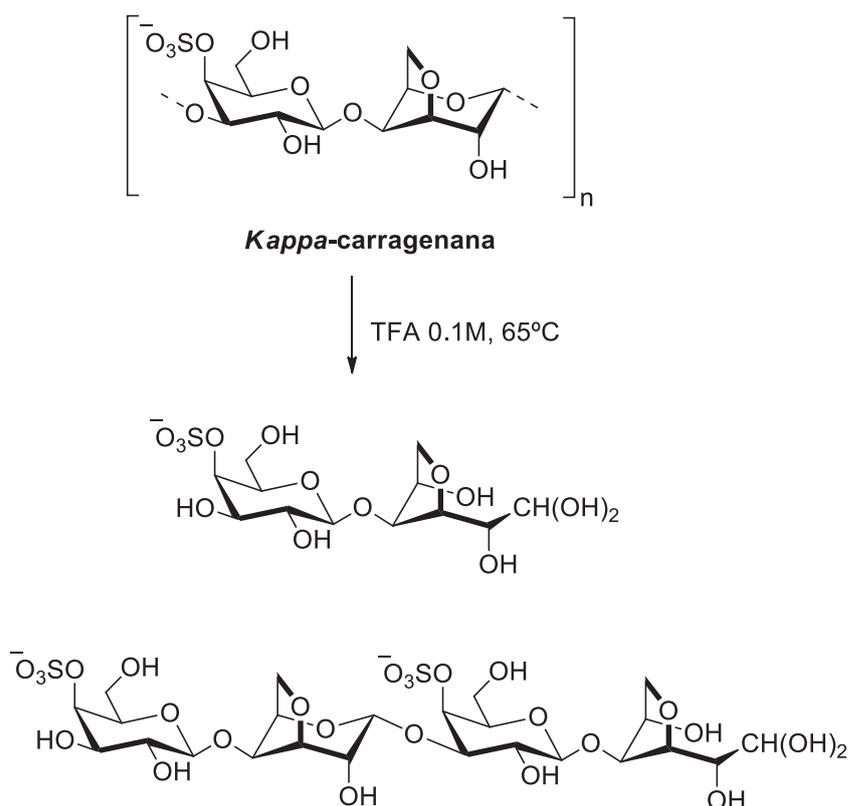
Os principais meios utilizados para se caracterizar os produtos formados após uma reação de tosilatação em polissacarídeos são através do estudo dos espectros de RMN ^1H e ^{13}C . Os principais sinais observados em um espectro de ^{13}C são os sinais referentes ao grupo *p*-toluenossulfônico, principalmente o carbono do grupo metil encontrado próximo a 20,5 ppm e aos átomos de carbono aromáticos entre 127,0 e 145,0 ppm. Na análise do espectro, também é possível notar diferenças nos sinais referentes ao polissacarídeo, sendo eles a esterificação, preferencial, do C6 dos polissacarídeos, geralmente constituído de uma hidroxila primária, onde o sinal geralmente próximo de 60,0 ppm (dependendo do polissacarídeo) diminui substancialmente, podendo chegar a desaparecer completamente dependendo do grau de substituição. O aparecimento de um novo sinal anomérico (C1) indica a provável esterificação da hidroxila presente no C2 (HEINZE; LIEBERT; KOSCHELLA, 2006; GERICKE; HEINZE, 2015).

1.3.2 HIDRÓLISE ÁCIDA PARCIAL (HAP) DE GALACTANAS DE ALGAS VERMELHAS

A HAP é um meio de se modificar as estruturas químicas do polissacarídeo, diminuindo o tamanho da cadeia polissacarídica, podendo chegar a formar oligossacarídeos. Geralmente se utilizam condições ácidas brandas para esta hidrólise, por serem de baixo custo, acessíveis e rápidas, no entanto a condição aplicada deve ser bem estudada pois pode ser demasiadamente inespecífica ou haver a produção de subprodutos derivados do furfural (CHEONG et al., 2018).

A ligação alfa glicosídica envolvendo a unidade de 3,6-anidrogactose nas galactanas pode ser hidrolisada preferencialmente em condições ácidas. Entretanto, nestas condições, este derivado anidro também pode ser degradado com certa facilidade. Essa labilidade em meio ácido pode comprometer a quantificação da 3,6-anidro-gactose na forma de alditol acetato nas galactanas empregando cromatografia líquida gasosa (GLC). Assim, Stevenson e Furneaux, (1991) desenvolveram metodologias de hidrólise ácida parcial com o objetivo de se obter os derivados alditol acetato para análise da composição monossacarídica de galactanas. Um dos procedimentos consiste numa hidrólise ácida parcial utilizando ácido trifluoroacético (TFA) 0,1 mol/L a 80 °C, seguida de redução com boroidreto de sódio. Nesta etapa são formados principalmente oligossacarídeos contendo 3,6-anidro-gactitol como terminal redutor. Após esta primeira etapa, é realizada uma segunda hidrólise com TFA 2 mol/L a 120 °C para clivar as demais ligações glicosídicas produzindo monossacarídeos que posteriormente são reduzidos com boroidreto de sódio. Uma versão deste procedimento, denominada de hidrólise ácida redutiva, consiste em realizar a redução durante a etapa de hidrólise, empregando o agente redutor 4-metilmorfolina-borane. Sabendo que a primeira etapa da hidrólise empregada por Stevenson e Furneaux (1991) era mais branda e quebrava preferencialmente as ligações alfa envolvendo a 3,6-anidro-gactose, Ducatti et al. (2011) adaptaram esta metodologia (TFA 0,1 mol/L, 65 °C) para produzir oligossacarídeos a partir de galactanas. Foram isolados e caracterizados di- e tetrassacarídeos contendo 3,6-anidro-gactose no terminal redutor em sua forma de aldeído hidratado (diol geminal) (ESQUEMA 6).

ESQUEMA 6 – HIDRÓLISE ÁCIDA PARCIAL DA KAPPA-CARRAGENANA



FONTE: Adaptado de DUCATTI et al. (2011).

O uso de ácido clorídrico e ácido sulfúrico também são comumente encontrados na literatura científica para a realização da HAP em galactanas (KAMIŃSKA-DWÓRZNICKA et al., 2015; SUN et al., 2015). Yu et al. (2002) realizaram a hidrólise da κ -carragenana com ácido clorídrico e na caracterização dos oligossacarídeos encontrados verificaram que além de oligossacarídeos de diversas massas molares, o produto continha predominantemente a galactopiranosose 4-sulfato como terminal redutor e não redutor.

A resistência a hidrólise ácida dos grupos sulfato em galactanas sulfatadas como as carragenanas também é um importante aspecto a ser analisado levando-se em consideração a HAP, tendo em vista que a perda de sulfato pode afetar diretamente a atividade biológica destes polímeros. Deste modo, Karlsson (1999) analisou a possibilidade de dessulfatação através da HAP da κ -, ι - e λ -carragenanas, e encontrou que os grupos sulfato apresentam uma boa resistência às condições ácidas, não sendo facilmente hidrolisados.

Através da hidrólise ácida de polissacarídeos pode-se produzir oligossacarídeos com atividades biológicas. Por exemplo, oligossacarídeos

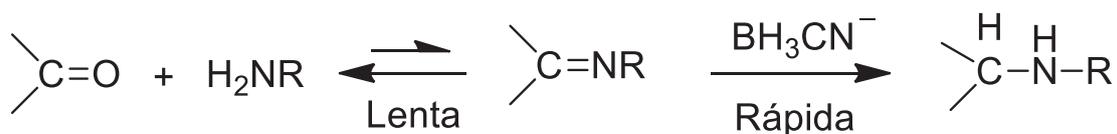
obtidos através de uma hidrólise enzimática da κ -carragenana, apresentaram atividade antimicrobiana principalmente contra os fungos *Saccharomyces cerevisiae*, *Penicillium citrinum* e *Mucor* sp. (WANG et al., 2011a). Ainda, oligossacarídeos obtidos através da hidrólise ácida branda da κ -carragenana comercial, demonstraram efeito antitumoral e imunomodulatório (YUAN; SONG, 2005) e capacidade de inibir a replicação do vírus influenza A de maneira dose-dependente (WANG et al., 2011b).

Cheong et al. (2018) relatam que há um grande potencial no uso de oligossacarídeos, devido as várias atividades biológicas apresentadas e número crescente de publicações científicas a respeito desde os anos 2000. Normalmente as bioatividades desses oligossacarídeos estão intimamente ligadas com suas propriedades, como seu grau de polimerização, tamanho molecular, tipo e taxa de constituintes monossacarídicos, configuração anomérica e posição das ligações glicosídicas.

1.3.3 REAÇÃO DE AMINAÇÃO REDUTIVA EM POLISSACARÍDEOS

Para a realização da reação de aminação redutiva em polissacarídeos de alta massa molecular, sem modificar as estruturas das díades ao longo do polissacarídeo e de maneira quantitativamente significativa, primeiramente é necessário haver a despolimerização destes, pois apesar dos polissacarídeos apresentarem estes terminais, dependendo do seu tamanho, a quantidade disponível de terminais redutores pode ser muito baixa. Após esta despolimerização, ocorre a produção de oligossacarídeos, com uma maior quantidade de terminais redutores. A partir deste terminal é possível realizar a reação de aminação redutiva, onde o grupo aldeído primeiramente reagirá com uma amina primária gerando então o seu intermediário imina, que posteriormente através da reação com agentes redutores produz a função amina (ESQUEMA 7), onde o uso do agente redutor cianoboroidreto apresenta-se como um dos melhores agentes redutores para esta reação (DALLAGNOL et al., 2017).

ESQUEMA 7 - REAÇÃO DE AMINAÇÃO REDUTIVA DE UMA CETONA EM pH PRÓXIMO DE 6.

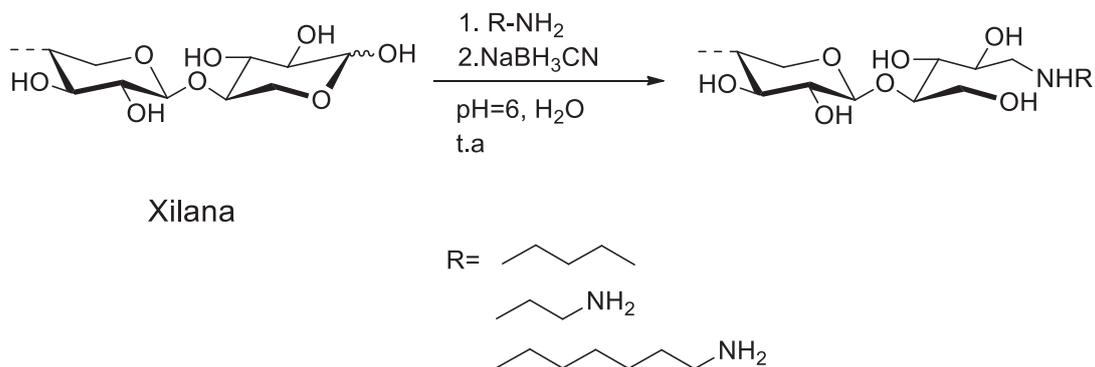


FONTE: Adaptado de BORCH et al. (1971).

Borch et al. (1971) estudaram o poder redutor e estabilidade do cianoboroidreto de lítio por meio de extensa investigação das propriedades redutoras do ânion cianoboroidreto (BH_3CN^-), descobrindo a versatilidade e seletividade deste agente redutor. A redução de aldeídos e cetonas simples ocorre insignificamente em pH neutro, contudo, em pH ácido (~3-4) esta reação se torna mais rápida e efetiva. Verificaram também que em pH neutro a redução de aldeídos e cetonas é ineficiente utilizando o cianoboroidreto como agente redutor, contudo, foi notado que a porção imínio de algumas reações sofria uma rápida redução entre pH (~6-7), sendo o pH= 6 ótimo para a formação do imínio. Deste modo, os autores evidenciaram a grande utilidade deste agente redutor para a realização de aminação redutiva simplesmente reagindo o composto carbonílico com a amina (ESQUEMA 7). Embora o pH entre 6 e 8 seja ótimo para aminações redutivas, houve sucesso também em reações em pH tão baixo quanto 4 e tão alto quanto 10, parecendo o único requisito, a presença de fonte de hidretos suficientes para o mecanismo da reação.

A reação de aminação redutiva utilizando o aldeído terminal dos polissacarídeos (terminal redutor) já vem sendo realizada a alguns anos, contudo ainda não são abundantes na literatura estas estratégias sintéticas. Daus et al. (2010) realizaram esta reação com xilanas de baixa massa molar obtidas de lascas de madeira, em meio aquoso levemente ácido (pH= 6), utilizando cianoboroidreto de sódio e as aminas 1-aminobutano, 1,2-diaminoetano e 1,6-diaminohexano (ESQUEMA 8). O autor demonstrou com sucesso a modificação dos terminais redutores deste polissacarídeo através da aminação redutiva.

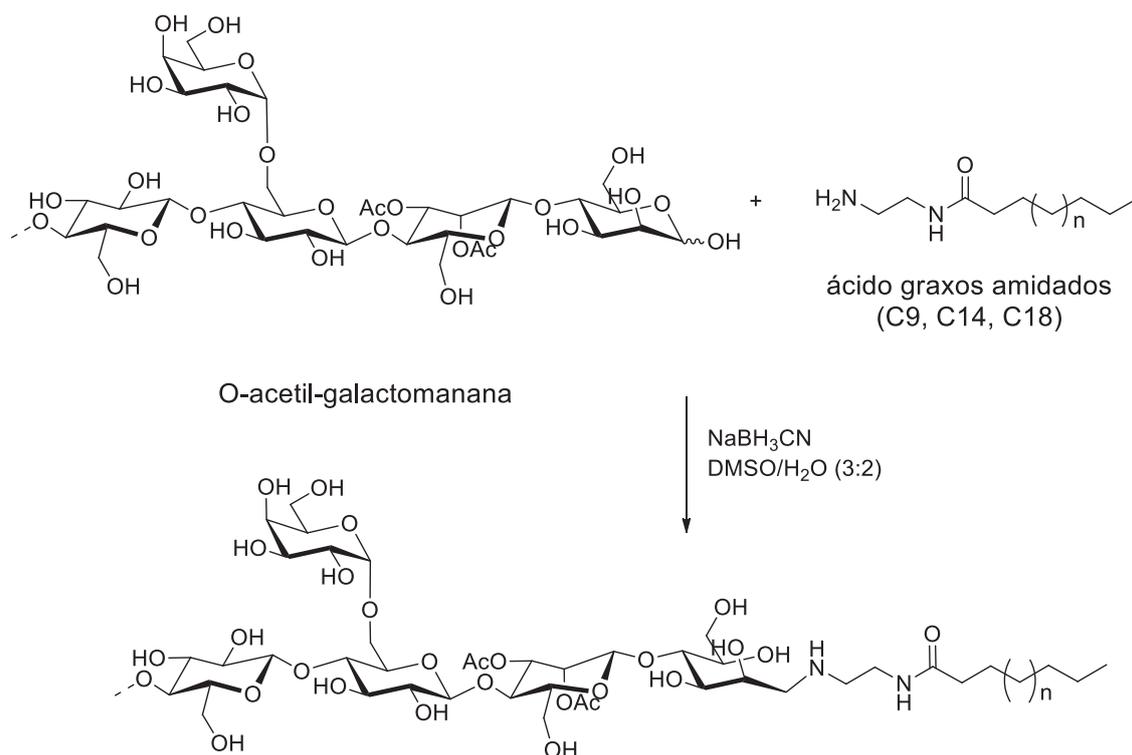
ESQUEMA 8 - REAÇÃO DE AMINAÇÃO REDUTIVA COM XILANAS DE BAIXA MASSA MOLAR.



FONTES: Adaptado de DAUS et al. (2010).

Dax et al. (2013) também utilizaram da reação de aminação redutiva para modificar a galactoglucomanana extraída da conífera *Picea abies*. Eles realizaram a reação em meio orgânico utilizando uma mistura de DMSO e etanol em proporção (3:2) e aminas previamente sintetizadas a partir de etilenodiamino e ácidos graxos (C9, C14 e C18) (ESQUEMA 9). O cianoboroidreto de sódio foi escolhido como agente redutor da reação, obtendo polissacarídeos anfífilos solúveis em água com rendimento de 40% após purificação por precipitação e diálise.

ESQUEMA 9 - REAÇÃO DE AMINAÇÃO REDUTIVA COM A O-ACETIL-GALACTOMANANA.



FONTE: Adaptado de DAX et al. (2013).

Sisu et al. (2009) sintetizaram copolímeros a partir de maltodextrina de médio peso molecular e 1,6-hexametilenodiamina. O terminal redutor da maltodextrina reagiu com a porção amino do 1,6-hexametilenodiamina por meio de uma reação de aminação redutiva com cianoboroidreto de sódio. Os copolímeros foram caracterizados por análise térmica e espectrometria de massas.

Rinaudo et al. (2011), sintetizaram polissacarídeos híbridos através da ligação por aminação redutiva do terminal aldeído da metilcelulose (polissacarídeo termoestável e de baixo peso molecular) com os grupos amino de polissacarídeos iônicos de alto peso molecular (quitosana e ácido hialurônico modificado com dihidrazina adípica) sendo o cianoboroidreto de sódio o agente redutor. Os polissacarídeos iônicos de alto peso molecular enxertados com metilcelulose apresentaram comportamento de gel melhorado uma vez que fortes sistemas de espessamento térmico foram criados com as propriedades físicas de repulsão eletrostática entre a porção iônica e as cadeias hidrofóbicas da metilcelulose.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL:

- Realizar a semissíntese dos derivados *N*-alquil, *O*-tosila, Azido, *N*-dietil e pirrolidina de *Kappa*-carragenana e a avaliação das atividades antimicrobianas dos derivados *N*-alquil sintetizados.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Realizar a hidrólise ácida parcial (HAP) da κ -carragenana e obter frações de diversas massas molares contendo 3,6-anidro-galactose ou galactitol no terminal redutor;

- Sintetizar, utilizando os oligômeros obtidos através da HAP, os derivados *N*-pentilamina, heptilamina, nonilamina e dodecilamina por meio da reação de aminação redutiva;

- Otimizar a reação de tosilação e sintetizar derivados tosilados substituídos preferencialmente em C6 da unidade de β -D-Galp-4-sulfato utilizando os oligômeros obtidos através da HAP;

- Sintetizar os derivados azido, *N*-dietil e pirrolidina por meio de substituição nucleofílica utilizando o derivado tosilado;

- Avaliar a potencial atividade antimicrobiana das frações obtidas por aminação redutiva e das frações obtidas por HAP com terminais redutores reduzidos contra os microrganismos: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Escherichia coli* ATCC 8738.

CAPÍTULO 1

**Este capítulo está escrito no formato de artigo científico visando a
submissão destes resultados para publicação.**

Semissíntese de *N*-alquil derivados de *Kappa*-carragenana e lactose e avaliação de suas propriedades antimicrobianas.

Resumo: As carragenanas, polissacarídeos sulfatados e solúveis em água, apresentam diversas atividades biológicas, tais como a atividade antimicrobiana. A reação de aminação redutiva é um método de modificação química eficaz para a inserção de grupamentos biologicamente ativos em polissacarídeos. Neste trabalho, o polissacarídeo híbrido κ - μ -I-carragenana foi extraído da alga vermelha *Kappaphycus alvarezii*, despolimerizado através da hidrólise ácida parcial, obtido em diversas massas moleculares e submetido à reação de aminação redutiva com pentilamina, heptilamina, nonilamina e dodecilamina. As atividades antimicrobianas das frações geradas foram avaliadas através do teste de microdiluição seriada. A partir do híbrido κ - μ -I-carragenana foram obtidas duas frações de massas molares diferentes, e sintetizadas seis frações aminadas, quatro com os grupamentos alquilamina (*N*-pentilamina, heptilamina, nonilamina e dodecilamina) purificados em membrana de *cut-off* 6-8 kDa e duas frações com os grupamentos alquilamina (nonilamina e dodecilamina) purificados em membrana de *cut-off* 1 kDa. Todas as frações foram caracterizadas através de RMN (1D e 2D). Os testes de atividade antimicrobiana demonstraram que a inserção do grupamento alquilamina de maior cadeia carbônica foi mais eficaz para o aumento da atividade antimicrobiana e as frações com maior grau de substituição foram as mais ativas.

3. INTRODUÇÃO

A alga vermelha *Kappaphycus alvarezii* é a fonte mais conhecida para a extração da *Kappa*-carragenana (κ -carragenana), sendo sua extração fácil, ambientalmente sustentável e de baixo custo. Seu extrato é constituído majoritariamente de κ -carragenana (CAMPO et al., 2009), contudo, geralmente pequenas quantidades de *Iota*- e *mu*-carragenanas estão presentes, assim como a presença de grupo *O*-metil no esqueleto do polissacarídeo (ESTEVEZ; CIANCIA; CERESO, 2004; JOUANNEAU et al., 2010; CHAN et al., 2013).

A κ -carragenana é um polissacarídeo aniônico, sulfatado, linear e solúvel em água que pertence à família das carragenanas, sendo composto

essencialmente de unidades de [3]- β -D-Galp-4-sulfato-(1 \rightarrow 4)-3,6-anidro- α -D-Galp-(1 \rightarrow)]. De um modo geral, as carragenanas possuem diversas aplicabilidades, tais como gel para imobilização de células e enzimas, e na indústria alimentícia, como gelificante e doador de viscosidade (CAMPO et al., 2009; NECAS; BARTOSIKOVA, 2013).

As carragenanas, por serem polissacarídeos sulfatados e de forte caráter aniônico, apresentam diversas atividades biológicas relatadas, como por exemplo atividade antimicrobiana (COGGINS, 2000; SOUZA et al., 2018), antiviral (DESFTISCHER et al., 2006; LEIBBRANDT et al., 2010; KALITNIK et al., 2013) e antitumoral (PRASEDYA et al., 2016; SOUZA et al., 2018).

Diversas modificações químicas já foram realizadas em carragenanas com o objetivo de modular suas propriedades, como a sulfatação seletiva para aumentar a sua atividade anticoagulante (DE ARAÚJO et al., 2013), oxidação total e parcial para uma maior atividade antiviral (COSENZA et al., 2015) e a inserção de grupamentos catiônicos para modificação das suas características reológicas (BARAHONA et al., 2015).

Um dos modos de modificação química em polissacarídeos é a utilização de seus terminais redutores, através dos grupos aldeído para reações químicas, como realizado na reação de aminação redutiva, contudo, a concentração destes terminais redutores é dependente do grau de polimerização do polissacarídeo, deste modo, a utilização de polissacarídeos de baixa massa molar é comum para este tipo de reação. Dentro desta abordagem, alguns polissacarídeos de baixa massa molar já foram utilizados para reações de aminação redutiva, como no caso da dextrana (NICHIFOR; MOCANU; STANCIU, 2014), galactoglucomanana (DAX et al., 2013) e maltodextrina (SISU et al., 2009) com a inserção de grupamentos amino e/ou catiônicos e/ou com cadeias hidrofóbicas.

Diversos grupamentos têm se mostrado eficientes para a inserção de atividade antimicrobiana em polímeros, tais como aminas quaternárias e halogênios como flúor e cloro. Além disso, a imobilização de um agente antimicrobiano também se mostrou eficaz (TIMOFEEVA; KLESHCHEVA, 2011; MUÑOZ-BONILLA; FERNÁNDEZ-GARCÍA, 2012; REN et al., 2017). Recentemente, a inserção de grupamentos alquilamina em polissacarídeos foi eficiente para aumentar a atividade antimicrobiana. Grupos contendo longa

cadeia alquila associada à uma carga positiva se mostraram mais eficientes do que os de menor cadeia alquila (QUELEMES et al., 2017; TUCHILUS et al., 2017).

Frente à necessidade constante de novas moléculas que possuam atividade antimicrobiana foi decidido utilizar a carragenana híbrida extraída da alga *K. alvarezii*, onde o polissacarídeo majoritário desta extração, a κ -carragenana já demonstrou algumas propriedades antimicrobianas (YAMASHITA; KONISHI; SHIMIZU, 2001; WANG et al., 2011a). O objetivo deste trabalho foi realizar uma despolimerização, através da hidrólise ácida parcial, para a obtenção de frações de baixa massa molar da κ -carragenana, inserindo nestas frações, através de uma reação de aminação redutiva, cadeias *N*-alquil. Os derivados obtidos foram caracterizados através de ressonância magnética nuclear (RMN) 1D e 2D, cromatografia de exclusão estérica de alta precisão acoplada a espalhamento de luz laser em multiângulos e índice de refração (HPSEC-MALLS/RID), análise elementar de carbono e nitrogênio e suas propriedades antimicrobianas foram avaliadas contra os microrganismos *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Escherichia coli* (ATCC 8739) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027). Neste trabalho também houve a avaliação da atividade antimicrobiana de derivados *N*-alquil-lactitol sintetizados e caracterizados na tese de Ducatti, (2009) contra os mesmos microrganismos citados.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS E REAGENTES

O polissacarídeo foi extraído da alga vermelha *Kappaphycus alvarezii* obtida comercialmente a partir da empresa MM algas (Ilha Grande, Rio de Janeiro). Membranas de diálise de *cut-off* 1 kDa, 6-8 kDa e 12-14 kDa (Sigma-aldrich), Ácido Trifluoroacético (Neon), Metanol (Alphatec), Tolueno (Synth), Acetona (Reatec), *N*-pentilamina, heptilamina, nonilamina e dodecilamina (Sigma-Aldrich), Cianoboroidreto de sódio (Sigma-aldrich), Boroidreto de sódio (Merk), ácido bórico (Merk) e Hidróxido de sódio (Synth) foram utilizados conforme adquiridos do fabricante.

4.1.1 MICRORGANISMOS

Bactéria gram-positiva (*Staphylococcus aureus* ATCC 6538) e as bactérias gram-negativas (*Escherichia coli* ATCC 8739 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027), foram utilizadas nos ensaios de atividade antimicrobiana no departamento de Farmácia da Universidade Federal do Paraná em colaboração com o Prof. Dr. Fabio S. Murakami.

4.2 EXTRAÇÃO DO POLISSACARÍDEO

A extração do polissacarídeo proveniente da alga vermelha *K. alvarezii* foi adaptada da metodologia descrita por De Araújo et al. (2013). A alga seca obtida do cultivo foi lavada em água corrente, sendo a última lavagem realizada com água destilada, seguida de secagem em estufa à 60 °C. O material foi então triturado em moinho de facas gerando um granulado fino. O granulado (40 g) foi suspenso em 2 litros de tampão fosfato de pH 7 (0,025 M) à 65 °C e agitado mecanicamente (720 rpm) por 5 h. A solução foi então centrifugada à 3.500 rpm por 20 min. O sobrenadante foi precipitado em etanol (3 volumes), recolhido através da filtração com tecido de seda, seco em capela de exaustão por 24 h. O resíduo seco foi ressolubilizado em água deionizada e dialisado (membrana de 12-14 kDa) contra NaCl 0,2 M por 24 h, seguido de consecutivas trocas com água deionizada até remoção completa do sal. O material resultante foi então liofilizado fornecendo aproximadamente 20 g ou 50% do material de partida, denominada fração KC.

4.3 MÉTODO DO DINITRO-SALICILATO (DNS) E CURVA DE HIDRÓLISE

O método do dinitrosalicilato (DNS) foi utilizado para realizar uma curva padrão de açúcar redutor, onde foi utilizada para esta curva um padrão de galactose (PM = 180,156 g/mol), através desta curva foi possível determinar a quantidade correspondente a galactose em mg/mL e posteriormente realizar uma proporcionalidade em equivalentes para a utilização dos reagentes para a síntese dos derivados aminados.

Foi realizada também, baseando-se nesta metodologia, uma curva de hidrólise com a fração KC, para monitorarmos os tempos de hidrólise da carragenana extraída da *K. alvarezii*. Para esta curva foram utilizados 50 mg de KC, que foram solubilizados em 4,5 mL de água deionizada à 90 °C, após a solubilização, a temperatura do banho foi ajustada a 65 °C e então adicionado 0,5 mL de uma solução de TFA 1 mol/L, foram então coletadas alíquotas de 0,2 mL nos tempos de 15, 30, 45 e 60 min. em triplicata, que foram analisadas através do método de DNS.

4.4 HIDRÓLISE ÁCIDA PARCIAL (HAP) DA FRAÇÃO KC E OBTENÇÃO DAS FRAÇÕES KCDR6 E KCDR1.

O processo de despolimerização baseou-se em dados publicados anteriormente por Ducatti et al. (2011) e Stevenson e Furneaux (1991). As reações foram realizadas através do cálculo da proporcionalidade dos reagentes referentes ao material inicial, onde neste tópico foi considerado a massa molar da díade de KC (408,3 g/mol) igual a 1 equivalente. A fração KC (4 g) foi solubilizado em água deionizada (360 mL) à 90 °C. Após ajuste da temperatura para 65 °C foi adicionado TFA 1 mol/L (40 mL), resultando numa concentração final de TFA de 0,1 mol/L. O tempo de reação foi de 30 minutos e então a reação foi parada em banho de gelo seguido de neutralização da reação com uma solução de NaOH (1 mol/L). Ao meio reacional foram adicionados 2,5 equivalentes de boroidreto de sódio (0,920 g), e a mistura resultante foi submetida a agitação por 2 h, seguida de neutralização com ácido acético glacial até pH 7. Parte da mistura foi purificada por meio de diálise em membrana de *cut-off* 6-8 kDa, primeiramente contra uma solução de NaCl 0,2 M e depois com contra água deionizada até completa remoção do sal, resultando na fração retida (KCDR6). A segunda parte da mistura foi purificada por meio de diálise em membrana de *cut-off* 1 kDa, resultando na fração retida (KCDR1). Após as frações serem submetidas à liofilização foram obtidos os rendimentos de KCDR6 (20,4% ou 0,408 g) e KCDR1 (22,8% ou 0,456 g).

4.5 SÍNTESE DOS DERIVADOS AMINADOS KAP, KAH, KAN, KAD, KAN1 E KAD1.

A metodologia de síntese dos derivados aminados do polissacarídeo foi baseada na reação de aminação redutiva da lactose descrita por Ducatti, (2009). A fração KC foi primeiramente hidrolisada (TFA 0,1 mol/L, 65 °C, 30 min). Após a reação, o TFA foi evaporado a pressão reduzida com auxílio de tolueno (3 vezes o volume de TFA) e então liofilizado, nesta etapa foi realizado o teste do DNS e o resultado comparado com a curva padrão de galactose, onde a quantidade em mg/mL encontrada, equivalente a galactose em mg/mL, foi definida como 1 equivalente (PM galactose = 180,15 g/mol), nestas hidrólises, em média a cada 2 g de KC foi encontrado o equivalente a 330 mg de galactose.

Para a reação com cada amina utilizada, 2 g da fração KC despolimerizada foi dissolvida em tampão borato 0,5 mol/L pH 8.2 (100 mL) e metanol (100 mL) à 55 °C. Em seguida, para cada reação foi adicionada uma amina correspondente (*N*-pentilamina, heptilamina, nonilamina ou dodecilamina), na proporção de 15 equivalentes. A reação foi submetida à agitação por 30 minutos, em seguida, foi adicionado 5 equivalentes de cianobohidreto de sódio e a mistura foi mantida sob agitação à 55 °C por 15 h. Após este período, a reação foi resfriada em temperatura ambiente, vertida em acetona (3 vol.) e centrifugada (4.000 rpm, 20 min).

O precipitado foi ressolubilizado em água deionizada e submetido à diálise (membrana 6-8 kDa ou 1 kDa), inicialmente contra NaCl 0,2 M e depois contra água deionizada até completa remoção do sal. O material foi então filtrado, utilizando filtro de papel quantitativo e liofilizado. As reações retidas em membrana de *cut-off* 6-8 kDa, deram origem as frações KAP (22,7% ou 0,454 g), KAH (18,6% ou 0,372 g), KAN (28% ou 0,560 g) e KAD (16% ou 0,320 g), que foram obtidas a partir das reações com *N*-pentilamina, heptilamina, nonilamina e dodecilamina, respectivamente. As reações retidas em membranas de *cut-off* 1 kDa, deram origem às frações KAN1 (12,5% ou 0,250 g) e KAD1 (35,7% ou 0,714 g), que foram obtidas a partir de reações com a nonilamina e dodecilamina, respectivamente.

4.6 MÉTODOS ANALÍTICOS

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) unidimensional de ^1H e ^{13}C e os mapas de correlação bidimensionais ^1H - ^{13}C *heteronuclear single-quantum correlation* (HSQC) foram adquiridos no equipamento Bruker AVANCE DRX 400 de campo magnético de 9,4 Tesla, 400 MHz para ^1H e 100 MHz para ^{13}C e Bruker AVANCE II 600 de campo magnético de 14,0 Tesla, 600 MHz para ^1H e 150 MHz para ^{13}C . As amostras foram solubilizadas em D_2O e colocadas em tubos 5 mm de diâmetro. Em cada tubo foi adicionado 1 μL de acetona como padrão interno, o tampão acetato também foi utilizado como padrão. Os deslocamentos químicos foram expressos em ppm e determinados de acordo com o padrão interno (acetona: $\delta = 2,208$ ppm para ^1H e $\delta = 32,69$ ppm para ^{13}C) e (tampão acetato: $\delta = 2,040$ ppm para ^1H e $\delta = 23,0$ ppm para ^{13}C e $\delta = 179,5$ ppm para ^{13}C). Os espectros foram processados e analisados com o auxílio do programa TOPSPIN 4.0.2.

A cromatografia de exclusão estérica de alta precisão foi realizada acoplada a detector de espalhamento de luz laser em multiângulos e índice de refração (HPSEC-MALLS/RID) no equipamento modelo Waters 2410. Foram utilizadas quatro colunas WATERS, conectadas em série, com limites de exclusão de 7×10^6 , 4×10^5 , 8×10^4 e 5×10^3 $\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$ (colunas Ultrahydrogeltm 2000, 500, 250 e 120, respectivamente). Para determinar a massa molar dos polissacarídeos, foi utilizada uma curva padrão de dextrana com massa molares (M_w) de 5×10^3 , $9,4 \times 10^3$, $17,2 \times 10^3$, $40,2 \times 10^3$, $72,2 \times 10^3$, 266×10^3 e 487×10^3 $\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$. Para as análises a fase móvel utilizada foi uma solução de nitrito de sódio 0,1 mol/L contendo azida de sódio 100 ppm/L, com fluxo controlado de 0,6 mL/min, a 25 °C, controladas por bomba WATERS 515. As amostras foram previamente filtradas em membrana Polietersulfona (PES) de 0,22 μm . Para o cálculo do dn/dc foram utilizadas cinco concentrações 1, 0,8, 0,6, 0,4 e 0,2 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ e analisadas utilizando o detector RID. Os cromatogramas foram coletados e analisados no software ASTRA versão 4.5.0 (WYATT, 1993).

As análises de infravermelho foram realizadas no Departamento de Farmácia da UFPR no espectrômetro Bruker FT-IR ALPHA, incorporado a transformada de Fourier, com acessório de reflectância total atenuada. Os resultados obtidos foram expressos em número de ondas (cm^{-1}), de acordo com

a posição das bandas de absorção observadas. Para realização das análises, as amostras utilizadas encontravam-se em estado sólido pulverizado, com o aparelho operando no modo refletivo (ATR). Os espectros obtidos foram analisados através do software OPUS Viewer 6.5 (Bruker).

As análises de composição monossacarídica foram realizadas através da cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM), e foram realizadas no cromatógrafo a gás da marca Varian 3800 (Palo Alto, USA) e espectrômetro de massas modelo Saturn 2000R. A análise cromatográfica foi realizada em coluna capilar de sílica fundida (30 m x 0,25 mm) DB-225MS (Duabond) utilizando gás hélio como gás de arraste com fluxo de 1,0 mL.min⁻¹. A temperatura inicial do forno foi de 50 °C seguindo de aumento gradual de 40 °C por minuto até 230°C. As amostras de polissacarídeos foram analisadas na forma de alditol acetato, através de uma hidrólise redutiva utilizando TFA e o complexo 4-Methylmorpholine-Borane (STEVENSON & FURNEAUX, 1991) para evitar a degradação da 3,6-anidrogactose.

Os teores de nitrogênio e carbono foram obtidos através de análise elementar por combustão, com o auxílio do analisador CHNOS, marca ELEMENTAR, modelo VARIO EL III ou Perkin Elmer CHN 2400. As análises foram realizadas utilizando entre 10 a 20 mg das amostras liofilizadas e os resultados foram obtidos em g% (g de nitrogênio ou carbono / 100 g de amostra). As análises foram realizadas no laboratório de biogeoquímica e nutrição de plantas, do Departamento de Solos e Engenharia Agrícola do Setor de Ciências Agrárias (UFPR).

A determinação de açúcar total foi realizada pelo método colorimétrico do fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS et al., 1956). As amostras em diferentes concentrações e solventes, foram adicionados 0,5 mL de fenol 5% e 2,5 mL de ácido sulfúrico concentrado. Como padrão foi utilizado uma curva com galactose em uma solução de 1 mg/mL e utilizados 10, 30, 50, 70 e 90 µL.

O teor de sulfato foi determinado através de método turbidimétrico (DODGSON, 1961) que utiliza o reativo de gelatina/cloreto de bário, TCA e a amostra hidrolisada para a determinação do teor de sulfato. O padrão utilizado foi uma solução de sulfato de sódio diluído em HCl 1 mol.L⁻¹, na concentração de 1 mg.mL⁻¹. A curva padrão foi realizada com as concentrações equivalentes a 30, 60, 90, 150 e 190 µg de sulfato de sódio.

4.7 TESTES DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

4.7.1 PREPARO DO CLORETO DE 2,3,5-TRIFENILTETRAZÓLIO (TTC)

A solução de TTC foi preparada a uma concentração de 0,125%, onde 62,5 mg de TTC foi transferido para um balão volumétrico de 50 mL e completado com água estéril q.s.p.. A solução resultante foi filtrada por membrana estéril 0,22 μm e armazenado sob proteção luminosa e refrigeração (VEIGA et al., 2019).

4.7.2 MÉTODO DE MICRODILUIÇÃO

Todos os compostos foram testados para a sua Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) contra *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) e *Escherichia coli* (ATCC 8738) (VEIGA et al., 2019).

Os ensaios foram realizados em placas de 96 poços, adicionando-se 100 μL de caldo Mueller Hinton. As amostras foram adicionadas (100 μL), previamente filtradas em membrana estéril 0,22 μm , e em seguida realizada a diluição seriada (100 μL) por sete vezes, com descarte deste volume na fileira final. Os poços foram então inoculados com volumes iguais de 10 μL da suspensão contendo o microrganismo a ser testado (turbidez 0,5 da escala de McFarland - medido através de turbidímetro de bancada). O controle negativo foi realizado com 100 μL da solução utilizada para diluição da amostra a ser testada e o controle positivo foi realizado com 100 μL da solução de cloranfenicol (250 $\mu\text{g}/\text{mL}$). As microplacas foram então incubadas por 20-22 h à 33-35 $^{\circ}\text{C}$. Após a incubação, foi adicionado em todos poços 20 μL da solução de TTC 0,125% e deixado em incubação por mais 2 h, após este processo, os poços foram lidos no leitor de microplacas (Multiscan FC) a 540 nm com agitação prévia de 15 s. O valor de CIM foi determinado como sendo a menor concentração do composto testado onde houve completa inibição do crescimento do microrganismo (VEIGA et al., 2019).

Os valores de CBM foram determinados transferindo 100 μL dos poços que apresentaram completa inibição, para uma placa de ágar Mueller Hinton.

Estas placas foram incubadas por 20-22 h à 33-35 °C e as menores concentrações testadas que mataram 99,9% dos microrganismos foram definidos como os valores de CBM.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO POLISSACARÍDEO DA ALGA VERMELHA *Kappaphycus alvarezii*.

A alga marinha *K. alvarezii* seca e moída foi submetida a extração com tampão fosfato 0,02 mol/L, pH 7,2 à 65 °C. Após a centrifugação, os polissacarídeos foram precipitados com etanol (3 vol.), recolhidos através de filtração e centrifugação, e então, ressolubilizados em água deionizada. A solução resultante foi dialisada sequencialmente contra água deionizada, solução de NaCl 0,2 mol/L e água deionizada. A diálise contra solução de cloreto de sódio foi realizada para que o íon Na⁺ fosse o contra-íon predominante do polissacarídeo, pois desse modo as carragenanas apresentam uma solubilidade maior em água comparadas a outras formas salinas, como por exemplo a potássica. Após liofilização foi obtida a fração KC com um rendimento de 50% (20 g) em relação ao peso da alga seca e moída (40 g), valor próximo ao reportado para outras extrações realizadas em nosso laboratório (ARAÚJO, 2012; SANTOS, 2015).

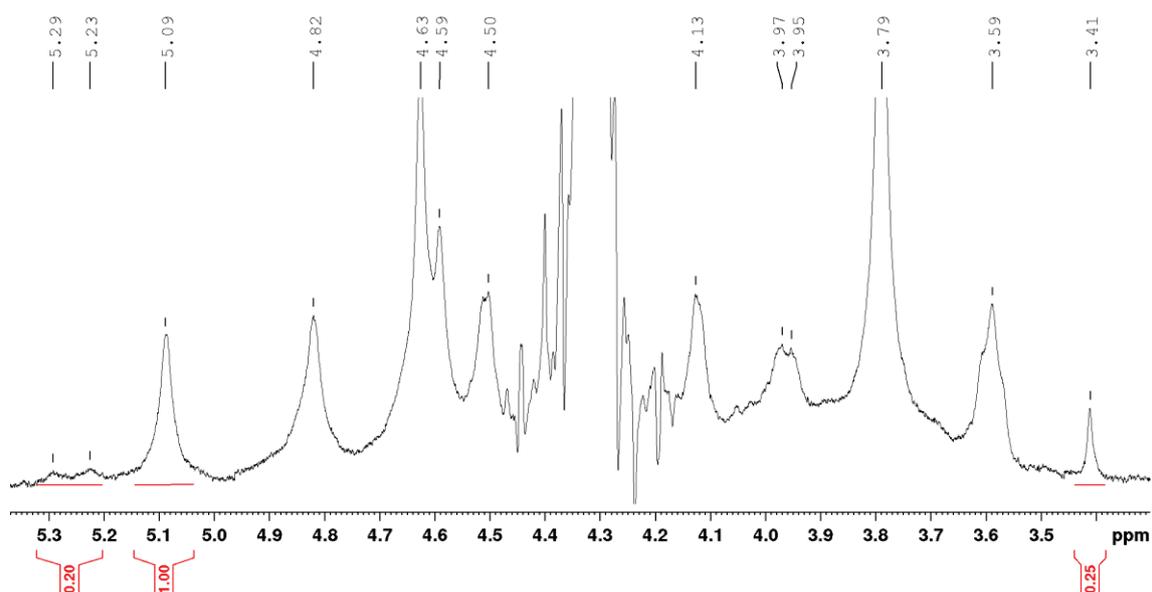
A análise da composição monossacarídica realizada por GC-EM da fração KC indicou a presença de galactose e 3,6-anidro-galactose como principais monossacarídeos constituintes, numa proporção de 59,1 e 38,1 mol%, respectivamente (TABELA 3). Também foi observada, em baixa porcentagem a presença dos monossacarídeos metilados 2-O-Metil-3,6-anidro-galactose e 6-O-metil-galactose. A presença de sulfato também foi quantificada e é compatível com a proporção de sulfato correspondente a extrações da κ-carragenana, sendo em cerca de 23,4% (DE ARAÚJO et al., 2013; NECAS; BARTOSIKOVA, 2013). A análise elementar demonstrou as porcentagens: C% 27.00, H% 5.03, N%, 0.05.

TABELA 3 – COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA, RENDIMENTO, DOSAGEM DE SULFATO E MASSA MOLAR PONDERAL MÉDIA (MW) DA FRAÇÃO KC.

Amostra	Composição monossacarídica (%mol) ^a					Rend. (%) ^b	Sulfato (%SO ₄) ^c	Mw (g/mol) ^d
	2-Me- AnGal	AnGal	6-Me- Gal	Gal	Glc			
KC	0.6	38.1	0.9	59.1	1.2	50	23.38	487.800

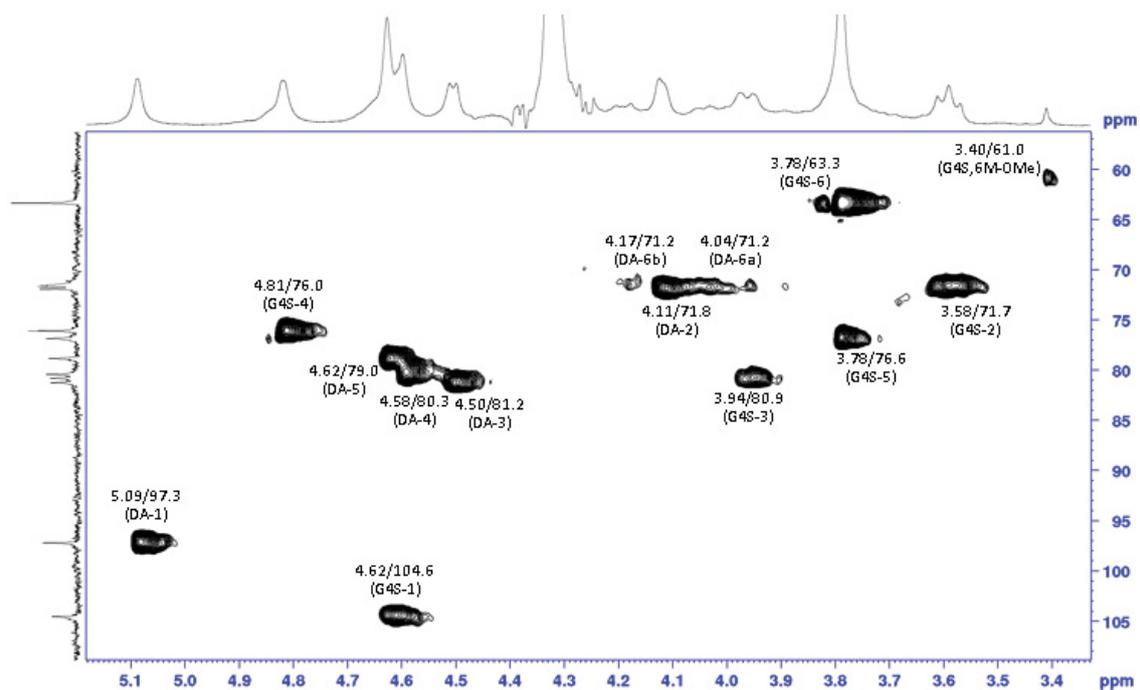
a) Análise realizada após hidrólise ácida redutiva total (STEVENSON; FURNEAUX, 1991). Gal= galactose, AnGal= 3,6-anidro-galactose, 2-Me-AnGal = 2-O-metil-3,6-anidro-galactose, 6-Me-Gal = 6-O-metil-galactose e Glc = glucose); b) Rendimento referente a massa dos polissacarídeos ou alga iniciais; c) Dosagem de sulfato realizado através da metodologia de Dodgson, (1961); d) Calculado a partir da análise realizada por HPSEC-MALLS-RID e $dn/dc = 0,102 \text{ mL/g}$

Na análise da fração KC por RMN de ¹H, foi observado (FIGURA 3) o sinal em 5,09 ppm, referente ao H1 da unidade de 3,6-anidro- α -D-Galp ligada a β -D-Galp-4-sulfato, formando a díade referente à *Kappa*-carragenana. Foi observado também os deslocamentos em 5,29 ppm e 5,23 ppm, referentes aos sinais anoméricos das unidades de 3,6-anidro- α -D-Galp 2-sulfato ligada a β -D-Galp 4-sulfato e α -D-Galp 6-sulfato ligada a β -D-Galp 4-sulfato, estas díades correspondem a *lota*-carragenana e *mu*-carragenana, respectivamente. O sinal em 3,41 ppm foi atribuído ao grupo metil (-CH₃) substituindo C6 da unidade de β -D-Galp do polissacarídeo (VAN DE VELDE et al., 2002). Os sinais anoméricos das unidades alfa foram integrados e o teor das díades de carragenanas presentes no polissacarídeo da fração KC foi estimado (TABELA 4), indicando que a fração é constituída por um híbrido *Kappa-mu-lota*-carragenana, sendo a κ -carragenana o principal constituinte, com aproximadamente 80% da composição.

FIGURA 3 - ESPECTRO DE RMN-¹H DA FRAÇÃO KC.

Realizado a 70°C em D₂O, padrão interno acetona $\delta = 2,208$ ppm.

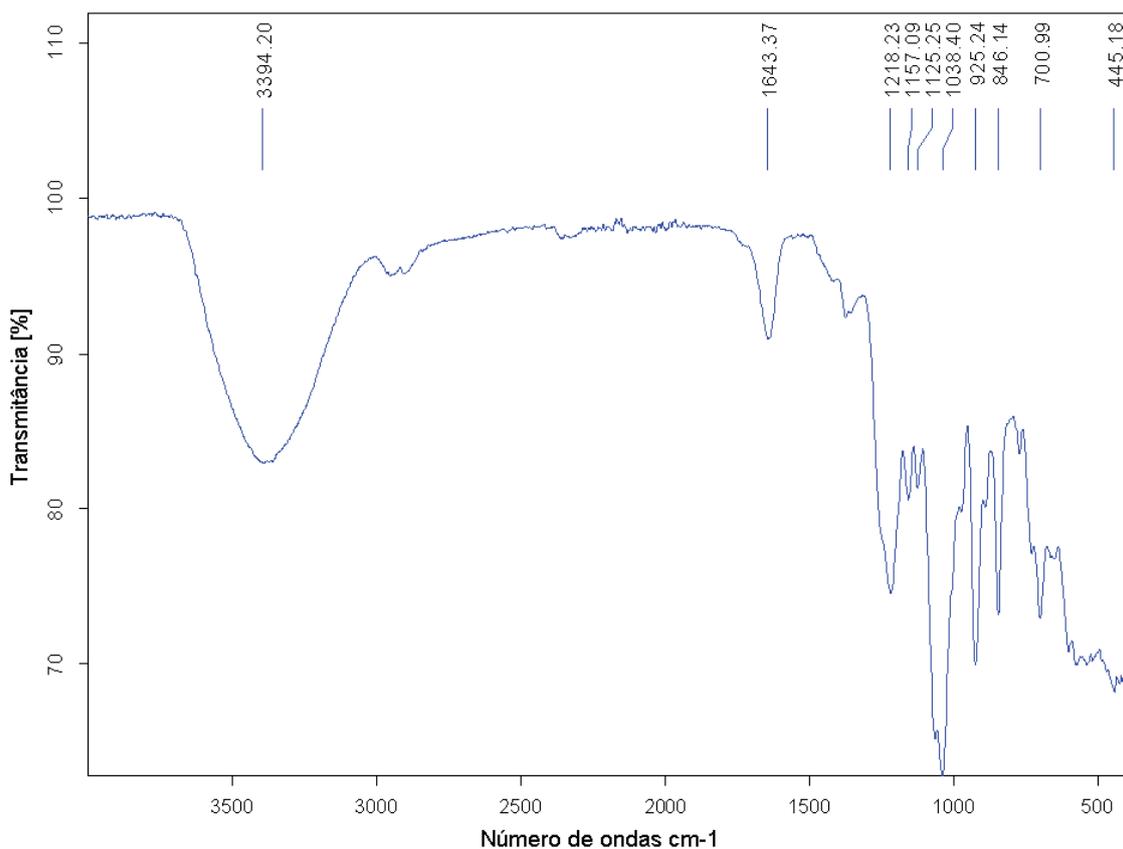
A fração KC foi também analisada por RMN de HSQC (FIGURA 4) onde foram observadas as correlações em 5,09/97,3 e 4,63/104,6 ppm, atribuídas a H1/C1 das unidades de 3,6-anidro- α -D-Galp e a β -D-Galp-4-sulfato respectivamente. Estas correlações são correspondentes à díade da *Kappa*-carragenana, a principal díade constituinte do híbrido. Não foram observados os sinais das carragenanas *mu*- e *lota*-carragenana no espectro de HSQC (VAN DE VELDE et al., 2002).

FIGURA 4 - MAPA DE CORRELAÇÃO DE ^1H - ^{13}C HSQC DA FRAÇÃO KC.

Realizado a 70°C em D_2O , padrão interno acetona $\delta = 2,208$ ppm para ^1H e $\delta = 32,69$ ppm para ^{13}C . Código de letras baseada na nomenclatura desenvolvida por Knutsen et al. (1994). G4S = β -D-Galp-4-sulfato, DA=3,6-anidro- α -D-Galp. Números indicam a posição no anel.

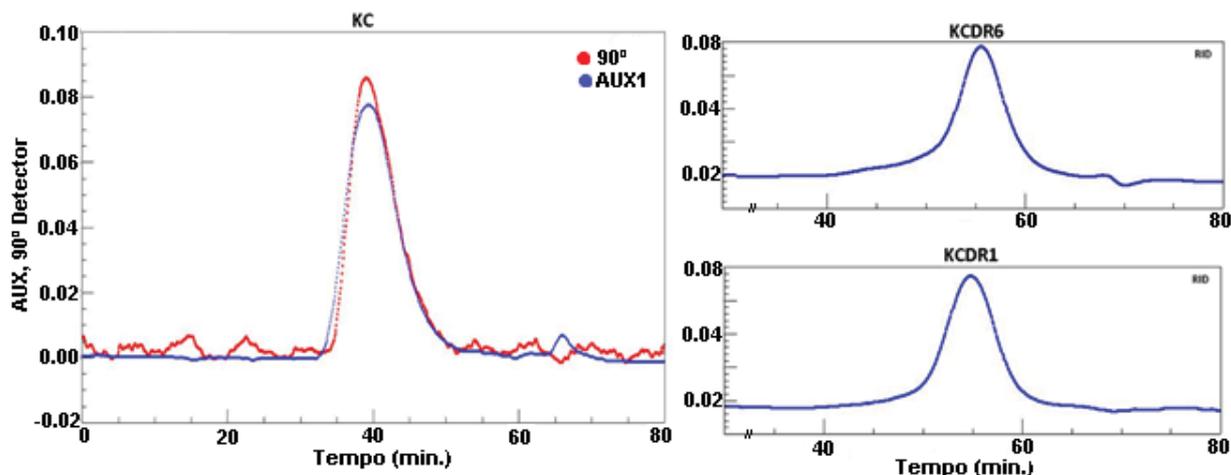
Na análise do espectro de infravermelho da fração KC (FIGURA 5), foi observado as bandas de estiramento em 846 cm^{-1} referente (vibração C4-O-S) a β -D-Galp-4-sulfato e 930 cm^{-1} referente (vibração C-O-C) a ponte da 3,6-anidro-D-Galp, similar ao reportado na literatura para a κ -carragenana (SEKKAL et al., 1993; PEREIRA; GHEDA; RIBEIRO-CLARO, 2013).

FIGURA 5 – ESPECTRO DE FTIR DA FRAÇÃO KC.



O cromatograma da fração KC, obtido por cromatografia de exclusão estérica (HPSEC-MALLS-RID), indicou um perfil homogêneo com tempo de retenção de 39.2 minutos no detector de índice de refração (RID) (FIGURA 6). Após calcular o valor de dn/dc (0.102 mL/g), foi possível calcular o valor de $M_w = 487.800$ g/mol, calculado a partir da equação de Rayleigh-Debye-Gans.

FIGURA 6 - CROMATOGRAMAS DE KC, KCDR6 E KCDR1 OBTIDOS POR CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO ESTÉRICA (HPSEC-MALLS-RID).



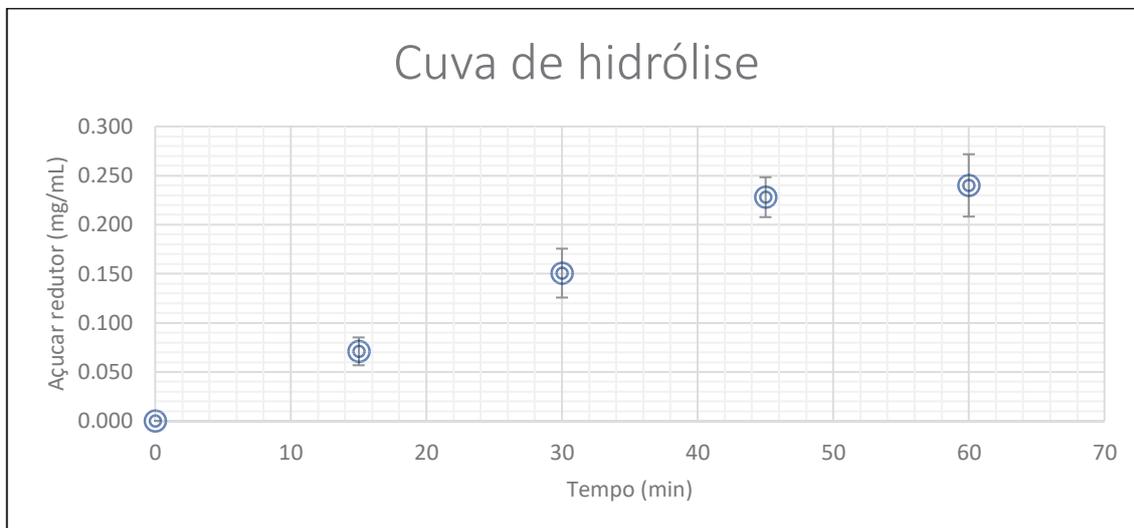
5.2 HIDRÓLISE ÁCIDA PARCIAL (HAP) DA FRAÇÃO KC.

A fração KC foi submetida a hidrólise ácida parcial para produzir fragmentos polissacarídicos de menor massa molar, os quais pudessem ser modificados seletivamente na extremidade redutora por meio de reações de aminação redutiva com alquilaminas, a fim de obter polissacarídeos com potencial atividade antimicrobiana. Alguns estudos demonstraram que oligossacarídeos obtidos a partir da κ -carragenana apresentam uma maior atividade antimicrobiana que o polissacarídeo nativo de alto peso molecular (YAMASHITA; KONISHI; SHIMIZU, 2001; WANG et al., 2011a).

Através da HAP é possível realizar uma quebra seletiva das ligações alfa-glicosídicas envolvendo as unidades de 3,6-anidro- α -D-galactopiranosse, dessa forma, são obtidos oligossacarídeos ou fragmentos de baixa massa molar contendo a unidade anidra no terminal redutor. É importante destacar que na HAP da *Kappa*-carragenana os grupos sulfato são substancialmente mantidos (USOV; ELASHVILI, 1991; GONÇALVES et al., 2005). Inicialmente, a fração KC foi submetida à HAP utilizando TFA 0,1 mol/L a 65 °C em escala analítica com intuito de construir uma curva de hidrólise para identificar os melhores tempos para se produzir os fragmentos polissacarídicos. A extremidade redutora foi monitorada através do teste do dinitrosalicilato (DNS) em diversos tempos de hidrólise (15, 30, 45 e 60 minutos) conforme exibido na FIGURA 7, onde foi observado que nos tempos de 15, 30 e 45 minutos houve um aumento gradativo

da quantidade (mg/mL) de terminais redutores, contudo entre 45 e 60 minutos houve uma estabilização destas quantidades.

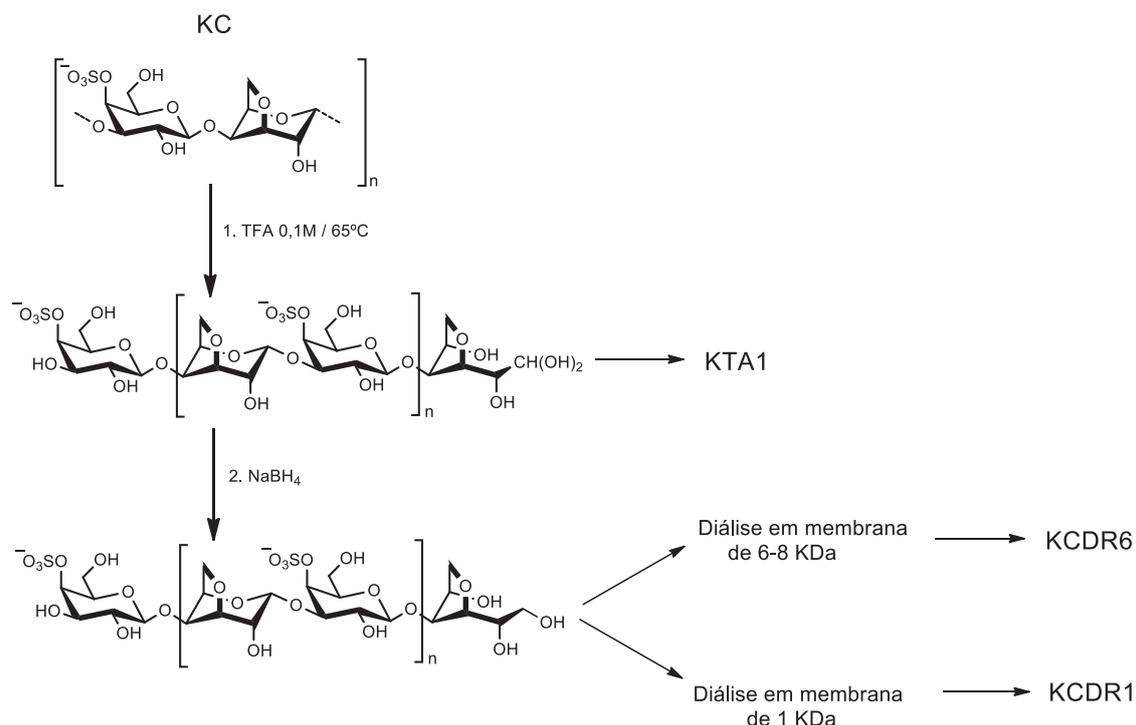
FIGURA 7 - CURVA DE HIDRÓLISE ÁCIDA PARCIAL DA FRAÇÃO KC.



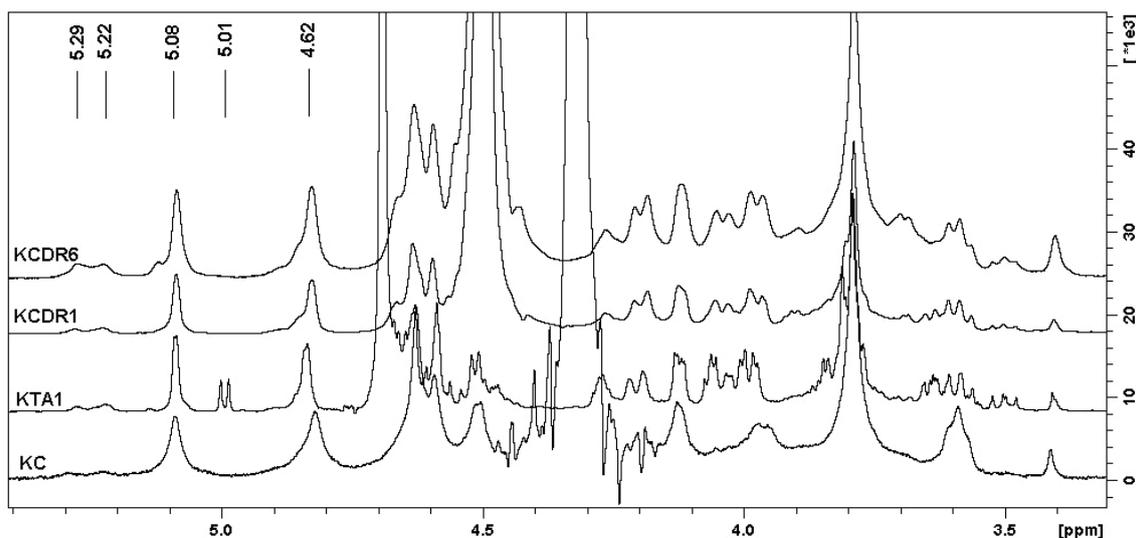
Reação realizada com 0,1 mol/L TFA, 65 °C. Terminais redutores quantificados pelo método colorimétrico de DNS (Ácido 3,5-dinitrosalicílico).

Para a produção das frações de menor massa molar a partir da fração KC, foi escolhido o tempo de 30 minutos da curva de hidrólise, pois neste tempo foi possível verificar um aumento significativo dos terminais redutores (FIGURA 7). Com o objetivo de produzir frações de menor massa molar e sem o grupamento amino no terminal redutor, foram produzidos fragmentos polissacarídicos contendo a unidade de 3,6-anidro-galactitol no terminal redutor (ESQUEMA 10). Dessa forma, após a hidrólise de KC em maior escala, a solução foi neutralizada e reduzida com boroidreto de sódio. Para verificar se a reação de hidrólise havia ocorrido, foi retirada uma alíquota antes da etapa de redução, a qual foi denominada de KTA1. A fração reduzida foi em seguida dividida em duas partes e purificada utilizando membranas de diálise. Parte do hidrolisado foi retido por uma membrana de *cut-off* 6-8 kDa, gerando a fração KCDR6, e a outra parte, em uma membrana de *cut-off* 1 kDa, gerando a fração KCDR1. É importante destacar que antes da redução com boroidreto de sódio, a amostra possuía o terminal dos fragmentos polissacarídicos em sua forma redutora, e por este motivo poderiam ser utilizados para as reações de aminação redutiva.

ESQUEMA 10 - FLUXOGRAMA DO PROCEDIMENTO PARA A OBTENÇÃO DAS FRAÇÕES POLISSACARÍDICAS KCDR6 E KCDR1 POR HAP.



As frações KTA1, KCDR6 e KCDR1 foram analisadas através de RMN de ^1H (FIGURA 8). Para KTA1 foi observado um duplete ($J_{1,2} = 6,0 \text{ Hz}$) em 5,01 ppm, que foi atribuído ao H1 da unidade de 3,6-anidro-D-galactose na sua forma de diol geminal (aldeído hidratado) (MILLER; WONG; NEWMAN, 1982; DUCATTI et al., 2011) indicando que a hidrólise ácida parcial quebrou seletivamente as ligações alfa-glicosídicas da unidade de 3,6-anidro-Galp. No espectro das frações KCDR6 e KCDR1 este duplete não foi observado, indicando a conversão do terminal redutor da unidade de 3,6-anidro-D-galactose no seu derivado alditol, o que demonstra que a redução com boroidreto de sódio foi eficaz. Foram observados em todas as frações a presença de sinais alfa-anoméricos em 5,09, 5,22 e 5,29 ppm correspondentes as unidades de 3,6-anidro- α -D-Galp, α -D-Galp-6-sulfato e 3,6-anidro- α -D-Galp-2-sulfato, respectivamente (VAN DE VELDE et al., 2002). Estes dados indicaram que a hidrólise ácida parcial foi eficiente na produção de frações contendo fragmentos polissacarídicos do híbrido *Kappa-mu-lota-carragenana* presente em KC.

FIGURA 8 - ESPECTRO DE RMN-¹H DAS FRAÇÕES KC, KTA1, KCDR1 E KCDR6.

Espectro de ¹H da fração KC realizado a 70 °C, KTA1 a 30 °C, KCDR1 e KCDR6 a 50 °C, em D₂O, padrão interno acetona δ= 2,208 ppm. KC= amostra nativa, KTA1= intermediário aldeído hidratado, KCDR1= despolimerizado retido em membrana de 1kDa e KCDR6= despolimerizado retido em membrana de 6-8 kDa.

Através da integração dos sinais alfa-anoméricos no espectro de RMN de ¹H das frações, foi possível quantificar as proporções das díades *Kappa*, *Iota* e *mu* carragenanas (TABELA 4), sendo possível verificar uma composição semelhante de díades entre as frações.

TABELA 4 - PERCENTAGEM DAS DÍADES *KAPPA*-, *MU*- E *IOTA*- ENCONTRADAS NAS CARRAGENANAS DE KC, KCDR6 E KCDR1.

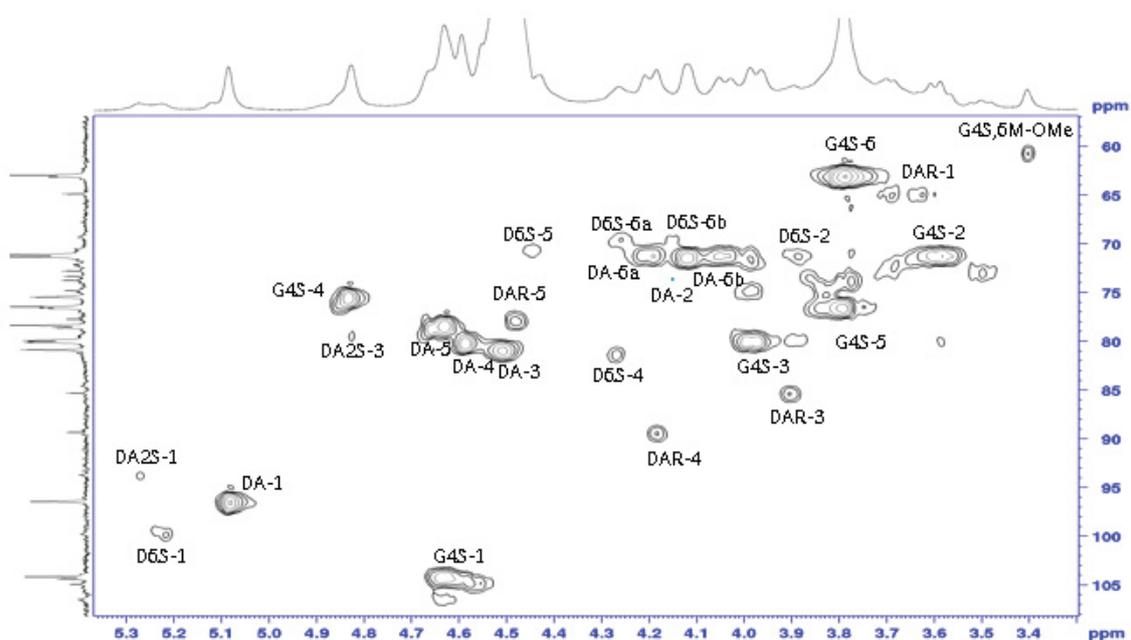
	KC	KCDR6	KCDR1
<i>Kappa</i> ^a	80	75	73
<i>mu</i>	11	14	15.7
<i>Iota</i>	9	11	11.3

a) Calculado a partir da integração do sinal em 5,09, 5,22, 5,29 ppm referentes a ¹H das unidades de 3,6-anidro- α -D-Galp, α -D-Galp 6-sulfato e 3,6-anidro- α -D-Galp 2-sulfato pertencentes às díades de *Kappa*-, *mu*- e *Iota*-carragenana.

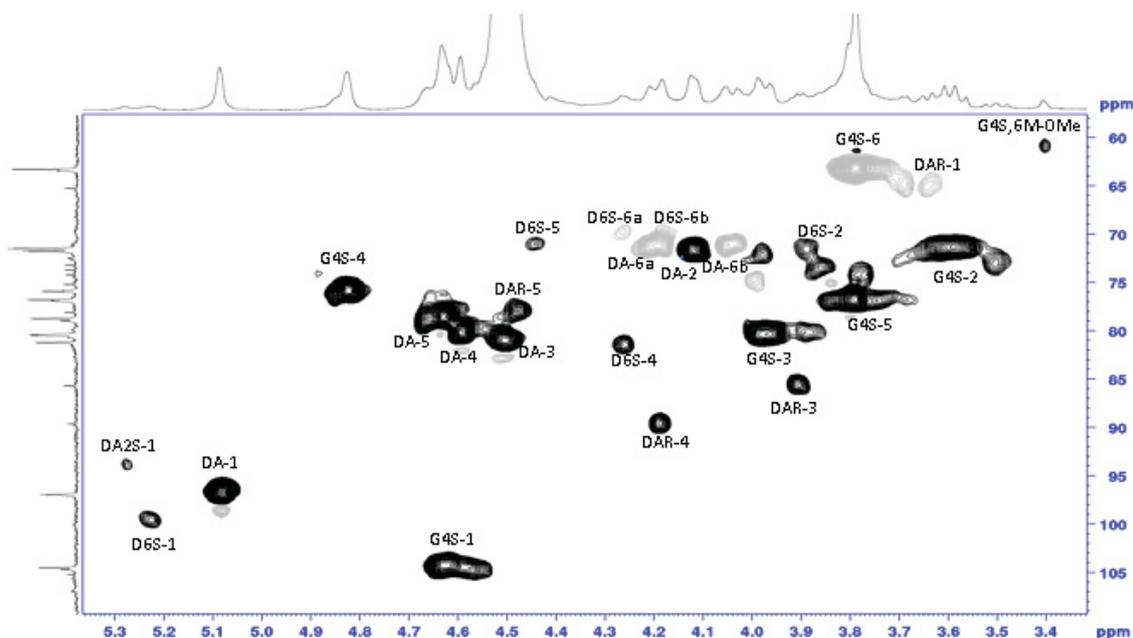
As frações KCDR6 e KCDR1 foram analisadas também por RMN de ¹H-¹³C HSQC (FIGURA 9 e 10), onde foram observadas as correlações em 3,68-3,63/65,1, 3,90/85,25 e 4,18/89,54 ppm, correspondentes a H1/C1, H3/C3, H4/C4 da unidade de 3,6-anidrogactitol, respectivamente (DUCATTI, 2009; FIGUEIREDO, 2013). A partir deste experimento de RMN também foi possível caracterizar os sinais das díades de carragenanas menores constituintes, que

não aparecem no mapa de correlação da fração KC (FIGURA 4). Deste modo as díades das carragenanas menores constituintes, *lota*- e *mu*- presentes nestas duas frações foram assinaladas, com suas correlações anoméricas H1/C1 em 5,27/93,83 e 5,22/99,6 ppm, respectivamente (VAN DE VELDE et al., 2002). O aparecimento dos sinais nestas frações se deve provavelmente pela diminuição da viscosidade da amostra e conseqüente aumento da resolução do mapa de correlação de HSQC. Outra possibilidade que não deve ser descartada é a maior resistência das unidades de α -D-Galp 6-sulfato e 3,6-anidro- α -D-Galp 2-sulfato à hidrólise ácida parcial (GONÇALVES et al., 2005). Os assinalamentos das unidades alfa nas díades de *lota*- e *mu*-carragenana podem ser encontradas na TABELA 5.

FIGURA 9 - MAPA DE CORRELAÇÃO ^1H - ^{13}C HSQC DA FRAÇÃO KCDR6.



Realizado a 30 °C em D_2O , padrão interno acetona $\delta = 2,208$ ppm para ^1H e $\delta = 32,69$ ppm para ^{13}C . Código de letras baseada na nomenclatura desenvolvida por Knutsen et al. (1994). G4S = β -D-Galp-4-sulfato, DA=3,6-anidro- α -D-Galp, DA2S=3,6-anidro- α -D-Galp 2-sulfato, DAR = 3,6-anidro- α -D-Galactitol, D6S = α -D-Galp-6-sulfato. Números indicam a posição no anel.

FIGURA 10 - MAPA DE CORRELAÇÃO ^1H - ^{13}C HSQC-EDITADO DA FRAÇÃO KCDR1.

Realizado a 50 °C em D_2O , padrão interno acetona $\delta = 2,208$ ppm para ^1H e $\delta = 32,69$ ppm para ^{13}C . Código de letras baseada na nomenclatura desenvolvida por Knutsen et al. (1994). G4S = β -D-Galp-4-sulfato, DA=3,6-anidro- α -D-Galp, DA2S=3,6-anidro- α -D-Galp 2-sulfato, DAR = 3,6-anidro- α -D-Galactitol, D6S = α -D-Galp-6-sulfato. Números indicam a posição no anel.

TABELA 5 - DESLOCAMENTOS QUÍMICOS (PPM) DE ^1H E ^{13}C DAS DÍADES OBSERVADAS EM KCDR6.

<i>Unidade</i>	H1/C1	H2/C2	H3/C3	H4/C4	H5/C5	H6a/C6a	H6b/C6b
DA	5,09	4,11	4,50	4,58	4,62	4,04	4,17
	97,3	71,8	81,2	80,3	79,0	71,2	71,2
G4S	H1/C1	H2/C2	H3/C3	H4/C4	H5/C5	H6a/C6a	H6b/C6b
	4,62	3,58	3,94	4,81	3,78	3,78	-
D6S	104,6	71,7	80,9	76,0	76,6	63,3	-
	H1/C1	H2/C2	H3/C3	H4/C4	H5/C5	H6a/C6a	H6b/C6b
DA2S	5,27	-	-	-	-	-	-
	93,83	-	-	-	-	-	-

Código de letras baseada na nomenclatura desenvolvida por Knutsen et al. (1994). G4S = β -D-Galp-4-sulfato, DA=3,6-anidro- α -D-Galp, DA2S=3,6-anidro- α -D-Galp 2-sulfato, D6S = α -D-Galp-6-sulfato. Números indicam a posição no anel.

As frações KCDR6 e KCDR1 foram analisadas por cromatografia de exclusão estérica em HPSEC-MALLS-RID (FIGURA 6). Para a análise da massa molar foi utilizado o índice de refração (RID), que indicou um perfil homogêneo para ambas as frações com tempo de retenção de 55,58 e 54,75 minutos para KCDR6 e KCDR1, respectivamente. Através da curva de calibração com

dextrana foi possível estimar a massa molar para estas frações em 8.758 g/mol e 11.511 g/mol, respectivamente. Em comparação com a fração KC com tempo de retenção de 39.2 min e ($M_w = 487.800$ g/mol), estas frações se mostraram bem menores. Deste modo, foi observado que a fração KCDR1 apresentou uma maior massa molar, isso se deve provavelmente pela maior dificuldade do polissacarídeo em sair da membrana de diálise, retendo tanto os polissacarídeos de massa molar menores (em comparação com os retidos na membrana de 6 kDa), quanto dificultando a saída aleatória dos polissacarídeos de maiores massas molares.

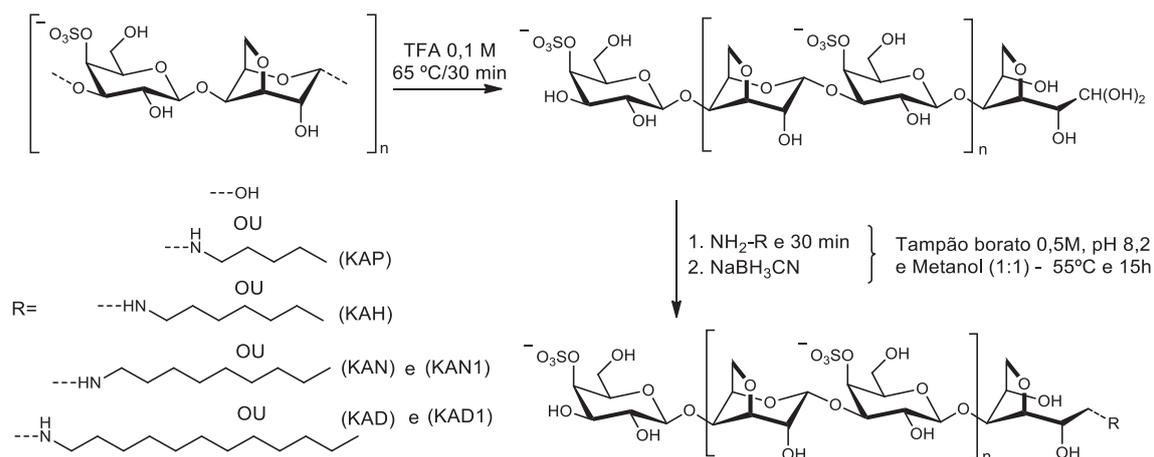
5.3 INSERÇÃO DE GRUPOS ALQUILAMINA NOS FRAGMENTOS POLISSACARÍDICOS POR REAÇÃO DE AMINAÇÃO REDUTIVA

Visando melhorar a atividade antimicrobiana das frações de baixa massa molar derivadas da fração KC, foi proposta a inserção de grupamentos alquilamina aos seus terminais redutores. Estes grupamentos foram inseridos utilizando reações de aminação reductiva entre a 3,6-anidro-galactose presente no terminal redutor e diferentes aminas. Dessa forma, um grupo amina seria inserido juntamente com o grupamento hidrofóbico. A inserção de grupamentos semelhantes se mostraram eficazes para o aumento da atividade antimicrobiana de dextransas e ciclodextrinas (YAMAMURA et al., 2014; TUCHILUS et al., 2017).

Com o intuito de se obter uma boa quantidade de terminais redutores, a fração KC foi submetida a hidrólise ácida parcial (30 minutos, TFA 0,1 mol/L, 65 °C). A solução hidrolisada foi evaporada a pressão reduzida com o auxílio de tolueno e depois liofilizada (ESQUEMA 11). Em seguida, a fração polissacarídica hidrolisada foi submetida a aminação reductiva com diferentes aminas na presença do tampão borato de sódio 0,5 mol/L, pH 8,2 em metanol (1:1 v/v), conforme descrito por Ducatti (2009). Após a adição da amina, a mistura foi agitada por um período de 30 minutos para permitir a reação do grupo amino com o terminal redutor, e logo em seguida foi adicionado o cianoboroidreto de sódio. A solução resultante foi agitada magneticamente por 15 h. A purificação foi realizada através da precipitação dos produtos em acetona (3 vol.) seguida de centrifugação. O material resultante foi então submetido à diálise em membrana de 6-8 kDa ou 1 kDa, primeiramente contra uma solução de NaCl 0,2

mol/L e depois contra água deionizada. As membranas de 6-8 kDa e 1 kDa foram escolhidas para se investigar qual seria a melhor membrana para se obter o material quimicamente modificado, além de verificar as diferenças atingidas no produto através dos diferentes tamanhos retidos.

ESQUEMA 11 – HIDROLISE ÁCIDA PARCIAL DA FRAÇÃO KC SEGUIDA DA REAÇÃO DE AMINAÇÃO REDUTIVA.



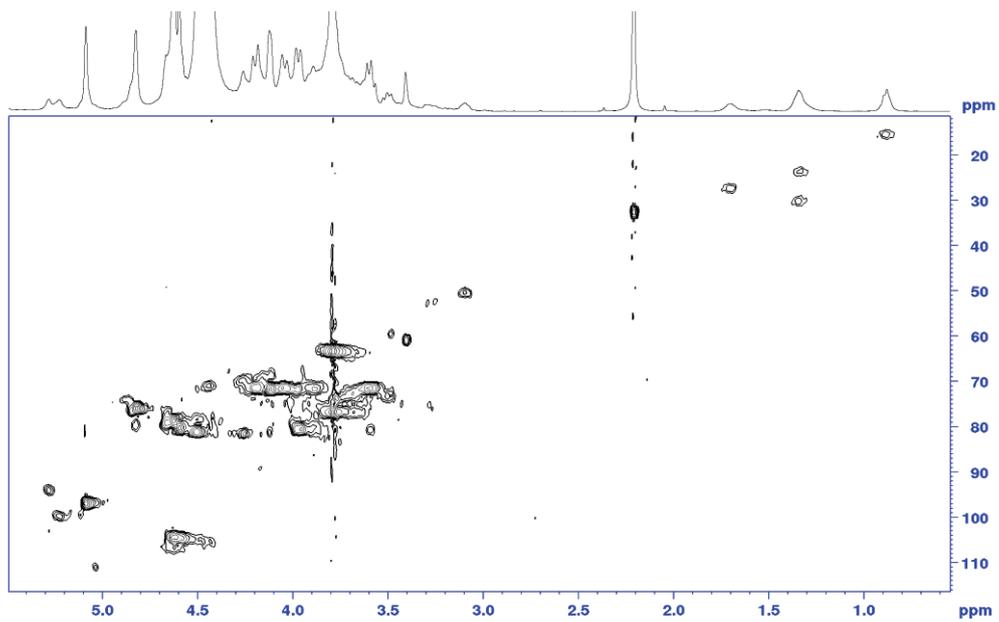
Foram realizadas as reações utilizando as quatro aminas presentes no ESQUEMA 11, sendo elas a *N*-pentilamina, heptilamina, nonilamina e dodecilamina. As frações obtidas a partir das reações de aminação redutiva utilizando estes compostos e purificadas em membrana de 6-8 kDa foram denominadas de KAP, KAH, KAN e KAD, respectivamente. As frações obtidas das reações utilizando as aminas nonilamina e dodecilamina também foram purificadas em membrana de 1 kDa sendo denominadas KAN1 e KAD1. Estas frações foram analisadas por RMN de ^1H - ^{13}C HSQC (FIGURAS 11,12,13,14, 15 e 16). A correlação referente a C1/H1 da unidade de 1-desóxi-1-amino-3,6-anidro-D-galactose ligado aos grupos hidrofóbicos foram observados na faixa de 3,15-3,31/52,2 ppm para todas as frações. Também foi possível observar a correlação em 3,09/50,3 ppm, correspondente ao grupo metileno ($-\text{CH}_2-$) da cadeia alquila diretamente ligada ao átomo de nitrogênio, este deslocamento químico sendo típico de amina secundária. Ainda, a ausência de sinal na região de 2,97/41,8 ppm, correspondentes ao grupo metileno ($\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_n-\underline{\text{CH}_2}-\text{NH}_2$), de amina primária, indicaram que o método de purificação foi eficiente em eliminar o excesso de alquilamina do produto. Os deslocamentos químicos referentes à ligação da cauda alquila, para cada fração, estão indicados na TABELA 6.

Estruturas similares foram utilizadas como referência para o assinalamento (LATGE et al., 1991; YAMAMURA et al., 2014), onde estes resultados sugerem a efetiva ligação dos grupamentos hidrofóbicos em todas as frações obtidas, não sendo encontrados sinais referentes ao derivado reduzido alditol.

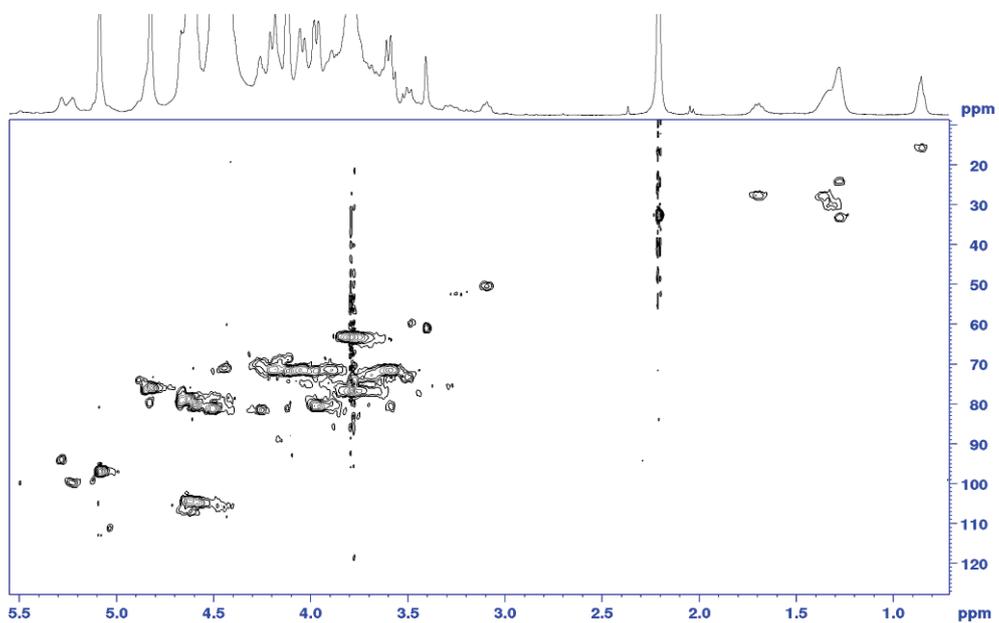
TABELA 6 - DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DE ^1H E ^{13}C DAS FRAÇÕES KAP, KAH, KAN, KAD, KAN1 E KAD1.

	H1/C1^a	$\text{H1'/C1}'^b$	$\text{H2'/C2}'^b$	$\text{H3'/C3}'^a$	$\text{H4'/C4}'^b$	$\text{H5'/C5}'^b$
KAP	3,15- 3,31	3,09	1,70	1,33/1,34		0,87
	52,2	50,3	27,3	23,6/30,1		15,5
	H1/C1^a	$\text{H1'/C1}'^b$	$\text{H2'/C2}'^b$	$\text{H3'/C3}'^a$	$\text{H6'/C6}'^b$	$\text{H7'/C7}'^b$
KAH	3,15- 3,31	3,09	1,69	1,27/1,36/1,31/1,27		0,85
	52,2	50,3	27,7	24,1/27,8/30,1/33,2		15,7
	H1/C1^a	$\text{H1'/C1}'^b$	$\text{H2'/C2}'^b$	$\text{H3'/C3}'^a$	$\text{H8'/C8}'^b$	$\text{H9'/C9}'^b$
KAN e KAN1	3,15- 3,31	3,09	1,69	1,26/1,35/1,28/1,25		0,85
	52,2	50,3	27,6	24,1/27,7/30,6/33,5		15,6
	H1/C1^a	$\text{H1'/C1}'^b$	$\text{H2'/C2}'^b$	$\text{H3'/C3}'^a$ $\text{H11'/C11}'^b$	$\text{H12'/C12}'^b$	
KAD e KAD1	3,15- 3,31	3,09	1,70	1,25/1,37/1,27		0,85
	52,2	50,3	27,5	24,6/27,9/31,0		15,9

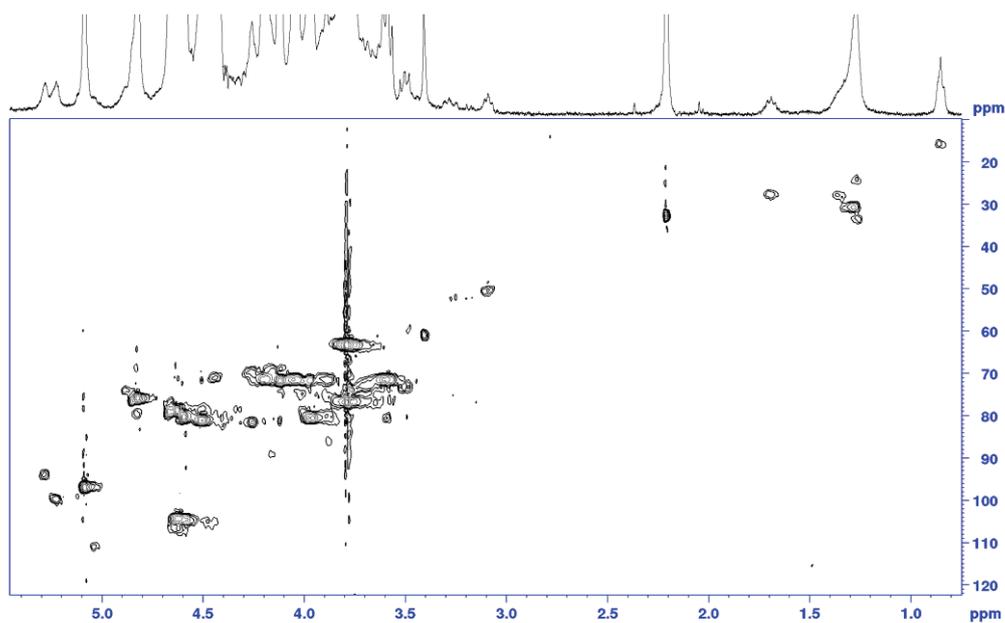
a) Referente ao hidrogênio e carbono ligado ao polissacarídeo b) Referente ao hidrogênio e carbono da cauda alquila.

FIGURA 11 - MAPA DE CORRELAÇÃO ^1H - ^{13}C HSQC DA FRAÇÃO KAP.

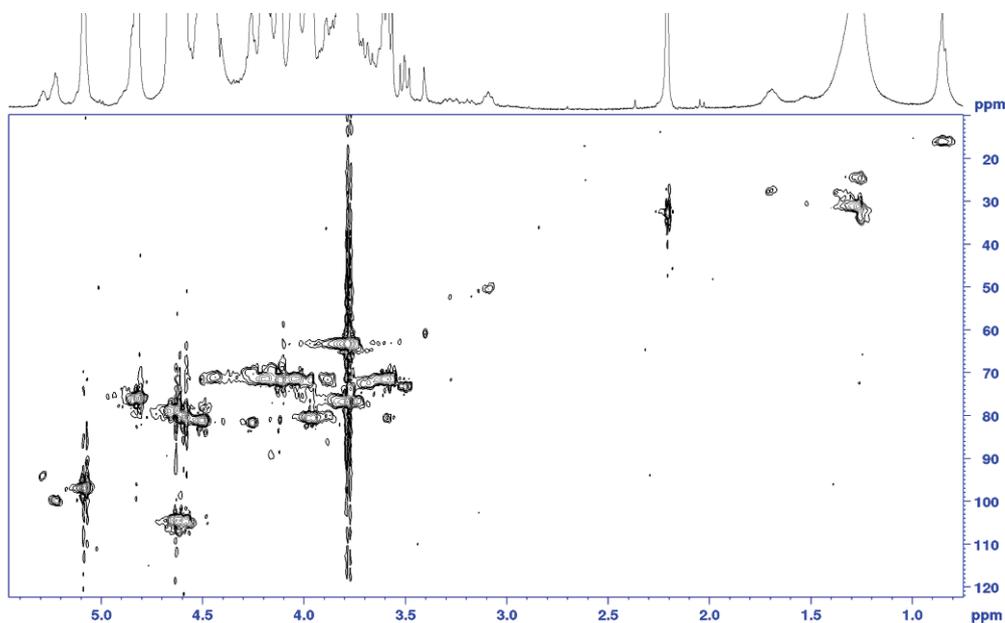
Mapa de correlação de HSQC realizado a 50 °C em D_2O , padrão interno acetona $\delta= 2,208$ ppm para ^1H e $\delta= 32,69$ ppm para ^{13}C , pH= 7.

FIGURA 12 - MAPA DE CORRELAÇÃO ^1H - ^{13}C HSQC DA FRAÇÃO KAH.

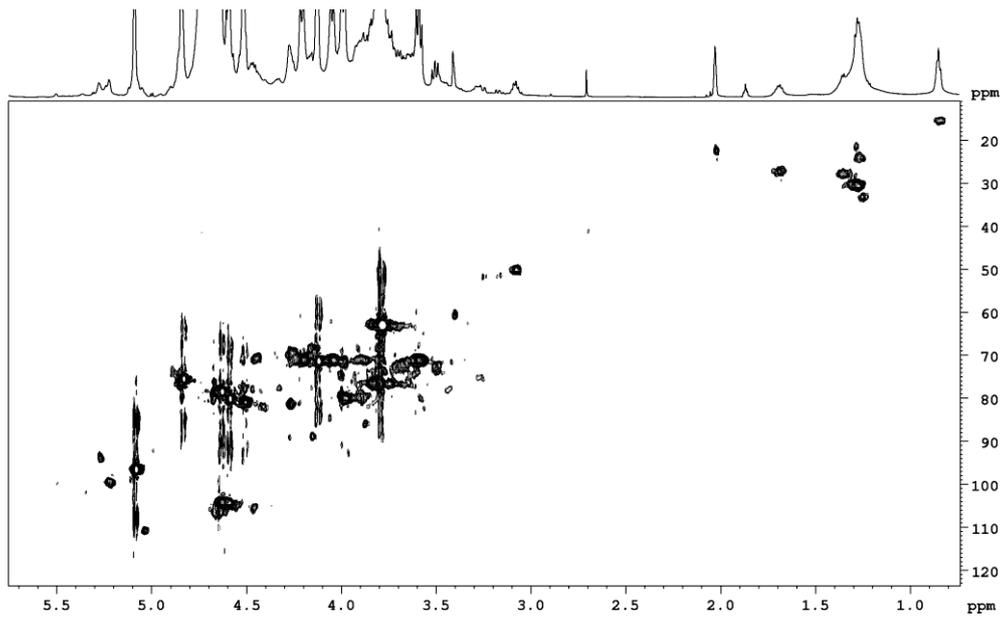
Mapa de correlação de HSQC realizado a 50 °C em D_2O , padrão interno acetona $\delta= 2,208$ ppm para ^1H e $\delta= 32,69$ ppm para ^{13}C , pH= 7.

FIGURA 13 - MAPA DE CORRELAÇÃO ^1H - ^{13}C HSQC DA FRAÇÃO KAN.

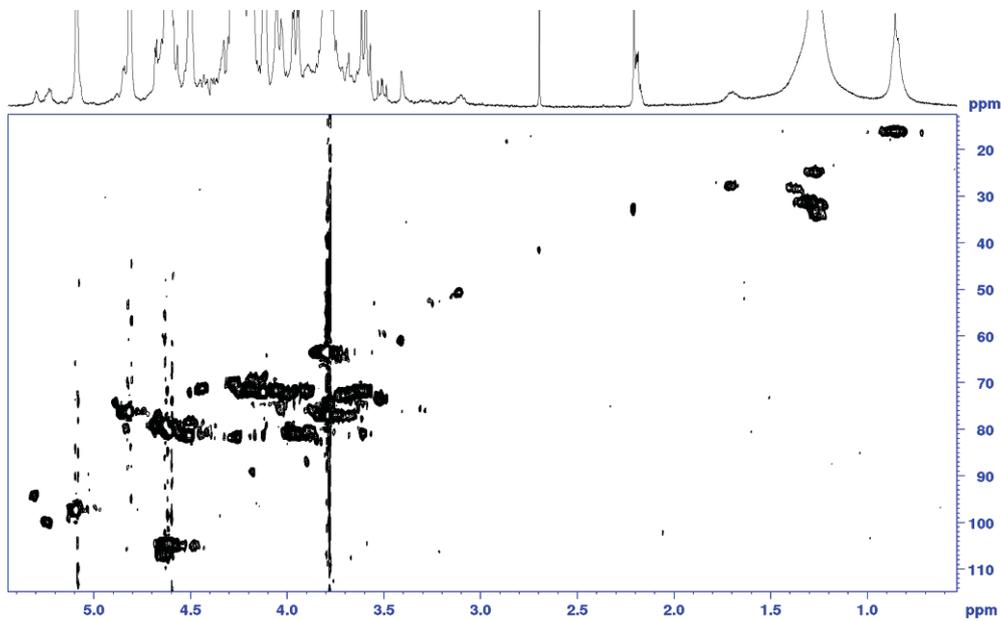
Mapa de correlação de HSQC realizado a 50 °C em D_2O , padrão interno acetona $\delta = 2,208$ ppm para ^1H e $\delta = 32,69$ ppm para ^{13}C , pH= 7.

FIGURA 14 - MAPA DE CORRELAÇÃO ^1H - ^{13}C HSQC DA FRAÇÃO KAD.

Mapa de correlação de HSQC realizado a 50 °C em D_2O , padrão interno acetona $\delta = 2,208$ ppm para ^1H e $\delta = 32,69$ ppm para ^{13}C , pH= 7.

FIGURA 15 - MAPA DE CORRELAÇÃO ^1H - ^{13}C HSQC DA FRAÇÃO KAN1.

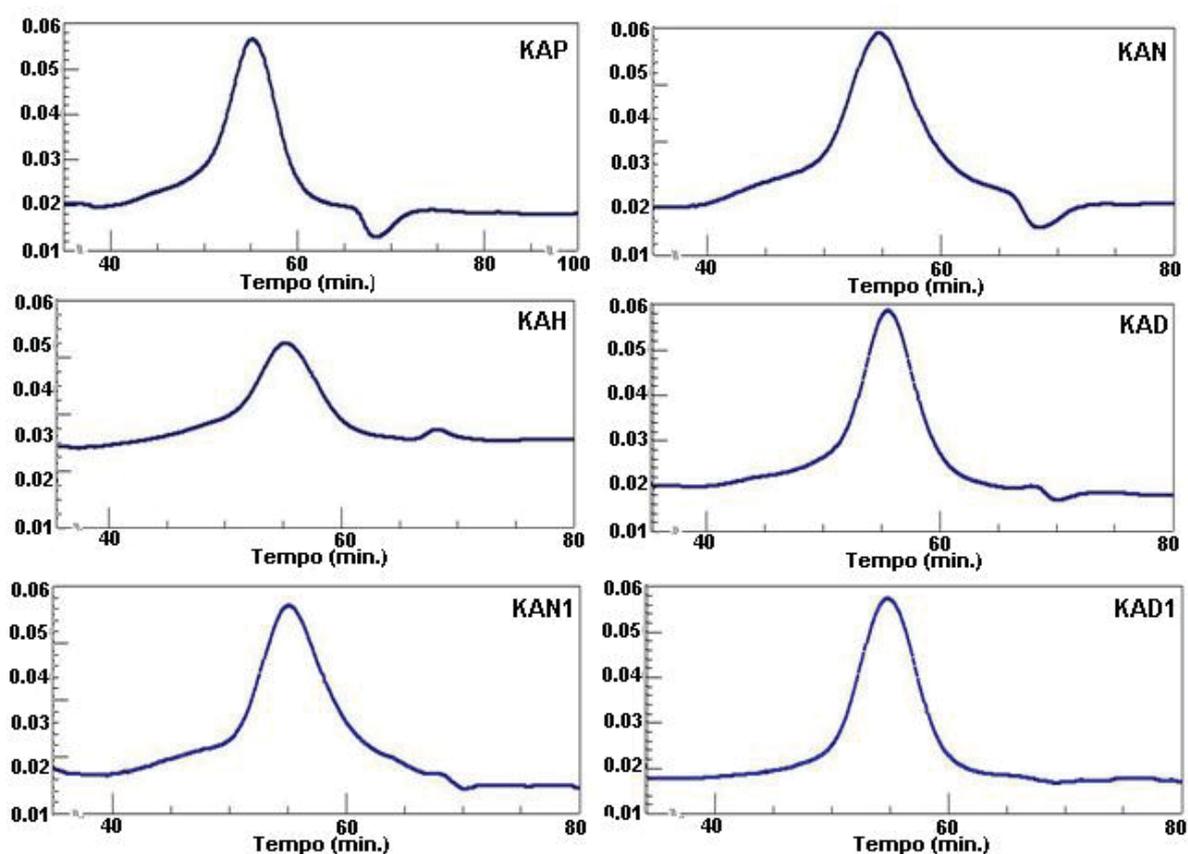
Mapa de correlação de HSQC realizado a 50 °C em D_2O , padrão interno acetato $\delta = 2.040$ ppm para ^1H e $\delta = 23,0$ ppm para ^{13}C , pH= 4.

FIGURA 16 - MAPA DE CORRELAÇÃO ^1H - ^{13}C HSQC DA FRAÇÃO KAD1.

Mapa de correlação de HSQC realizado a 50 °C em D_2O , padrão interno acetona $\delta = 2,208$ ppm para ^1H e $\delta = 32,69$ ppm para ^{13}C , pH= 7.

A determinação da massa molar média das frações aminadas foi realizada usando o tempo de retenção observado no cromatograma das análises de HPSEC utilizando o detector de índice de refração (RID) (FIGURA 17). O tempo de retenção das frações foram: KAP (55,16 min.), KAH (55,25 min.), KAN (54,75 min.), KAD (55,33 min.), KAN1(55,16 min.) e KAD1(54,41 min). Todas as frações apresentaram um perfil homogêneo, deste modo, as massas molares foram calculadas através da comparação com uma curva de calibração de dextranas, onde foi possível encontrar os valores de M_w de todas as frações (TABELA 7). Foi observado que as frações possuem uma massa molar próxima umas das outras, contudo as frações retidas em membrana de 1 kDa apresentam um leve aumento da massa.

FIGURA 17 - CROMATOGRAMAS DAS FRAÇÕES KAP, KAH, KAN, KAD, KAN1 E KAD1, OBTIDOS POR CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO ESTÉRICA (HPSEC-MALLS-RID).



Todas as frações foram analisadas também para seu teor de sulfato, porcentagem de nitrogênio e carbono e carboidrato total (TABELA 7), onde foi verificado que não houve perda de sulfato após as reações de aminação

reduzida, mantendo-se com a porcentagem próxima a 25%, valor que é condizente com a literatura para κ -carragenana (NECAS; BARTOSIKOVA, 2013). Através desta tabela também é possível evidenciar o aumento do teor de nitrogênio nas frações contendo o grupamento alquila em relação às amostras KC, KCDR1 e KCDR6, onde a quantidade de nitrogênio detectada pela análise elementar nas frações obtidas após a reação de aminação redutiva se deve pela inserção do grupamento alquilamina nestas estruturas e nas amostras KC, KCDR1 e KCDR6 se deve provavelmente pela presença de pequenas quantidades de proteína. Nas frações obtidas através da reação de aminação redutiva se observa um aumento do teor (%) de nitrogênio entre 3 e 7 vezes em relação as frações que não realizaram a reação, como a fração nativa KC e suas derivadas KCDR1 e KCDR6. Dentre as frações modificadas e purificadas em membrana de 6-8 kDa a fração que apresentou maior porcentagem de nitrogênio foi a KAH, obtida da reação com a heptilamina, com um teor de 0.574% e taxa $(N/C)*100$ de 1.54. As frações purificadas em membranas de 1 kDa apresentaram uma porcentagem de nitrogênio de 0.720% (Taxa $(N/C)*100$ de 1.98) e 0.755% (Taxa $(N/C)*100$ de 2.31) para as frações KAN1 e KAD1, respectivamente, quantidades semelhantes à aminação redutiva realizada por exemplo com a xilana reportada na literatura (DAUS; ELSCHNER; HEINZE, 2010). A maior quantidade de nitrogênio nas frações retidas em membranas de 1 kDa se deve pela capacidade desta membrana em reter frações de menores massas molares, que apresentam uma maior quantidade de terminais redutores disponíveis para sofrerem a reação química de aminação redutiva.

TABELA 7 - TEOR DE SULFATO, NITROGÊNIO E CARBONO, MASSA MOLAR PONDERAL MÉDIA (MW), CARBOIDRATO TOTAL E RENDIMENTO DE REAÇÃO DE TODAS AS FRAÇÕES OBTIDAS.

Amostra	Sulfato (%SO ₄) ^a	Nitrogênio (%N) ^b	Carbono (%) ^c	Taxa (N/C)*100	Mw (g/mol) ^d	Carb. total (%) ^e	Recup. (%) ^f
KC	23,38	0,050	27,00	0.19	487,800 ^g	78,9	50
KCDR6	25,56	0,112	28,68	0.39	8,758	64,7	20,4
KAP	26,56	0,347	29,86	1.16	10,039	62,0	22,7
KAH	25,25	0,574	37,26	1.54	10,922	58,2	18,6
KAN	25,50	0,298	30,07	0.99	11,512	73,6	28
KAD	25,63	0,382	28,45	1.34	9,507	65,4	16
KCDR1	24,50	0,108	29,43	0.37	11,511	64,3	22,8
KAN1	24,38	0,720	36,28	1.98	10,039	61,0	12,5
KAD1	24,31	0,755	32,68	2.31	12,869	57,1	35,7

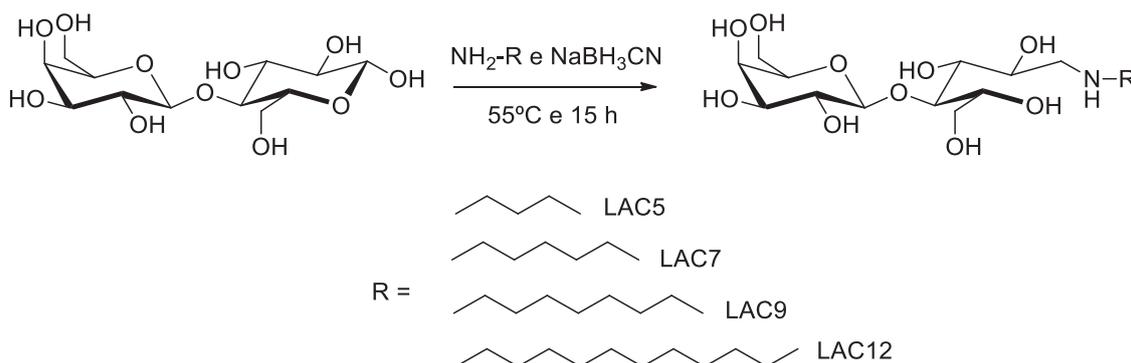
a) Dosagem de sulfato realizado através da metodologia de Dodgson, (1961); b e c) Porcentagem obtida através da análise elementar de carbono e nitrogênio; d) Calculado por análise realizada através de HPSEC-MALLS-RID e comparada através de uma curva padrão de dextrana; e) Porcentagem obtida através da técnica descrita por Dubois, (1956) ; f) Recuperação referente à massa final obtida do fração após liofilização.g) Calculado a partir da análise realizada por HPSEC-MALLS-RID e $dn/dc = 0,102 \text{ mL/g}$.

5.4 SÍNTESE DE AMINAS N-ALQUIL-1-DESÓXI-LACTITOL

A síntese das *N*-alquil-lactitol com diversas aminas de longa cadeia alquílica já foi realizada por Latge et al. (1991), onde foi utilizado água para a solubilização da lactose, 2-propanol para a solubilização das alquilaminas e o agente redutor boroidreto de sódio. O autor também realizou a reação em duas etapas, primeiramente em 24 h de reação com contato apenas da lactose com as alquilaminas, sem utilizar o agente redutor, e a etapa de redução de 21 h com o uso do boroidreto de sódio para a formação dos derivados *N*-alquil-lactitol. Ducatti (2009) realizou a adaptação desta metodologia (ESQUEMA 12), modificando o solvente 2-propanol para o metanol, a utilização de tampão borato na reação, a utilização do agente redutor cianobohidreto de sódio, e modificando os tempos de reação, realizando apenas uma reação de 15 h. Esta condição também foi utilizada para as reações com os oligossacarídeos obtidos a partir da κ -carragenana. A condição de Latge et al. (1991) para a reação com os oligossacarídeos não foi utilizada pois o 2-propanol é um solvente eficaz para a precipitação de soluções de polissacarídeos, deste modo, o uso do metanol é mais adequado, além de tempos de reação reduzidos, com a reação em apenas uma etapa.

A síntese realizada por Ducatti (2009) foi eficaz para a produção dos derivados *N*-alquil-lactitol e caracterizada em seu trabalho original (ESQUEMA 12). As frações foram denominadas de LAC5, LAC7, LAC9 e LAC12 onde possuem a cauda alquilamina de cinco, sete, nove e doze carbonos, respectivamente (TABELA 8). Estas frações foram novamente caracterizadas por RMN de ^{13}C (FIGURA 18) para confirmação de sua pureza e conforme necessidade foram repurificadas. Os principais sinais encontrados nestes espectros são referentes ao C1 da unidade de β -D-galactopiranosose em 105,6 ppm e o sinal em 52,5 ppm referente ao C1 da unidade 1-desóxi-1-amino-D-glucitol, quando ligada a alquilamina. O sinal de C1' do grupo alquil (amina secundária) foi observado em 50,6 ppm. Para a aquisição dos espectros os derivados *N*-alquil-lactitol foram solubilizados em D_2O com um tampão acetato em pH 4, pois deste modo os sinais do espectro, principalmente do C1 da unidades β -D-galactopiranosose e 1-desóxi-1-amino-D-glucitol não se dividem, como ocorre em pH alcalino, o que ocasiona a redução da intensidade do sinal no espectro de carbono (HOAGLAND; PFEFFER; VALENTINE, 1979). Este trabalho utilizou estes derivados para avaliação de suas atividades biológicas, sendo deste modo um comparativo de atividade antimicrobiana, pois utiliza as mesmas alquilaminas que foram ligadas nos oligossacarídeos.

ESQUEMA 12 – REAÇÃO DE AMINAÇÃO REDUTIVA DA LACTOSEREALIZADA POR DUCATTI, (2009).



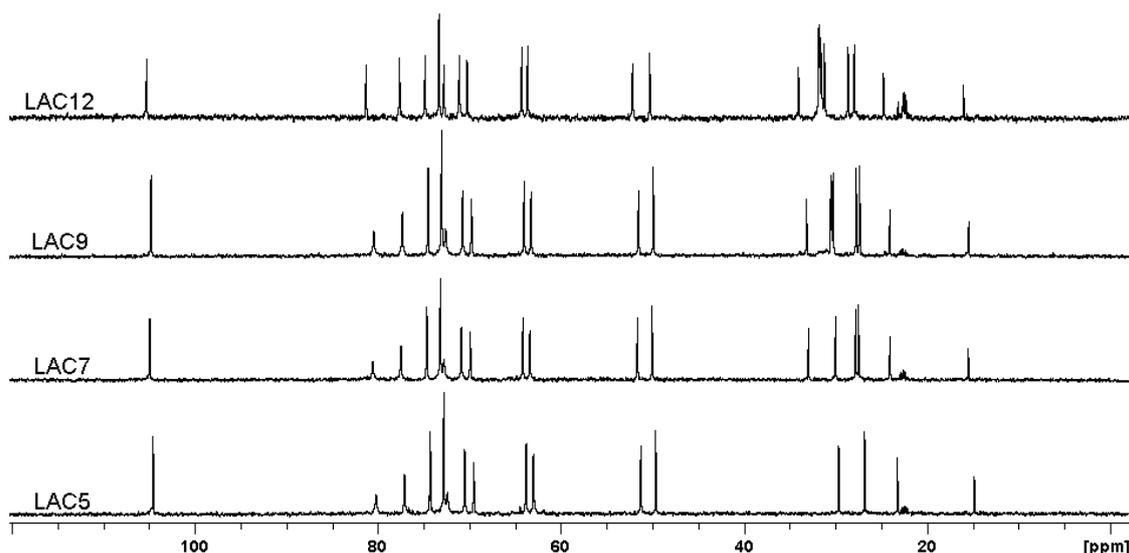
*Reação de aminação redutiva utilizando como solvente mistura 1:1 tampão borato 0,5 M, pH 8,2 e metanol.

TABELA 8 – TAXA DE NITROGÊNIO/CARBONO DAS *N*-ALQUIL-LACTITOL CALCULADO TEORICAMENTE.

Amostra	Nitrogênio	Carbono	Taxa (N/C)*100
LAC5	3,39	49,38	6.87
LAC7	3,17	51,69	6.13
LAC9	2,98	53,71	5.55
LAC12	2,74	56,34	4.86

*Dados obtidos através do software ChemDraw® Ultra 12.0

FIGURA 18 – ESPECTRO DE ^{13}C DAS FRAÇÕES LAC5, LAC7, LAC9 E LAC12.



Espectro de ^{13}C realizado a 30 °C em D_2O em 100 MHz para as frações LAC5, LAC7 e LAC9 e 50 °C em D_2O 150 MHz para a fração LAC12, padrão interno ácido acético $\delta = 179,5$ ppm para ^{13}C , pH= 4 para todos espectros.

5.5 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS DERIVADOS *N*-ALQUIL-CARRAGENANAS E *N*-ALQUIL-LACTITOL.

A atividade antimicrobiana da fração KC e de suas derivadas obtidas por hidrólise ácida parcial (KCDR1 e KCDR6) e aminação redutiva (KAP, KAH, KAN, KAD, KAN1 e KAD1) foram realizadas através da técnica de microdiluição seriada (VEIGA et al., 2019), contra os microrganismos *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) e *Escherichia coli* (ATCC 8738). A concentração máxima inicial para a fração KC foi de 10 mg/mL, pois a alta capacidade gelificante deste polissacarídeo impediu o preparo de soluções

em concentrações maiores. Para as demais frações foi utilizada a concentração de 25 mg/mL.

Os derivados *N*-alquil-lactitol foram testados utilizando a concentração de 25 mg/mL para as amostras LAC5, LAC7 e LAC9 e 10 mg/mL para a amostra LAC12.

Nesta técnica, a partir da concentração máxima inicial, as amostras são diluídas sete vezes e após o período de incubação entre 20 e 22 horas é adicionado uma solução de cloreto de trifeniltetrazólio (TTC) 0,125%. As microplacas com a solução de TTC são deixadas em incubação por mais 2 horas e então lidas em espectrofotômetro a 540 nm. O TTC é um indicador de atividade metabólica, e quando em contato com bactérias metabolicamente ativas será reduzido ao composto de coloração avermelhada 1,3,5-trifenilformazana (VEIGA et al., 2019). Através da técnica de microdiluição é possível se obter os valores de concentração inibitória mínima (CIM) e após o plaqueamento e incubação em ágar Mueller Hinton dos poços desejados é possível se obter os valores de CBM.

Dentre as amostras purificadas/retidas em membrana de 6-8 kDa, as frações KC, KCDR1 e KCDR6 não apresentaram uma inibição suficiente para alcançar um CIM ou CBM (TABELA 9). Relatos na literatura indicaram uma baixa atividade antimicrobiana da κ -carragenana nativa, como reportado por Yamashita (2001) que demonstrou uma baixa atividade bacteriostática da κ -carragenana, onde através de um método turbidimétrico analisou a influência de uma solução deste polissacarídeo contra as bactérias *S. typhimurium*, *V. mimicus*, *E. coli* e *S. aureus*, com um efeito inibitório de aproximadamente 20% no crescimento destas bactérias. Já contra as bactérias *S. enteritidis* e *A. hydrophila* essa inibição foi de aproximadamente 40% no crescimento. Já Wang et al. (2011a) utilizando oligossacarídeos derivados da κ -carragenana, obtidos através de uma hidrólise enzimática, demonstrou um baixo efeito antimicrobiano contra as bactérias *E. coli* e *S. aureus*, não sendo considerado ativo contra essas bactérias.

Dentre as amostras KAP, KAH, KAN e KAD purificadas/retidas em membrana de 6-8 kDa, apenas a KAD apresentou uma atividade antibacteriana contra a bactéria gram-negativa *E. coli*, com CIM de 1,56 mg/mL (TABELA 9), o que demonstra um aumento considerável de atividade antimicrobiana em relação às frações sem a inserção dos grupamentos alquilamina KC, KCDR1 e

KCDR6, e entre as frações modificadas KAP, KAH, KAN. Contudo a fração KAD não apresentou atividade bactericida na concentração máxima testada de 25 mg/mL. Através da análise da taxa $(N/C)*100$ (TABELA 7), verificamos que as frações KAP, KAH, KAN e KAD apresentam relações nitrogênio/carbono próximas, sendo de 1.16, 1.54, 0.99 e 1.34, respectivamente, levando a conclusão de que apresentam aproximadamente o mesmo grau de modificação química. A fração KAD, mesmo não sendo a fração com maior taxa nitrogênio/carbono, foi a que demonstrou maior atividade antimicrobiana, o que demonstra que esta atividade tende a aumentar com o tamanho da cauda alquilamina. Os derivados de lactose LAC5 e LAC7 com as menores caudas de alquilamina reforçam a hipótese da necessidade de uma maior cauda para a atividade antimicrobiana, uma vez que estes dois derivados foram os que apresentaram as menores atividades dentre as *N*-alquil-lactilaminas, com LAC7 apresentando valor de CIM de 25 mg/mL, e LAC5 igual a 12,5 mg/mL contra a bactéria *S. aureus* (TABELA 10).

O derivado de lactose (LAC12) contendo o grupo *N*-dodecil, também apresentou atividade contra *E. coli* com um CIM de 1,25 mg/mL, valor próximo ao da fração KAD contra esta bactéria (CIM de 1,56 mg/mL) (TABELA 10). Contudo, LAC12 possui uma taxa nitrogênio/carbono igual a 4.86 (TABELA 8), que é 3,6 vezes maior que o da fração KAD (Taxa de 1.34), sugerindo que a atividade antimicrobiana apresentada por KAD resulta de uma atividade sinérgica entre a cauda alquilamina adicionada e a estrutura química da κ -carragenana. Outros trabalhos têm demonstrado que a inserção de cadeias alquilamina de longo tamanho adicionam uma boa atividade antimicrobiana a compostos como lactose e dextrana (BETTOSCHI et al., 2016; TUCHILUS et al., 2017). O derivado LAC12 demonstrou atividade também contra as bactérias *S. aureus* e *P. aeruginosa* com CIM de 0,62 mg/mL e 2,5 mg/mL respectivamente, apresentando uma atividade bactericida na concentração de 5 mg/mL nas três estirpes de bactérias testadas.

Após os testes com as frações retidas em membrana de 6-8 kDa, foram testadas as frações KAN1 e KAD1 purificadas/retidas em membrana de 1 kDa. A fração KAN1 apresentou atividade contra a bactéria gram-positiva *S. aureus* com CIM de 1,56 mg/mL, contudo não alcançou um valor de CBM para esta bactéria. Contra a bactéria gram-negativa *E. coli* foi obtido um CIM de 0,78

mg/mL e CBM de 25 mg/mL, já contra a bactéria *P. aeruginosa* não foi ativa. O derivado KAN1 diferentemente do derivado KAN (ambas modificadas com a nonilamina) apresentou atividade antimicrobiana contra as bactérias *S. aureus* e *E. coli*. Isso se deve provavelmente pelo maior grau de modificação, onde a fração KAN1 apresentou uma taxa nitrogênio/carbono de 1.98, aproximadamente duas vezes maior que a da fração KAN (Taxa de 0.99) (TABELA 7).

O derivado de lactose (LAC9) contendo o grupo *N*-nonil também apresentou atividade contra as bactérias *S. aureus* e *E. coli* como a fração KAN1, contudo apresentou também atividade contra a bactéria *P. aeruginosa* com CIM de 25 mg/mL. Comparando-se as duas frações KAN1 e LAC9, verificamos que as duas frações apresentaram um valor de CIM para a bactéria *S. aureus* próximos, sendo eles de 1,56 mg/mL e 1,5 mg/mL, respectivamente. Contudo vale ressaltar que as taxas nitrogênio/carbono são diferentes, onde o derivado de lactose LAC9 (Taxa de 5.55) apresenta uma proporção 2,8 vezes maior que a fração KAN1 (Taxa de 1.98) (TABELA 7). De mesmo modo, para a bactéria *E. coli* as duas frações apresentam atividade, sendo o CIM encontrado para a fração KAN1 de 0,78 mg/mL e para a LAC9 de 6,25 mg/mL, sendo verificado que a fração KAN1 apresentou uma maior atividade antimicrobiana, o que reforça a hipótese de um efeito sinérgico entre a cauda alquilamina com a cadeia do oligossacarídeo para a sua atividade.

A fração KAD1 foi a fração modificada mais ativa entre os oligossacarídeos, tanto modificados como não modificados, isso se deve provavelmente pelos dois efeitos sinérgicos, sendo a fração de oligossacarídeo mais modificado, com taxa nitrogênio/carbono de 2.31 e a fração que foi modificada com a maior cauda alquilamina. Nesta fração foi possível verificar que para a bactéria *S. aureus* a fração KAD1 apresentou um valor de CIM próximo ao da LAC12, CIM de 0,78 mg/mL e 0,62 mg/mL, respectivamente. Contudo LAC12 alcançou um valor de CBM de 5 mg/mL que não foi alcançado pela KAD1. Os testes realizados de atividade contra a bactéria *E. coli* demonstraram uma maior atividade da fração KAD1 em comparação com a LAC12, sendo que a fração KAD1 apresentou um CIM de 0,25 mg/mL e CBM de 1,56 mg/mL e a LAC12 um CIM de 1,25 mg/mL e CBM de 5mg/mL contra esta bactéria. Os testes contra a bactéria *P. aeruginosa* mostraram que a fração

KAD1 apresentou uma atividade inibitória (CIM) maior que o derivado de lactose LAC12, CIM de 0,25 mg/mL e 1,25 mg/mL, respectivamente, contudo apresentou um valor bactericida (CBM) menor, CBM de 25 mg/mL e 5 mg/mL, respectivamente. Vale ressaltar que a LAC12 possui uma taxa de nitrogênio/carbono aproximadamente duas vezes maior que a fração KAD1. Deste modo, há uma reafirmação da hipótese de efeito sinérgico entre a cauda alquilamina com a cadeia do oligossacarídeo, ao menos para um efeito inibitório (CIM) para as frações KAD, KAN1 e KAD1. Contudo, vale ressaltar que também foi alcançada uma maior atividade (CIM e CBM) da fração KAD1 contra a bactéria gram-negativa *E. coli* em relação ao derivado mais ativo das *N*-alquil-lactitol, a LAC12.

TABELA 9 - VALORES DE CIM E CBM DE KC E SUAS FRAÇÕES DERIVADAS.

Amostra	<i>S. aureus</i> (ATCC 6538)		<i>E. coli</i> (ATCC 8738)		<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 9027)	
	CIM (mg/mL)	CBM (mg/mL)	CIM (mg/mL)	CBM (mg/mL)	CIM (mg/mL)	CBM (mg/mL)
KC	>10	N,R	>10	N,R	>10	N,R
KCDR1 e KCDR6	>25	N,R	>25	N,R	>25	N,R
KAP,KAH e KAN	>25	N,R	>25	N,R	>25	N,R
KAD	>25	N,R	1,56	>25	>25	N,R
KAN1	1,56	>25	0,78	25	>25	N,R
KAD1	0,78	>25	0,25	1,56	1,56	25

Controle positivo: Cloranfenicol 125 µg/mL. Controle negativo: Tampão pH = 6.8. N.R = Não realizado. CIM: Concentração Inibitória Mínima, CBM: Concentração Bactericida Mínima.

TABELA 10 - VALORES DE CIM E CBM DAS N-ALQUIL-LACTITOIS.

Amostra	<i>S. aureus</i> (ATCC 6538)		<i>E. coli</i> (ATCC 8738)		<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 9027)	
	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM
	(mg/mL)	(mg/mL)	(mg/mL)	(mg/mL)	(mg/mL)	(mg/mL)
LAC5	12,5	>25	>25	N,R	25	>25
LAC7	25	>25	25	>25	25	>25
LAC9	1,5	25	6,25	25	25	>25
LAC12	0,62	5	1,25	5	2,5	5

Controle positivo: Cloranfenicol 125 µg/mL. Controle negativo: Tampão pH = 6.8. N.R = Não realizado. CIM: Concentração Inibitória Mínima, CBM: Concentração Bactericida Mínima.

6. CONCLUSÃO

Através da hidrólise ácida parcial foi possível obter derivados de menor massa molar e inserir cadeias alquilaminas no polissacarídeo híbrido extraído da alga vermelha *K. alvarezii*, onde os derivados de menor massa molar passaram por uma redução de seus terminais redutores formando os derivados 3,6-anidro-galactitol ou por uma aminação redutiva utilizando os terminais redutores (diol geminal) para a semissíntese dos derivados alquilamina. Os derivados obtidos desta síntese demonstraram atividade antimicrobiana apenas nas frações que foram modificadas com a nonilamina (KAN1) e a dodecilamina (KAD e KAD1), principalmente contra a bactéria gram-negativa *E. coli*, onde a KAD1 foi a fração mais ativa, inclusive obtendo valores de CIM para as três estirpes testadas *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa*. As *N*-alquil-lactilaminas apresentaram atividade antimicrobiana principalmente contra a bactéria *S. aureus* onde todas alcançaram um valor de CIM, sendo o melhor valor encontrado para a LAC12 (CIM de 0,62 para *S. aureus*). Dentre todas amostras testadas a mais ativa foi a LAC12 que apresentou CIM e CBM para as três estirpes testadas. No entanto o derivado KAN1 apresentou menor valor de CIM do que a LAC9 e os derivados KAD e KAD1 menor valor de CIM do que a LAC12 para a bactéria *E. coli*, o que demonstra uma novidade de atividade antimicrobiana não apenas dependente da cadeia alquilamina, mas também da cadeia oligossacarídica. A fração KAD1 apresentou o maior espectro de atividade bacteriostática entre as frações ativas KAN, KAN1 e KAD1, atingindo valores de CIM contra as três bactérias testadas. Em todos os testes realizados houve a melhor atividade antimicrobiana

associada a modificação com a maior cadeia de alquilamina e grau de modificação. Deve-se levar em consideração para um efeito bacteriostático a cadeia do açúcar ligada a alquilamina, onde o melhor valor de CIM encontrado entre todas as amostras testadas foi referente a fração KAD1 contra a bactéria *E. coli* (CIM de 0,25 mg/mL).

CAPÍTULO 2

**Este capítulo está escrito no formato de artigo científico visando a
submissão destes resultados para publicação.**

Semissíntese dos derivados O-Tosil, Azido, N-dietil e pirrolidina a partir da *Kappa*-carragenana.

Resumo: A alga *K. alvarezii* produz a κ -carragenana como seu principal constituinte, um polissacarídeo aniônico sulfatado, que comumente apresenta uma alta massa molecular. Este trabalho teve por objetivo realizar a tosilacção do polissacarídeo κ -carragenana preferencialmente em C6 na unidade de β -D-Galp-4-sulfato (G4S-6) e para posterior substituição com dietilamina, pirrolidina e azida. Para isso, o polissacarídeo (KC) foi submetido a hidrólise ácida parcial (HAP) para redução da massa molecular (KCD) e posterior otimização da reação de tosilacção. Inicialmente, reação de tosilacção foi estudada em meio orgânico homogêneo utilizando DMAc e DMF, contudo nestas condições ocorreu um baixo grau de tosilacção. A reação, foi, então, realizada em meio heterogêneo utilizando a mistura de solventes água/acetonitrila, com as bases NaOH e $\text{Ca}(\text{OH})_2$, sob diversas condições. O maior grau de substituição em G4S-6 foi obtido na condição utilizando maior proporção de acetonitrila (3:1 – acetonitrila/água), à 0 °C, com adição de NaCl como sal e NaOH como base. O DS obtido nestas condições em escala preparativa foi de 1.32. A fração tosilada foi submetida a reação de substituição nucleofílica com dietilamina, pirrolidina e azida, onde o grupamento tosilato presente na posição G4S-6 foi completamente substituído. Todos os produtos foram caracterizados por meio de espectroscopia de infravermelho (FT-IR) e espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H , ^{13}C .

7. INTRODUÇÃO

As algas vermelhas são provavelmente a classe mais antiga de plantas inferiores reportadas, e diferem de todas as demais plantas pela composição polissacarídica de suas paredes celulares e matriz intercelular, onde a maioria delas possuem tipos únicos de galactanas, como as agaranas e as carragenanas (USOV, 2011). As carragenanas são normalmente divididas em seis formas básicas, de acordo com sua estrutura química e padrão de sulfatação, sendo elas a *Kappa* (κ), *Iota* (ι), *lambda* (λ), *mu* (μ), *nu* (ν) e *theta* (θ) – carragenanas (CAMPO et al., 2009).

A estrutura química das carragenanas consiste em ligações alternadas de 3-ligado β -D-galactopiranosose e 4-ligado α -D-galactopiranosose ou 4-ligado 3,6-anidro- α -D-galactopiranosose comumente chamadas de unidades G, D e DA, respectivamente (KNUTSEN et al., 1994; CAMPO et al., 2009).

A alga tropical *Kappaphycus alvarezii*, também conhecida como *Eucheuma cottonii*, é a principal fonte de extração da *Kappa*-carragenana. Esta possui como composição de seus dissacarídeos repetitivos, a posição 4 da unidade G sulfatada (G4S) e a presença da 3,6-anidro- α -D-galactopiranosose (DA) (KNUTSEN et al., 1994). A carragenana extraída da *K. alvarezii* disponibiliza um polissacarídeo quase puro, com quantidades de *Iota*-carragenana inferiores a 10% (BIXLER; JOHNDRO; FALSHAW, 2001). Este polissacarídeo extraído, além do sulfato na unidade G, possui comumente o grupo O-metil na posição 6 desta mesma unidade, em quantidades variáveis (CAMPO et al., 2009).

Os polissacarídeos de algas marinhas, por serem extraídos de fontes renováveis, abundantes na natureza e apresentarem uma estrutura química definida e dificilmente alcançável por meio da síntese orgânica são alvos de modificações químicas que objetivam a inserção de grupamentos que modelem as suas atividades intrínsecas (CHOPIN et al., 2014).

Dentro das reações em que o oxigênio do sacarídeo atua como um nucleófilo, temos a reação de tosilacção, que é uma reação onde há a formação de um éster de sulfonato onde o oxigênio do sacarídeo que sofreu a reação é retido no produto final (CUMPSTEY, 2013). Esta reação, com polissacarídeos solúveis em meio orgânico, ocorre eficientemente e de maneira homogênea em solvente DMAc, contendo a adição de LiCl, e na presença da base Et₃N. Em alguns polissacarídeos, esta reação é conduzida de maneira eficiente em meio aquoso em uma reação heterogênea, comumente utilizando NaOH como base, como o caso da celulose em meio aquoso (HEINZE; LIEBERT; KOSCHELLA, 2006; SCHMIDT; LIEBERT; HEINZE, 2014). É bem conhecida a propriedade desta funcionalização em polissacarídeos e álcoois de baixa massa molar, onde o éster sulfônico formado é um bom grupo abandonador podendo sofrer reações de deslocamento nucleofílico com bons nucleófilos levando à formação do composto desóxi correspondente, com a substituição do grupo sulfonato (HEINZE; LIEBERT; KOSCHELLA, 2006).

Alguns polissacarídeos já foram estudados em relação a esta reação de tosilação, como a celulose que foi tosilada em meio orgânico (DMAc/LiCl) alcançando um alto grau de substituição (DS) máximo de 2.30 (RAHN et al., 1996), celulose em meio aquoso (H₂O/ureia) alcançando um DS máximo de 1,68 (SCHMIDT; LIEBERT; HEINZE, 2014) e dextrana em meio orgânico (DMAc/LiCl) alcançando um DS máximo de 1,31 (HEINZE; MICHEALIS; HORNIG, 2007). Dentre os polissacarídeos de alga vermelha, somente a agarose possui relato na literatura explorando a reação de tosilação, isso se deve principalmente pelo caráter não-iônico deste polissacarídeo, facilitando a solubilização deste polissacarídeo em meio orgânico, levando a uma reação de tosilação homogênea. Para este polissacarídeo GERICKE E HEINZE, (2015) estudaram a reação de tosilação e a substituição nucleofílica do derivado alcançado, onde a reação de tosilação alcançou um DS máximo de 1.81.

Em busca de alcançarmos novos polissacarídeos funcionalizados, que possam apresentar aplicabilidades biotecnológicas, este trabalho estudou a reação de tosilação com o polissacarídeo *Kappa*-carragenana extraída da alga vermelha *K. alvarezii* e realizou a substituição nucleofílica do derivado tosilado com os nucleófilos *N*-dietilamina, azida e pirrolidina.

8. MATERIAL E MÉTODOS

8.1 MATERIAIS E REAGENTES

O polissacarídeo foi obtido conforme descrito (ARTIGO 1), fração denominada KC, sendo extraído da alga vermelha *Kappaphycus alvarezii* obtida comercialmente a partir da empresa MM algas (Ilha Grande, Rio de Janeiro). Membranas de diálise de *cut-off* 6-8 kDa e 12-14 kDa (Sigma-aldrich), Resina Amberlite IR 120, Ácido Trifluoroacético (Neon), Boroidreto de sódio (Merk), Etanol (Neon), Hidróxido de sódio (Synth), Hidróxido de Cálcio (Synth), Cloreto de *p*-toluenossulfonila (Sigma-aldrich), Acetonitrila (Merk), Cloreto de sódio (Synth), Azida de sódio (Merk), Pirrolidina (Sigma-aldrich) e Dietilamina (Sigma-aldrich), foram utilizados conforme obtidos.

8.2 HIDRÓLISE ÁCIDA PARCIAL (HAP) DA FRAÇÃO KC

Para realização da hidrólise parcial da fração KC foram realizadas adaptações em metodologias que utilizaram TFA para hidrólise seletiva das ligações α -glicosídicas 1 \rightarrow 3 entre a unidade DA e G4S da κ -carragenana (DUCATTI et al., 2011; STEVENSON; FURNEAUX, 1991). A fração KC (10 g) foi solubilizada em água deionizada (900 mL) à 90 °C, após a solubilização, a temperatura foi ajustada para 65 °C e, então, foi adicionado o TFA 1 mol/L (100 mL), obtendo uma concentração final de TFA 0,1 mol/L. A mistura reacional foi submetida a agitação por 15 minutos à 65 °C e, então, a reação foi interrompida com o auxílio de gelo, seguida de neutralização com uma solução 1 mol/L de NaOH. Afim de reduzir os terminais redutores formados, foi adicionado ao meio reacional boroidreto de sódio (2,5 g) e agitado durante 2 h, ao final da reação de redução a mistura foi neutralizada com ácido acético glacial, acondicionada em membranas de diálise de *cut-off* 12-14 kDa e dialisada contra água deionizada até completa remoção dos sais formados, filtrada em filtro de papel quantitativo e liofilizada, rendendo a fração KCD (4,7 g ou 47%).

8.3 SÍNTESES

8.3.1 TOSILAÇÃO DE KCD EM SOLVENTE ORGÂNICO

As reações analíticas foram realizadas utilizando a fração KCD com diferentes contra-íon, sendo estes, sódio, trietilamônio, piridônio e cetavlon. A fração KCD na forma sódica foi obtida diretamente da reação de HAP, uma vez que a neutralização da reação ocorreu com a adição de hidróxido de sódio, como descrito anteriormente. Para a obtenção do contra-íon na forma de trietilamônio ou piridônio, a fração KCD (0,250 g) foi dissolvida em água deionizada (20 mL) e tratada com a resina de troca catiônica, na forma de trietilamônio ou piridônio (2,5 g) e submetida a agitação por 2 h, com ajuste do pH a 7,0 com trietilamina ou piridina. A mistura foi filtrada e liofilizada com um rendimento de aproximadamente 70% ou 0,175 g. Para a obtenção do contra-íon cetavlon, este foi, previamente, solubilizado em água deionizada (1,05 g de cetavlon em 20 mL de água deionizada). Esta solução foi então vertida sobre uma solução de KCD (0,150 g de KCD em 15 mL de água deionizada), resultando na turvação do meio, o qual foi submetido a agitação por 30 min. A mistura resultante foi centrifugada (4.500 rpm) três vezes por 10 min descartando o sobrenadante. O precipitado foi liofilizado e recuperado aproximadamente 150% ou 0,225 g.

As reações analíticas foram realizadas com a fração em suas formas de contra-íon utilizando 0,05 g e, para todas estas frações, foi considerado o peso molecular da díade, na forma sódica (408,3 g/mol), na forma trietilamônio (487,5 g/mol), na forma piridônio (465,4 g/mol) e cetavlon (669,8 g/mol), para padronização da proporção em equivalentes dos reagentes. As frações foram solubilizadas em DMF ou DMAc (5 mL), na concentração de 10 mg/mL, com auxílio de temperatura (70 °C). A mistura foi resfriada a 30 °C e adicionado a base trietilamina ou piridina (12 eq.) seguida da adição do cloreto de tosila (6 eq.) e mantidas em reação por 24 h. Ao final da reação a mistura foi precipitada com etanol 3 vol. e centrifugada (4.500 rpm) por 10 minutos, dialisado em membranas de *cut-off* 6-8 kDa contra solução de NaCl 0,2 mol/L seguida de água deionizada e então liofilizadas.

8.3.2 TOSILAÇÃO DE KCD EM MISTURA DE ÁGUA E ACETONITRILA.

As reações analíticas foram realizadas considerando o peso molecular da díade em 408,3 g/mol para a padronização dos equivalentes de reagentes e a concentração final de polissacarídeo no meio (água e acetonitrila) igual a 12,5 mg/mL. A fração KCD (0.05 g), em constante agitação magnética, foi solubilizada previamente em $\frac{3}{4}$ do volume total necessário de água deionizada, com a adição ou não de NaCl (175 mg, 25 eq.) e com aquecimento a 70 °C. Após este processo a reação foi ajustada à temperatura ambiente, 30 °C, ou a 0 °C. Foi adicionado então NaOH (97 mg, 20 eq.) previamente solubilizado em $\frac{1}{4}$ da quantidade total de água deionizada. Em seguida, foi adicionado lentamente cloreto de *p*-toluenossulfonila (232 mg, 10 eq.) previamente solubilizado no volume necessário de acetonitrila para completar a mistura água/acetonitrila. As reações foram conduzidas por 3 h, 4 h, 5 h ou 24 h e as proporções de água/acetonitrila utilizadas foram 4:1 / 6:1 / 1:3 / 3:1. As reações foram então precipitadas em etanol 3 vol., centrifugadas a 4.500 rpm por 10 minutos, neutralizadas e dialisadas em membrana de *cut-off* 6-8 kDa contra água deionizada e liofilizadas.

A reação preparativa (KCDTP) foi realizada utilizando a proporção 1:3 do solvente, água deionizada (40 mL) e acetonitrila (120 mL). A fração KCD (2 g) foi agitada magneticamente e solubilizada na porção aquosa ($\frac{3}{4}$ ou 30 mL) com aquecimento, foi então adicionado nesta solução o NaCl (7,1 g, 25 eq.), após a solubilização, a solução foi resfriada com auxílio de gelo a uma temperatura de aproximadamente 0 °C e então adicionado o NaOH (3,9 g, 20 eq.) previamente solubilizado em água deionizada ($\frac{1}{4}$ ou 10 mL) e resfriada, seguido do cloreto de *p*-toluenossulfonila (9,3 g, 10 eq.) previamente solubilizado em 120 mL de acetonitrila e resfriado, que foi adicionado vagarosamente. A reação foi conduzida por 5 h e então foi precipitada em etanol 3 vol., e centrifugada. O precipitado foi purificado através de extração em aparelho de Soxhlet utilizando o solvente etanol por 6 h, após esta extração o material extraído (solúvel em etanol) contendo excesso de reagente foi descartado e o produto sólido (insolúvel em etanol) foi solubilizado/suspendido em água deionizada e neutralizado com auxílio de ácido acético glacial, dialisado em membrana de *cut-off* 6-8 kDa contra água deionizada e liofilizada gerando a fração KCDTP.

Recuperação: 2,54 g ou 127%.

$DS_{\text{soma}}=1.32$, $DS_{G4S,6T}=1$, $DS_{DA,2T}= 0.15$, $DS_{G4S,2T}= 0.17$, $DS_{G-4}= 0$.

Análise elementar: C% 37,06, H% 4,41, N% 0,01, Cl% 0,40.

8.4 CÁLCULO DO GRAU DE SUBSTITUIÇÃO (DS) POR RMN-¹H E MAPA DE CORELAÇÃO ¹H-¹³C HSQC

Para os cálculos de DS apresentados neste trabalho foram utilizadas as fórmulas abaixo, onde foram considerados os deslocamentos das análises em RMN-¹H e as análises em RMN-HSQC.

$$(i) DS_{(ar)} = \frac{DA-1}{(\text{Aromático}/4)}$$

$$(ii) DS_{(DA,2T)} = \frac{DA-1'}{(DA-1 + DA-1')}$$

$$(iii) DS_{(G4S,2T)} = \frac{G4S-1'}{(G4S-1 + G4S-1')}$$

$$(iv) DS_{(G4S,6T)} = \frac{G4S-6'}{(G4S-6 + G4S-6')}$$

$$(v) DS_{(G-4)} = \frac{G4S-4'}{(G4S-4 + G4S-4')}$$

Na primeira fórmula (i), foram utilizados os resultados obtidos na análise de RMN-¹H em D₂O e DMSO-d₆. Para as análises realizadas em D₂O, foram considerados os deslocamentos da região aromática a partir de 7,25 ppm até 8,00 ppm e para as regiões anoméricas (DA-1) a partir de 5,01 ppm até 5,30 ppm. Para análises em DMSO-d₆, foram considerados os deslocamentos da região aromática a partir de 7,05 ppm até 8,00 e das regiões anoméricas (DA-1) a partir de 4,91 ppm até 5,30 ppm.

Para o cálculo do DS com as fórmulas ii-v, foram utilizados os resultados obtidos das análises de RMN-HSQC em D₂O e DMSO-d₆, uma vez que estas análises foram as mais efetivas para demonstrar as modificações químicas no polissacarídeo. Para as fórmulas ii e iii, foram considerados os deslocamentos da região anomérica (DA-1) em 5,09/97,3 ppm para D₂O e 4,99/95,8 ppm para DMSO-d₆ e da região do G4S (G4S-1) os valores de 4,62/104,6 ppm em D₂O e 4,35/103,3 ppm em DMSO-d₆. Quando o C2 da unidade DA ou G4S encontra-se

tosilado, há um “ β -shift” do H1/C1 destas unidades, sendo estes encontrados apenas nas análises realizadas em DMSO-d₆ com os deslocamentos de DA-1’ em 5,18/91,3 ppm e G4S-1’ em 4,57/100,2 ppm.

Para utilização da fórmula iv, foram avaliados os resultados dos deslocamentos da posição C6 (G4S-6). Foram utilizados os deslocamentos em 3,78/63,3 ppm para D₂O e 3,46-3,59/60,1 ppm para DMSO-d₆ para a amostra antes da reação de tosilação. Após a tosilação da posição C6 (G4S-6’), os deslocamentos foram encontrados em 4,26-4,36/72,2 ppm para D₂O e 4,13-4,30/70,8 ppm para DMSO-d₆. Esta variação no deslocamento ocorre devido “ α -shift” do H6/C6.

Para a análise da dessulfatação do polissacarídeo foram considerados os deslocamentos em DMSO-d₆ referentes a posição H4/C4 da unidade G4S em 4,51/71,3 ppm apresentando um “ α -shift” com sinais H4/C4 (G4S-4’) em 3,89/65,0 ppm, os quais foram empregados na fórmula v.

Os assinalamentos dos sinais presentes nas fórmulas seguiram a amplitude e semelhança de sinais encontrados em outros polissacarídeos como agarose, celulose e carragenanas (KOLENDER; MATULEWICZ, 2004; SCHMIDT et al., 2014; GERICKE E HEINZE, 2015; HEUKO, 2015).

8.5 REAÇÕES DE SUBSTITUIÇÃO NUCLEOFÍLICA COM A FRAÇÃO TOSILADA DA K-CARRAGENANA (KCDT).

A fração KCDT (0,2 g) foi dissolvida em 13,3 mL de DMSO (15 mg/mL) à uma temperatura de 80°C, foi então adicionada a dietilamina (0,371 mL, 10 eq.) ou pirrolidina (0,291 mL, 10 eq.) ou azida de sódio (0,231 g, 10eq.). As reações foram conduzidas por 24 h e interrompidas com uso de gelo e solução saturada de bicarbonato de sódio. A precipitação com etanol 3 vol. não foi efetiva, deste modo as reações foram acondicionadas em membranas de diálise de *cut-off* 6-8 kDa e dialisadas contra etanol (três trocas) e água deionizada até eliminação completa dos sais. As amostras dialisadas foram liofilizadas. As reações com dietilamina, pirrolidina e azida geraram as frações KCDD (0,120g, 60%), KCDP (0,142 g, 71%) e KCDA (0,149 g, 74%), respectivamente.

8.6 MÉTODOS ANALÍTICOS

Os espectros de Ressonância Nuclear Magnético (RMN) unidimensional de ^1H e ^{13}C e os mapas de correlação bidimensionais ^1H - ^{13}C *heteronuclear single-quantum correlation* (HSQC) foram adquiridos no equipamento Bruker AVANCE DRX 400 de campo magnético de 9,4 Tesla, 400 MHz para ^1H e 100 MHz para ^{13}C . A concentração padrão das amostras foi de 40 mg/mL, em tubos 5 mm de diâmetro nos solventes deuterados Dimetilsulfóxido (DMSO- d_6) ou óxido de deutério (D_2O), com temperaturas entre 30 °C e 70 °C, respectivamente. Os deslocamentos químicos foram expressos em ppm e determinados de acordo com o padrão interno (acetona: $\delta = 2,208$ ppm para ^1H e $\delta = 32,69$ ppm para ^{13}C). Os espectros foram adquiridos usando o programa de pulsos fornecido pelo manual da Bruker®, onde para os experimentos de RMN-HSQC não foram adquiridos espectros com menos de NS (*number of scans*) = 8. Os espectros foram processados e analisados com o auxílio do programa TOPSPIN 4.0.2.

A massa molar foi determinada utilizando cromatografia de exclusão estérica de alta precisão acoplada a espalhamento de luz laser em multiângulos e índice de refração (HPSEC-MALLS/RID) modelo Waters 2410. Foram utilizadas quatro colunas WATERS, conectadas em série, com limites de exclusão de 7×10^6 , 4×10^5 , 8×10^4 e 5×10^3 g.mol $^{-1}$, colunas Ultrahydrogel™ 2000, 500, 250 e 120, respectivamente, para determinar a massa molar dos polissacarídeos, também foi utilizada a comparação de massas com uma curva padrão realizada com dextrana com massa molar (M_w) de 5×10^3 , $9,4 \times 10^3$, $17,2 \times 10^3$, $40,2 \times 10^3$, $72,2 \times 10^3$, 266×10^3 e 487×10^3 g.mol $^{-1}$. Para as análises a fase móvel utilizada foi uma solução de nitrito de sódio 0,1 mol/L contendo azida de sódio 100 ppm/L, com fluxo controlado de 0,6 mL/min, a 25 °C, controladas por bomba WATERS 515. As amostras foram previamente filtradas em membrana Polietersulfona (PES) de 0,22 μm . Os cromatogramas foram coletados e analisados no software ASTRA versão 4.5.0 (WYATT, 1993).

As análises de infravermelho foram realizadas no Departamento de Farmácia da UFPR no espectrômetro Bruker FT-IR ALPHA, incorporado a transformada de Fourier, com acessório de reflectância total atenuada. Os resultados obtidos foram expressos em número de ondas (cm^{-1}), de acordo com a posição das bandas de absorção observadas. Para realização das análises,

as amostras utilizadas encontravam-se em estado sólido pulverizado, com o aparelho operando no modo refletivo (ATR). Os espectros obtidos foram analisados através do software OPUS Viewer 6.5 (Bruker).

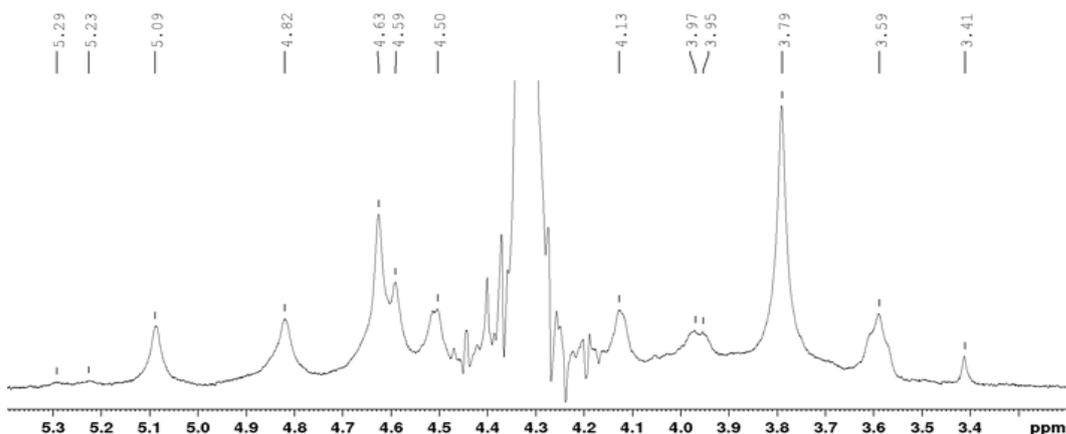
Os teores de nitrogênio e carbono foram obtidos através de análise elementar por combustão, com o auxílio do analisador CHNOS, marca ELEMENTAR, modelo VARIO EL III ou Perkin Elmer CHN 2400. As análises foram realizadas utilizando entre 10 a 20 mg das amostras liofilizadas e os resultados foram obtidos em g% (g de nitrogênio ou carbono / 100 g de amostra). As análises foram realizadas no laboratório de biogeoquímica e nutrição de plantas, do Departamento de Solos e Engenharia Agrícola do Setor de Ciências Agrárias (UFPR).

As análises do teor de cloro foram realizadas através do método de Schöniger, realizada através da combustão da amostra orgânica em ambiente fechado e titulação com AgNO_3 .

9. RESULTADOS E DISCUSSÃO

9.1 OBTENÇÃO DA FRAÇÃO KCD A PARTIR DA HIDRÓLISE ÁCIDA PARCIAL DE KC

A caracterização por meio de RMN- ^1H da fração KC (FIGURA 19) indicou que o polissacarídeo extraído correspondia aos padrões típicos para κ -carragenana extraída da alga *K. alvarezii*, onde este geralmente apresenta em sua constituição majoritária a *Kappa*-carragenana com sinal anomérico pertencente a unidade DA-1 em 5,09 ppm. Contudo, pequenas quantidades de *lota*-carragenana e o precursor *mu*-carragenana estão presentes com sinais anoméricos referentes as díades D6S-1 em 5,20 ppm e DA2S-1 em 5,30 ppm. Foram também encontradas pequenas quantidades de 6-O-Metil na unidade G4S em 3,41 ppm (VAN DE VELDE et al., 2005; COSENZA et al., 2017).

FIGURA 19 – ESPECTRO DE RMN-¹H DA FRAÇÃO KC.

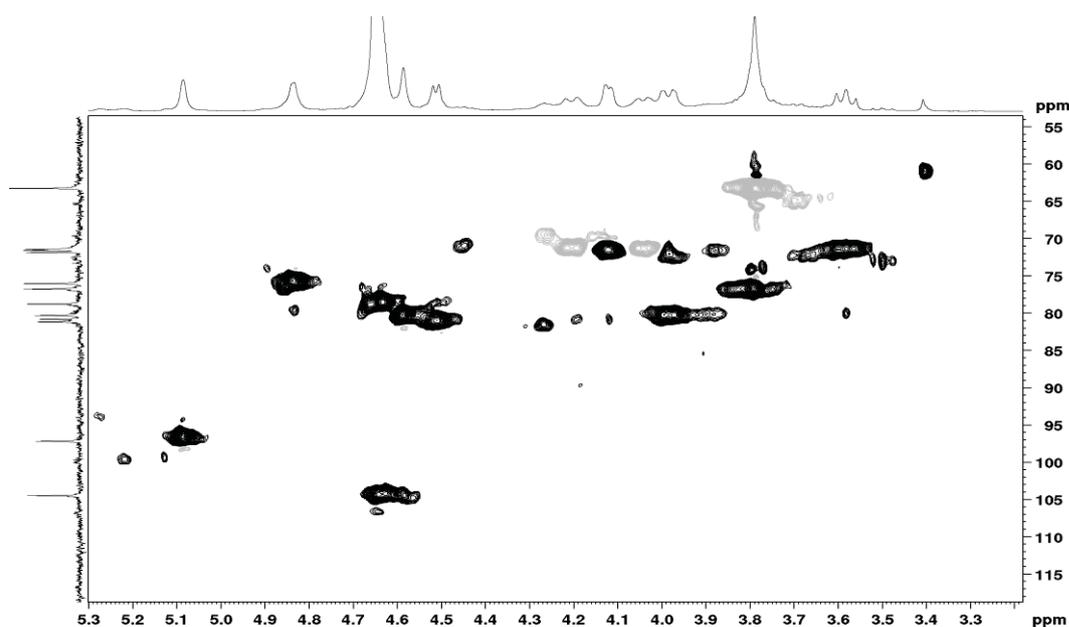
Realizado a 70 °C em D₂O, padrão interno acetona $\delta = 2,208$ ppm.

A fração KC apresentou um alto grau de polimerização, com massa molar média de 487.800 g/mol (ARTIGO 1) e alta capacidade gelificante. Dessa forma, foi decidido realizar a hidrólise ácida parcial de KC, para obtenção de uma fração de menor capacidade gelificante e conseqüente menor *M_w*, o que poderia facilitar a inserção de grupamentos tosil a estrutura da carragenana devido à maior solubilidade do polímero no meio reacional. Para esta HAP foram utilizadas metodologias disponíveis na literatura científica que demonstram a hidrólise seletiva das ligações glicosídicas α -1 \rightarrow 3 entre a unidade DA-G4S utilizando ácido Trifluoroacético (TFA), preservando as unidades 3,6-anidrogactose (STEVENSON; FURNEAUX, 1991; DUCATTI et al., 2011). Deste modo, foi realizada uma curva de hidrólise, com TFA 0,1 mol/L à 65 °C, utilizando os tempos de 15, 30, 45 e 60 minutos (ARTIGO 1). A HAP da fração KC (10 g) foi realizada utilizando TFA 0,1 mol/L à 65 °C por 15 minutos, tempo que demonstrou ser suficiente para diminuir consideravelmente a propriedade gelificante do polissacarídeo. Após *work-up* e purificação descritos na metodologia foi obtida a fração KCD (4,7 g ou 47%). Esta fração apresentou maior solubilidade em água que a fração nativa KC, e foi utilizada como material inicial para as reações de tosilação.

A caracterização da fração KCD foi realizada através dos espectros de RMN – ¹H, ¹³C e HSQC (FIGURA 20), onde é possível observar principalmente o sinal referente ao C1/H1 da unidade DA-1 em 5,09/97,3 ppm referente a díade da κ -carragenana e a presença em menor proporção dos menores constituintes, com os deslocamentos em 5,27/93,8 ppm e 5,22/99,6 ppm referentes ao C1/H1

das unidades DA2S-1 e D6S-1 das díades de ι - e μ -carragenanas, respectivamente, que são comumente encontrados para o polissacarídeo extraído da *K. alvarezii* (COSENZA et al., 2017). Foi observada também a presença da unidade de 3,6-anidrogactitol, com os deslocamentos de H1/C1, H3/C3, H4/C4 em 3,68-3,63/65,1, 3,90/85,25 e 4,18/89,54, respectivamente (DUCATTI, 2009; FIGUEIREDO, 2013).

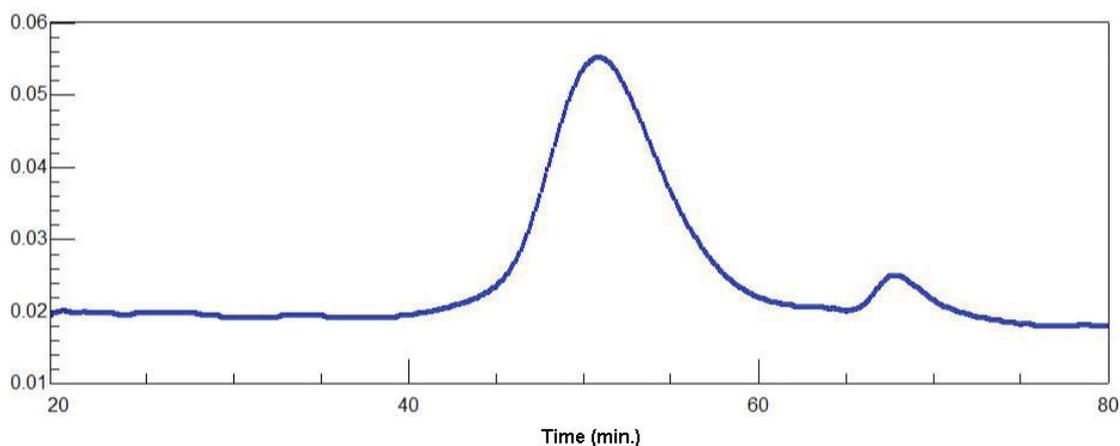
FIGURA 20 - MAPA DE CORRELAÇÃO ^1H - ^{13}C HSQC-EDITADO DA FRAÇÃO KCD.



Realizado a 40 °C em D₂O, padrão interno acetona $\delta = 2,208$ ppm para ^1H e $\delta = 32,69$ ppm para ^{13}C .

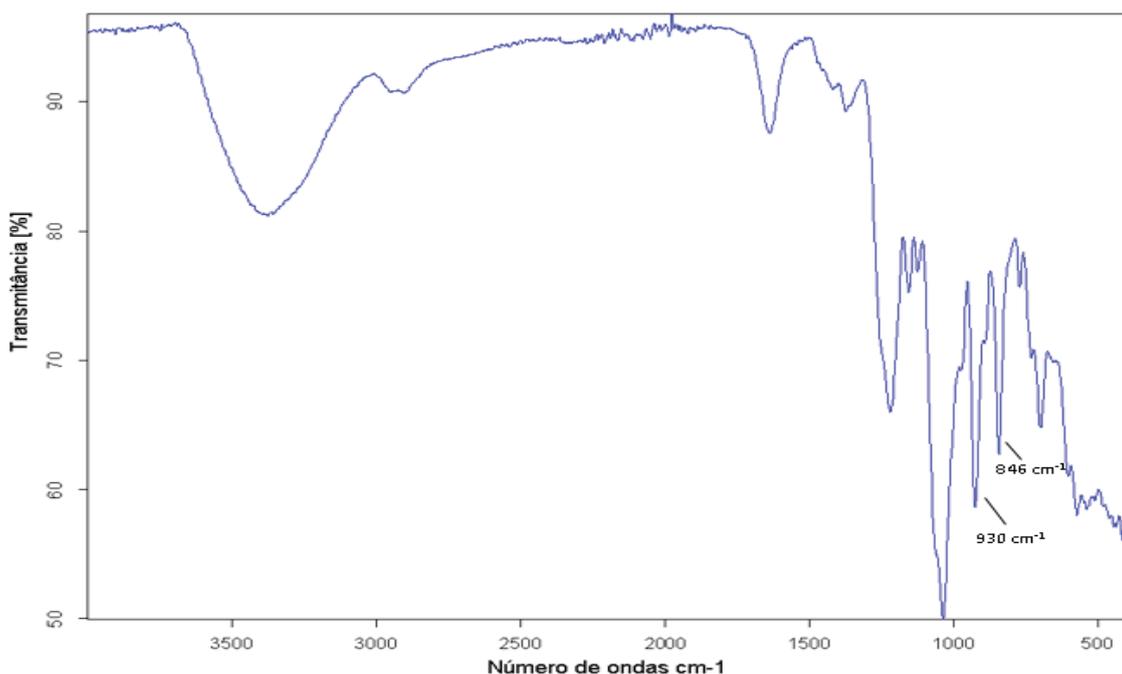
A determinação de massa molar da fração KCD foi realizada por cromatografia de exclusão estérica em HPSEC-MALLS-RID (FIGURA 21), utilizando os tempos de retenção fornecidos pelo detector de índice de refração e comparando com uma curva padrão de dextrana (5.000 a 487.000 g/mol). Deste modo a massa molar média calculada para esta fração foi de 41.660 g/mol, onde o tempo de retenção foi de 50,83 minutos.

FIGURA 21 – CROMATOGRAMA DA FRAÇÃO KCD, OBTIDO POR CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO ESTÉRICA (HPSEC-MALLS-RID).



A análise do espectro FTIR obtido desta fração apresentou os sinais característicos e compatíveis com a literatura para a κ -carragenana, onde foram observadas as bandas de estiramento em 846 cm^{-1} (vibração C4-O-S) da unidade β -D-Galp-4-sulfato e em 930 cm^{-1} (vibração C-O-C) da ponte da 3,6-anidro-D-Galp (SEKKAL et al., 1993; PEREIRA; GHEDA; RIBEIRO-CLARO, 2013).

FIGURA 22 - ESPECTRO DE FTIR DA FRAÇÃO KCD.



9.2 TOSILAÇÃO DA FRAÇÃO KCD

9.2.1 TOSILAÇÃO DE KCD EM SOLVENTE ORGÂNICO.

A reação de tosilação já foi estudada utilizando polissacarídeos como a celulose, dextrana e a agarose, com grau de substituição (DS) entre 0.1 e 2.3 (HEINZE; LIEBERT; KOSCHELLA, 2006; SCHMIDT; LIEBERT; HEINZE, 2014; GERICKE; HEINZE, 2015; HEUKO, 2015). Estes estudos demonstraram boa eficiência da inserção de grupos tosil na cadeia polissacarídica utilizando reações em meio orgânico, principalmente em dimetilacetamida com cloreto de lítio (DMAc/LiCl). Para reações conduzidas a baixa temperatura (25 °C) foi reportado que não ocorre a formação de subprodutos cloro-desóxi, ou insolúveis, este último devido a ligação cruzada entre as cadeias poliméricas promovida pelas reações das hidroxilas e do grupo tosil inserido (HEINZE; LIEBERT; KOSCHELLA, 2006; SCHMIDT; LIEBERT; HEINZE, 2014; GERICKE; HEINZE, 2015). Deste modo, as primeiras reações realizadas com a fração KCD foram similares as descritas nestes trabalhos e foram conduzidas em solvente orgânico.

Para aumentar a solubilidade da *Kappa*-carragenana em solvente orgânico, De Araújo et al. (2013) realizaram a troca do contra-íon da carragenana pelo íon trietilamônio, deste modo a reação conduzida em seu experimento de sulfatação foi homogênea e bem-sucedida. De maneira similar, algumas reações foram realizadas em solvente orgânico, substituindo o contra-íon da fração KCD para a melhor solubilização nestes solventes. As reações KCDST-1 e 3 foram realizadas com o contra-íon trietilamônio (TABELA 11), onde estas reações foram realizadas nos solventes DMAc e DMF, respectivamente. A reação KCDST-1 foi realizada ainda com o adicional do surfactante cetavlon (2 eq.) para potencializar a solubilidade da carragenana no solvente orgânico utilizado. Os demais parâmetros reacionais foram iguais para da reação KCDST-3, utilizando as mesmas proporções de reagente, base, tempo e temperatura. Através da análise por RMN-¹H, realizada utilizando DMSO-d₆, os sinais em região anoméricas de 4,91 a 5,30 ppm, correspondentes as unidades alfa, foram integradas com os sinais referentes ao anel aromático do grupamento tosil de 7,05 a 8,00 ppm e então aplicada a fórmula para o cálculo do (DS_(ar)). Deste

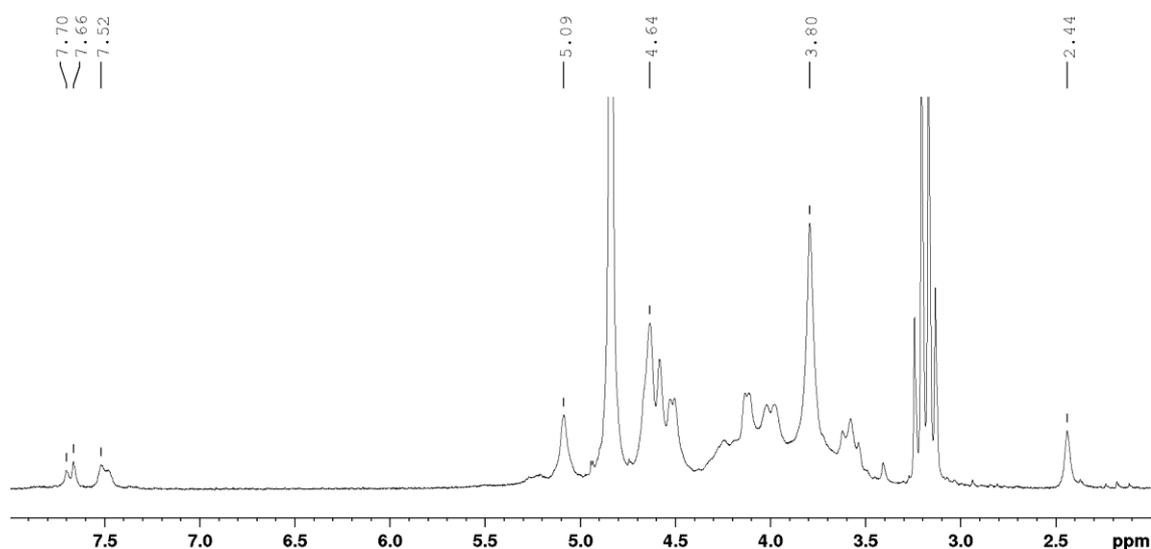
modo, a reação KCDST-1 apresentou maior eficiência, onde alcançou um $DS_{(ar)}$ igual a 0.22 (FIGURA 23). De um modo geral, esta reação alcançou o maior DS dentre as reações realizadas em solvente orgânico.

TABELA 11 – CONDIÇÕES DE REAÇÃO SELECIONADAS COMO EXEMPLO PARA A TOSILAÇÃO EM MEIO ORGÂNICO DE KCD.

Reações								RMN - 1H
Amostra	Solv.	Contra- íon	Cetav. (2 eq.)	Base	Tempo (h)	Temp. (°C)	Recup. (%)	$DS_{(ar)}$
KCDST-1	DMAc	Et ₃ N	Sim	Et ₃ N	24	30	50	0.22
KCDST-2	DMAc	Cetav.	-	Et ₃ N	24	30	71	0.02
KCDST-3	DMF	Et ₃ N	-	Et ₃ N	24	30	32	0
KCDST-4	DMF	Na ⁺	Sim	Et ₃ N	24	30	70	0.02
KCDST-5	DMF	Pirid.	-	Pirid.	24	30	64	0

Reações realizadas com 6 eq. de cloreto de tosila e 12 eq. de Et₃N ou piridina. Foi considerado 1 eq. = contra-íon sódio (408,3 g/mol), trietilamônio (487,5 g/mol), piridônio (465,4 g/mol) e cetavlon (669,8 g/mol). Recuperação= massa (mg) recuperada da reação após liofilização.

Outras tentativas de tosilação em meio orgânico foram realizadas, inclusive com a troca do contra-íon por cetavlon (KCDST-2) e com o contra-íon piridônio (KCDST-5), frações que permitiram uma excelente solubilização de KCD no meio reacional. Foi realizada também uma reação com o contra-íon sódio (KCDST-4), que se apresentou menos eficaz para a solubilização de KCD no meio reacional, contudo, nenhuma das estratégias foram eficientes para realizar a reação de tosilação de maneira satisfatória em solvente orgânico (TABELA 11). Algumas outras reações em solvente orgânico também foram realizadas com o polissacarídeo nativo em sua forma sódica e com a troca de contra-íon na forma de sal de trietilamônio, contudo, estas reações não apresentaram sucesso (dados não apresentados). Apesar do insucesso inicial desta reação em meio orgânico, é válido salientar que não foram esgotadas as formas de serem realizadas as reações, podendo ainda, de alguma forma, ser possível realizar esta reação em meio orgânico de maneira homogênea.

FIGURA 23 - ESPECTRO DE RMN-¹H DA AMOSTRA KCDST-1.

Realizado a 25 °C em D₂O, sem padrão interno, deslocamentos ajustados pelo sinal anomérico DA-1 em 5,09 ppm.

9.2.2 TOSILAÇÃO DE KCD EM ÁGUA/ACETONITRILA.

As carragenanas, por serem polissacarídeos aniônicos, possuem uma boa solubilidade em água, e como relatado anteriormente houveram dificuldades em se realizar a tosilação deste polissacarídeo em solvente orgânico, até mesmo nos solventes amplamente eficientes no processo de conversão de polissacarídeos em ésteres sulfonados, como o DMAc e DMF (HEINZE; LIEBERT; KOSCHELLA, 2006; GERICKE; HEINZE, 2015). Deste modo, as novas reações foram conduzidas em meio aquoso, pela boa solubilidade do polissacarídeo neste solvente. Além disso, existem dados em literatura que indicam que a água pode ser usada para a realização da reação de tosilação, contudo utilizando como base o NaOH e não a Et₃N (HEINZE; LIEBERT; KOSCHELLA, 2006; ELCHINGER et al., 2012).

A utilização de acetonitrila em conjunto com a porção aquosa baseou-se em dados publicados anteriormente para esta reação, onde a agarose foi tosilada e apresentou um bom grau de substituição em meio aquoso/acetonitrila, alcançando um DS máximo de 0.82. Contudo a acetonitrila foi utilizada apenas como um solvente para o reagente cloreto de tosila com o objetivo de diluir este reagente, permitindo adicioná-lo vagarosamente na reação (HEUKO, 2015). Deste modo, as primeiras reações KCDT-1, KCDT-2 e KCDT-3 (TABELA 12)

foram realizadas com uma maior proporção de água em relação a acetonitrila. Nas reações KCDT-1 e 2, a base utilizada foi o NaOH e a variável foi o tempo reacional, sendo estes, 3 h e 24 h respectivamente (TABELA 12).

TABELA 12 - CONDIÇÕES DE REAÇÃO SELECIONADAS PARA A TOSILAÇÃO EM MEIO ÁGUA/ACETONITRILA DE KCD.

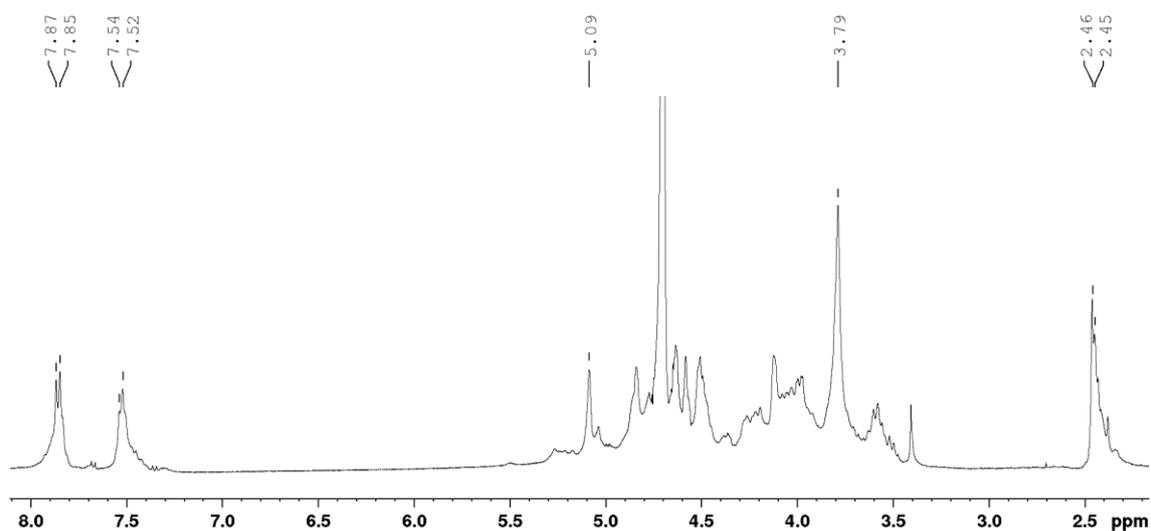
Amostra	REAÇÕES						RMN - ¹ H	RMN - HSQC				
	H ₂ O:ACN	NaCl	Base	Tempo (h)	Temp. °C	Recup. (%)	DS _(Ar)	DS _{Soma}	DS _{G4S,6T}	DS _{DA,2T}	DS _{G4S,2T}	DS _{Dess.}
KCDT-1	4:1	Não	NaOH ^a	3	Amb.	96	0.52	0.22	0.22	0	0	0
KCDT-2	6:1	Não	NaOH ^a	24	30	52	0.28	0.07	0.07	0	0	0
KCDT-3	6:1	Não	Ca(OH) ₂ ^b	4	30	90	0.34	0.16	0	0.16	0	0
KCDT-4	1:3	Não	NaOH ^a	5	Amb.	96	0.63	0.31	0.31	0	0	0
KCDT-5*	1:3*	Não	NaOH ^a	5	Amb.	74	0.38	0.13	0.13	0	0	0
KCDT-6	1:3	Não	NaOH ^a	5	0	58	1.4	0.51	0.39	0.05	0.07	0.91
KCDT-7	1:3	Sim	NaOH ^a	5	0	127	2.08	0.95	0.63	0.20	0.12	0
KCDT-8	1:3	Sim	NaOH ^c	5	0	68	1.38	0.57	0.52	0.05	0	0.5
KCDT-9	3:1	Sim	NaOH ^a	5	0	70	1.4	0.34	0.34	0	0	0
KCDT-10	1:3	Não	Ca(OH) ₂ ^b	5	0	102	1.19	0.74	0.34	0.40	0	0.86

* Reação realizada com o solvente DMF ao invés de acetonitrila. A = Reação realizada com 10 eq. de cloreto de tosila e 20 eq. de NaOH. B = Reação realizada com 10 eq. de cloreto de tosila e 10eq. de Ca(OH)₂. C = Reação realizada com 7 eq. de cloreto de tosila e 14 eq. de NaOH. Foi considerado 1 eq. = 408,3 g/mol (forma sódica). Recuperação = massa (mg) recuperada da reação após liofilização.

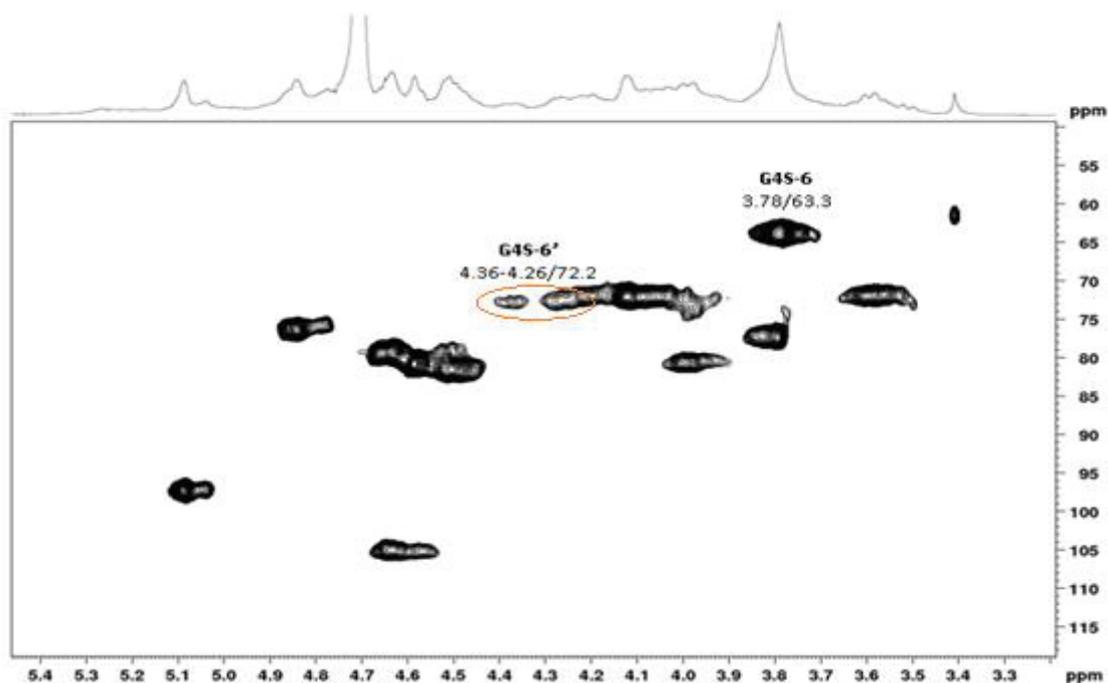
Após as primeiras reações, foi possível observar o sucesso destas através de RMN-¹H, pois a reação KCDT-1 (FIGURA 24) apresentou uma quantidade significativa de grupamentos aromáticos em relação ao sinal anoméricos, do polissacarídeo DS_(ar) = 0.52 (TABELA 12). Contudo, por relatos em literatura deste polissacarídeo ser usado em formulações para “*drug-delivery*” (LI et al., 2014), foi levado em consideração a possibilidade de parte do reagente utilizado estar interagindo com o polissacarídeo, não permitindo a completa purificação do produto final. Deste modo, este DS_(ar) foi contado apenas como um indicativo de sucesso da reação, sendo necessária a verificação da efetiva ligação do polissacarídeo com o grupamento tosil através dos deslocamentos químicos da região polissacarídica, que podem ser obtidos através do RMN-¹³C ou HSQC. As análises utilizando o mapa de correlação bidimensional RMN-HSQC demonstraram ser uma melhor escolha para o

acompanhamento das reações, pois não ocorre a sobreposição de sinais imprescindíveis para comprovar a modificação química. Deste modo, foi verificado para as duas primeiras reações (KCDT-1 e KCDT-2), que a reação KCDT-1, a qual foi conduzida em menor tempo, apresentou uma maior recuperação e um maior grau de substituição total, $DS_{\text{soma}} = 0.22$, sendo a sua substituição predominante na posição C6 da unidade G4S, como pode ser observado na FIGURA 25. A única modificação encontrada no mapa de correlação de RMN-HSQC foi em relação ao “ α -shift” do H6/C6 da unidade G4S-6' (tosilada) em 4,36-4,26/72,2 ppm, não sendo encontrado sinais de tosilacção em outras posições. Já a reação KCDT-2 apresentou um baixo grau de substituição e não apresentou modificação em relação a KCD no mapa de correlação de RMN-HSQC (TABELA 12).

FIGURA 24 – ESPECTRO DE RMN- ^1H DA AMOSTRA KCDT-1.

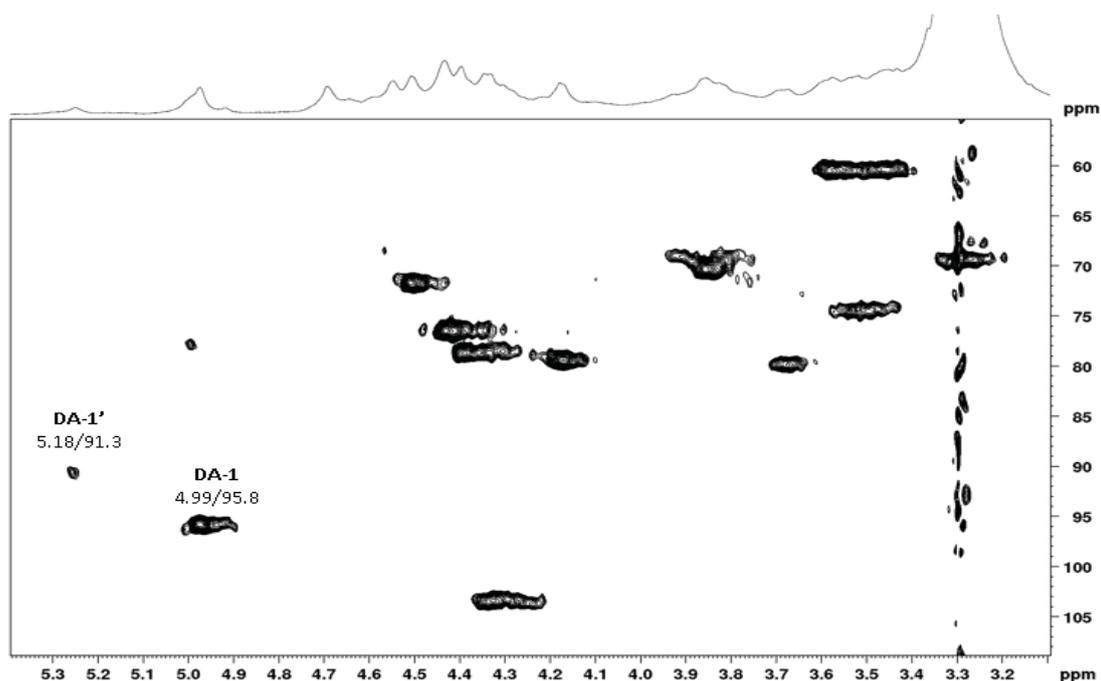


Realizado a 30 °C em D_2O , sem padrão interno, deslocamentos ajustados pelo sinal anomérico DA-1 em $\delta = 5,09$ ppm.

FIGURA 25 - MAPA DE CORRELAÇÃO DE ^1H - ^{13}C HSQC DA AMOSTRA KCDT-1.

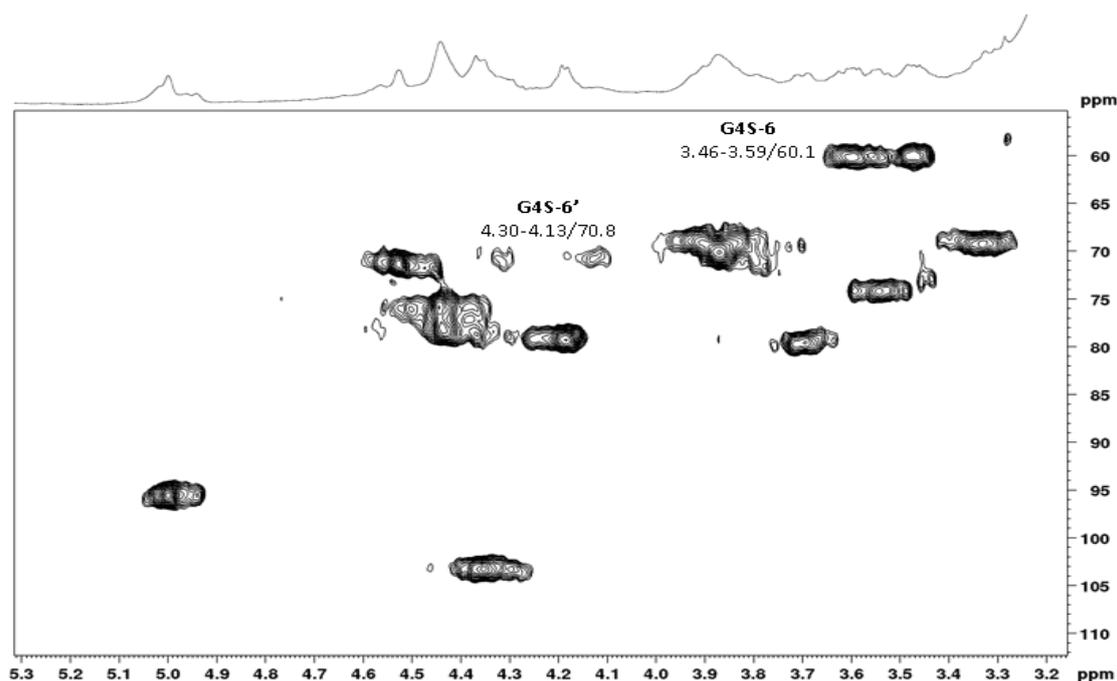
Realizado a 30 °C em D_2O , sem padrão interno, deslocamentos ajustados pelo sinal anômérico DA-1 em $\delta = 5,09$ ppm para ^1H e $\delta = 97,3$ ppm para ^{13}C .

A reação KCDT-3 também foi conduzida com uma maior proporção de água em relação a acetonitrila, contudo, a base utilizada foi $\text{Ca}(\text{OH})_2$, com o objetivo de analisar o efeito do íon cálcio na reação. Supreendentemente, foi observada uma mudança na regioselectividade da reação, onde a tosilação foi aumentada em DA-2. Isto pode ser evidenciado pelo “ β -shift” da correlação H1/C1 de DA-1, que desloca de 4,99/95,8 ppm para 5,18/91,3 ppm DA-1’ (FIGURA 26). Este padrão se repetiu com a reação KCDT-10, a qual a base utilizada também foi o $\text{Ca}(\text{OH})_2$, com a variação da temperatura e aumento da proporção de acetonitrila na mistura reacional. Existe na literatura o relato apenas do uso do LiCl com a capacidade de modificar a regioselectividade da reação de tosilação, como no caso da agarose, em que o uso do LiCl aumentou a tosilação em C2 da unidade LA, contudo este sal é monovalente, a agarose é um polissacarídeo neutro e este polímero foi tosilaado em solvente orgânico.(GERICKE; HEINZE, 2015).

FIGURA 26 - MAPA DE CORRELAÇÃO DE ^1H - ^{13}C HSQC DA AMOSTRA KCDDT-3.

Realizado a 70 °C em DMSO- d_6 , padrão interno acetona $\delta = 2,09$ ppm para ^1H e $\delta = 30,56$ ppm para ^{13}C .

A fim de melhorar o grau de DS, foram analisadas na literatura outras reações de tosilção conduzidas em meio aquoso. Schmidt et al. (2014), na tosilção da celulose, obtiveram êxito reduzindo a temperatura da reação em solução aquosa e encontraram como um tempo excelente 5 h de reação. Deste modo, as reações KCDDT-4 e 5 foram conduzidas em temperatura ambiente em 5 h. Para essas reações, também, foi modificado a proporção de água e solvente orgânico (acetonitrila ou DMF), passando a ser empregado a proporção 1:3. A reação KCDDT-4 (FIGURA 27), a qual foi utilizado acetonitrila como solvente orgânico, apresentou maior grau de substituição $\text{DS}_{\text{soma}} = 0,31$, que a reação KCDDT-5 ($\text{DS}_{\text{soma}} = 0,13$) conduzida com DMF como solvente orgânico, contudo, ambas reações KCDDT-4 e KCDDT-5 foram seletivas, tosilando apenas a unidade G4S-6.

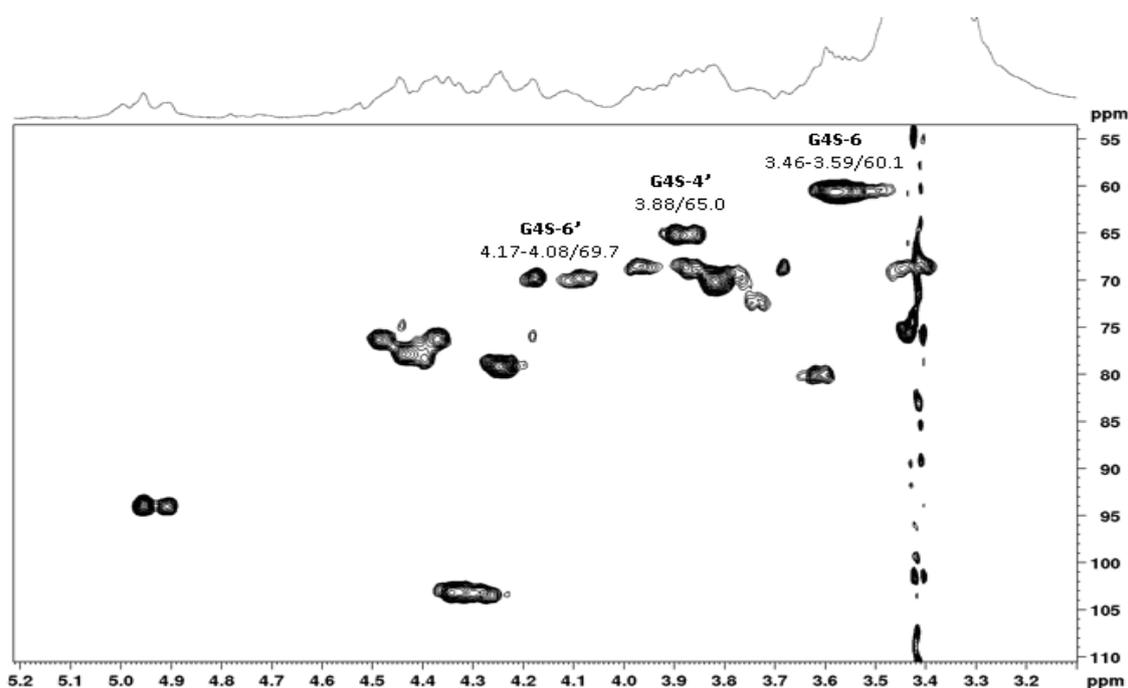
FIGURA 27 - MAPA DE CORRELAÇÃO DE ^1H - ^{13}C HSQC DA AMOSTRA KCDT-4.

Realizado a 70 °C em DMSO- d_6 , padrão interno acetona $\delta = 2,09$ ppm para ^1H e $\delta = 30,56$ ppm para ^{13}C .

Diante do êxito obtido nas reações em temperatura ambiente, foram realizadas reações à 0 °C a fim de verificar se ocorreria o aumento do DS. Para isso, a reação KCDT-6 foi conduzida à 0 °C, com uma proporção de água e acetonitrila (1:3), utilizando NaOH como base e sem adição de NaCl. Nestas condições, a reação KCDT-6 demonstrou um aumento significativo do DS, atingindo o valor de $\text{DS}_{\text{soma}} = 0,51$. Apesar do resultado satisfatório, esta reação apresentou algumas desvantagens, sendo elas as tosilações nas posições DA-2 e G4S-2, as quais foram detectadas por meio do “ β -shift” da correlação C1/H1 de DA-1 e G4S-1 (FIGURA 28). Além disso, foi observada considerável dessulfatação da unidade G4S, a qual pôde ser identificada através da diminuição da correlação em 4,52/71,4 ppm, correspondente a C4/H4 da unidade de G4S-4 e aparecimento da correlação em 3,88/65,0 ppm, correspondente ao C4/H4 das unidades dessulfatadas (G) (VAN DE VELDE et al., 2002; KOLENDER; MATULEWICZ, 2004). Os sinais de tosilação no C6 desta unidade dessulfatada e tosilada (G,6T) diferem dos sinais da tosilação no C6 da unidade sulfatada (G4S,6T), onde os sinais de G,6T-6 foram localizados em 4,17-4,08/69,7 ppm e os sinais de G4S,6T-6 foram localizados em 4,30-

4,13/70,8 ppm. Aparentemente, esta reação de tosilção quando conduzida em meio aquoso e na presença de NaOH tende a ser menos seletiva que as reações realizadas em solvente orgânico como DMAc, onde relatos na literatura demonstram que a agarose, por exemplo, alcança um DS de 0.8 com uma boa seletividade (GERICKE; HEINZE, 2015), diferentemente da celulose tosilada em solvente aquoso que não apresentou boa seletividade com grau de substituição elevado (SCHMIDT; LIEBERT; HEINZE, 2014).

FIGURA 28 - MAPA DE CORRELAÇÃO DE ^1H - ^{13}C HSQC DA AMOSTRA KCDT-6.



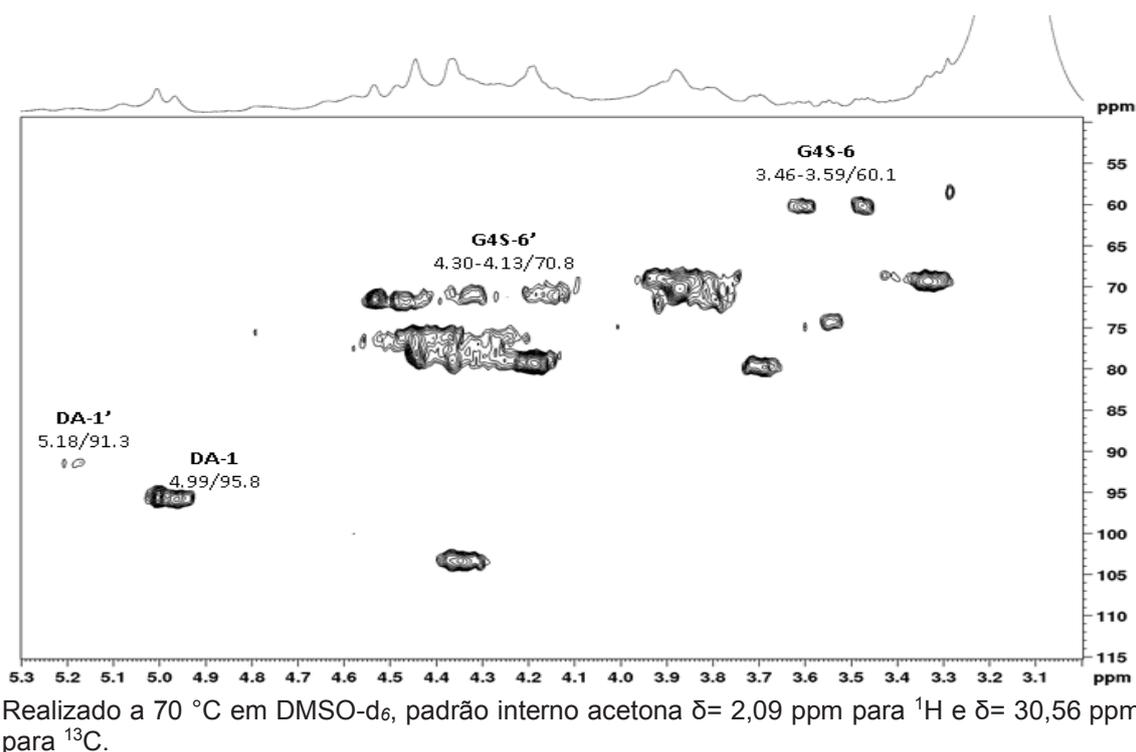
Realizado a 70 °C em DMSO- d_6 , padrão interno acetona $\delta = 2,09$ ppm para ^1H e $\delta = 30,56$ ppm para ^{13}C .

Os resultados até então observados demonstravam que realizar as reações com uma proporção de água e acetonitrila (1:3), NaOH, à uma temperatura de 0 °C pelo tempo de 5 h eram as condições mais adequadas para se obter um alto grau de substituição (DS). A presença de uma maior quantidade de acetonitrila foi benéfica para a reação, o que pode ser justificado pelo aumento de solubilidade do produto tosilado neste solvente, diminuindo a interação deste com o nucleófilo abundante da reação (OH^-). Outra possibilidade seria a menor degradação do cloreto de tosilato nesta mistura, pois é conhecida a sua degradação em meio aquoso na presença de NaOH. A baixa temperatura demonstrou ser benéfica também na reação de tosilção da celulose (SCHMIDT;

LIEBERT; HEINZE, 2014), onde possivelmente a temperatura baixa diminui a degradação do cloreto de tosila em água, disponibilizando uma maior quantidade de reagente.

Relatos da literatura que a adição de NaCl pode aumentar o grau de substituição da reação de tosilação, sem afetar significativamente a sua regioseletividade, contudo, sem especificar exatamente este mecanismo (ELCHINGER et al., 2012; GERICKE; HEINZE, 2015), levaram a adicionar este sal na condução da reação KCDT-7. O produto recuperado desta reação apresentou o maior grau de DS encontrado dentre todas as reações, $DS_{\text{soma}} = 0.95$ e $DS_{\text{G4S,6T}} = 0.63$. Contudo, esta reação não foi totalmente seletiva, e apresentou tosilações em DA-2 e G4S-2. A dessulfatação pôde ser controlada ao promover agitação vigorosa do meio reacional e adição da base e do cloreto de tosila sem grande espaço de tempo (FIGURA 29).

FIGURA 29 - MAPA DE CORRELAÇÃO DE ^1H - ^{13}C HSQC DA AMOSTRA KCDT-7.

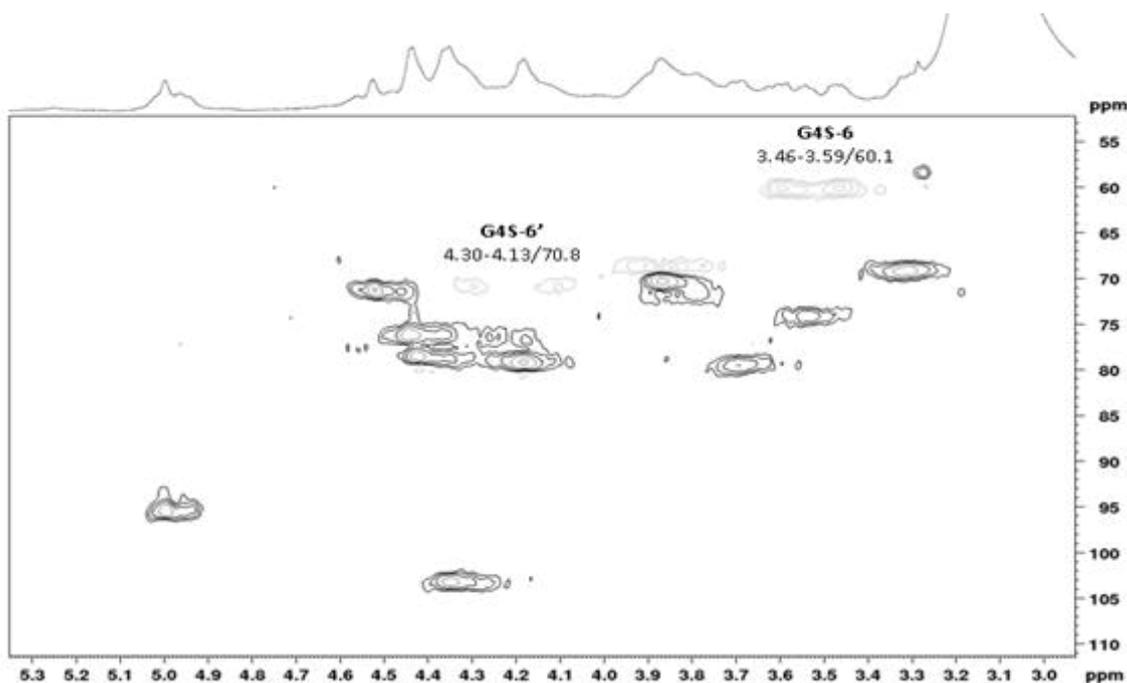


Com o objetivo de alcançar uma maior seletividade, a reação KDCT-8, a qual apresenta as mesmas condições reacionais de KCDT-7, exceto pela diminuição da proporção de cloreto de tosila para 7 eq. e de NaOH para 14 eq., foi observado uma diminuição da tosilação em todas as posições, onde a

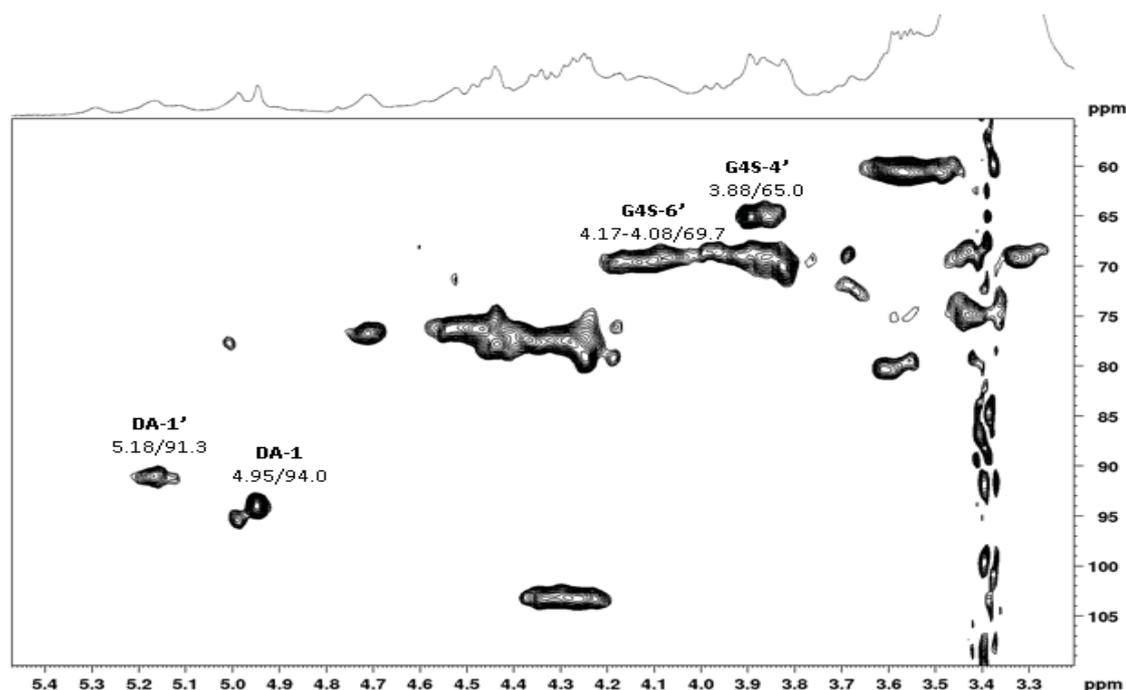
unidade DA-2 apresentou um $DS_{DA,2T}$ de 0.05 e a unidade G4S-6 teve um $DS_{G4S,6T}$ de 0.52 (TABELA 12).

A reação KCDT-9 foi realizada nas mesmas condições de KCDT-7, exceto pela inversão das proporções de água e de acetonitrila, sendo esta de 3:1. Esta reação apresentou um menor grau de substituição, com $DS_{soma} = 0.34$ (FIGURA 30) evidenciando o efeito benéfico da maior proporção de acetonitrila em relação a água, já que esta reação utiliza maior proporção de água e teve menor DS. A reação KCDT-10 foi realizada nas mesmas condições de KCDT-7, variando a base, sendo esta o $Ca(OH)_2$ e sem a adição de sal (NaCl). Esta reação apresentou um bom grau de substituição com $DS_{soma} = 0.74$, contudo, semelhantemente a reação KCDT-3, ocorreu alteração da regioseletividade, aumentando a proporção de tosilção na unidade DA-2 com $DS_{DA,2T} = 0.40$ (FIGURA 31).

FIGURA 30 - MAPA DE CORRELAÇÃO DE 1H - ^{13}C HSQC-EDITADO DA AMOSTRA KCDT-9.



Realizado a 70 °C em DMSO- d_6 , padrão interno acetona $\delta = 2,09$ ppm para 1H e $\delta = 30,56$ ppm para ^{13}C .

FIGURA 31 - MAPA DE CORRELAÇÃO DE ^1H - ^{13}C HSQC DA AMOSTRA KCDT-10.

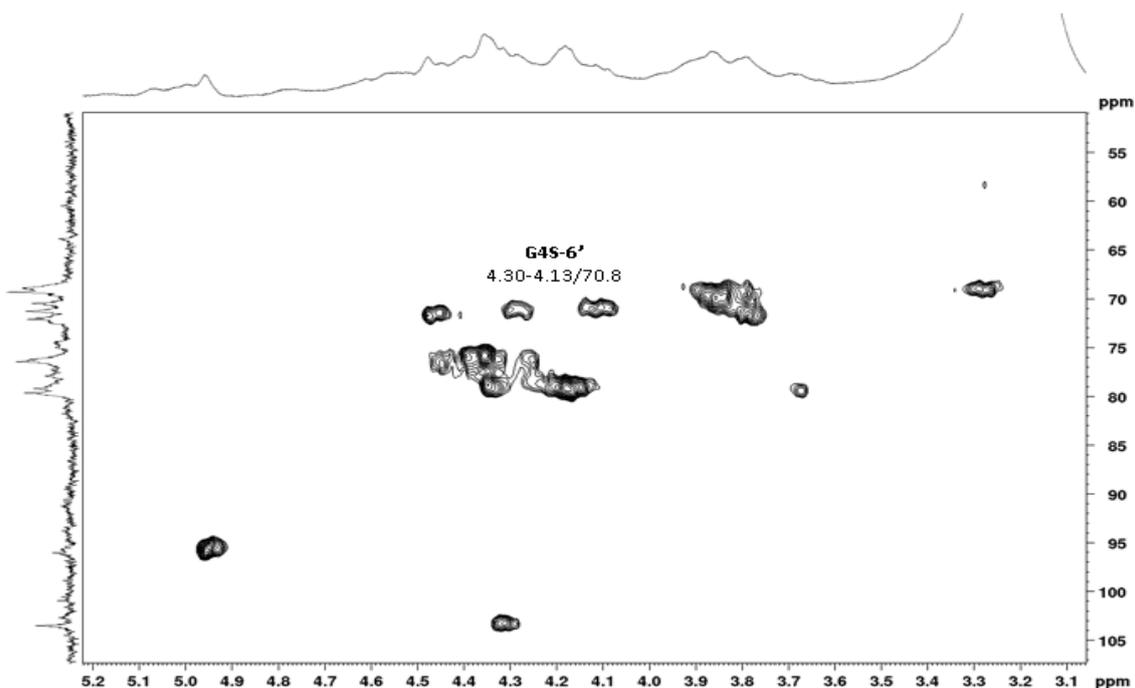
Realizado a 70 °C em DMSO- d_6 , padrão interno acetona $\delta = 2,09$ ppm para ^1H e $\delta = 30,56$ ppm para ^{13}C .

A partir dos dados obtidos através das reações testes (TABELA12) foi decidido realizar a reação de tosilção de KCD em escala preparativa com 2 g do polissacarídeo, utilizando as condições da reação KCDT-7, por apresentar o maior DS. Esta reação obteve um rendimento final de 127% ou 2,54 g e foi denominada de KCDTP. No espectro de RMN-HSQC (FIGURA 32) foi possível observar somente a correlação referente ao C6 tosilado da unidade G4S (G4S,6T) em 4,30-4,13/70,8 ppm, indicado completa tosilção da posição C6 da unidade G4S, deste modo foi considerado o $\text{DS}_{\text{G4S-6T}} = 1.0$. Outro sinal que indica esta conversão é o sinal de G4S-5 em 3,53/74,0 ppm, que sofre um “ β -shift” para 3,78/71,4 ppm (G4S-5') (FIGURA 32, TABELA 13). Foi observado, também, a tosilção nas unidades DA-2 e G4S-2, sendo os DS encontrados de $\text{DS}_{\text{DA,2T}} = 0.15$, $\text{DS}_{\text{G4S,2T}} = 0.17$. Nesta fração não foram encontrados sinais referentes a dessulfatação.

TABELA 13 – DESLOCAMENTO QUÍMICO DA UNIDADE G4S DAS FRAÇÕES KCDTP, KCDA, KCDD E KCDP.

Unidade	Deslocamento Químico (ppm)					
	H1/C1	H2/C2	H3/C3	H4/C4	H5/C5	H6/C6
G4S	4,35	3,32	3,69	4,52	3,53	3,59-3,46
	103,3	69,3	79,9	71,3	74,0	60,1
G4S,6T	4,31	3,28	3,67	4,46	3,78	4,30-4,13
	103,2	69,0	79,4	71,5	71,4	70,8
G4S,6AZ	4,40	3,33	3,67	4,44	3,68	3,51-3,40
	103,4	69,0	79,8	72,4	73,0	52,0
G4S,6DI	4,49	3,37	3,74	4,57	4,03	3,43-3,37
	102,7	69,2	79,2	72,7	69,2	52,9
G4S,6PI	4,46	3,36	3,73	4,57	3,98	3,61-4,46
	102,5	69,3	79,0	72,2	69,7	55,0

FIGURA 32 - MAPA DE CORRELAÇÃO DE ^1H - ^{13}C HSQC DA AMOSTRA KCDTP.

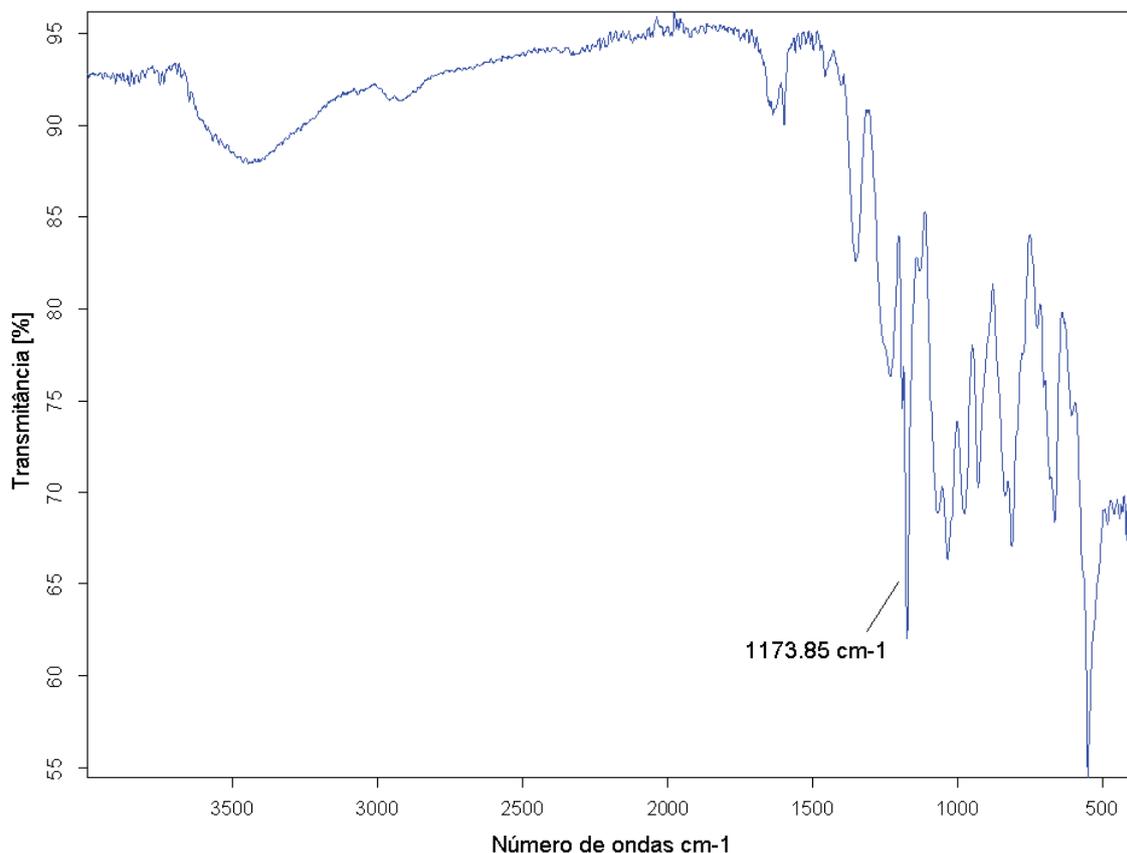


Realizado a 70 °C em DMSO- d_6 , padrão interno acetona $\delta = 2.09$ para ^1H e $\delta = 30.56$ para ^{13}C .

A fração KCDTP também foi analisada através da espectroscopia de infravermelho (FIGURA 33), onde é possível observar uma nova banda em 1173.85 cm^{-1} , referente ao estiramento simétrico da ligação do grupamento $\text{O}=\text{S}=\text{O}$ (SEKKAL et al., 1993; GERICKE; HEINZE, 2015; HEUKO, 2015), onde

esta ligação é mais uma evidência da ligação do grupamento tosila ao polissacarídeo.

FIGURA 33 – ESPECTRO DE FTIR DA FRAÇÃO KCDTP.



9.2.3 SEMISSÍNTE DOS DERIVADOS AZIDO, *N*-DIETILAMINA E PIRROLIDINA A PARTIR DA FRAÇÃO KCDTP.

Como mencionado anteriormente, o grupamento tosila é um excelente grupo de saída e permite a realização de reações do tipo *SN*₂ com grande eficiência. Para o estudo desta reação realizamos a substituição do derivado tosilado da κ -carragenana utilizando a azida, *N*-dietilamina e a pirrolidina, que são considerados três bons nucleófilos. As condições para a reação de substituição nucleofílica basearam-se em condições que foram bem-sucedidas com outros polissacarídeos (SCHMIDT; LIEBERT; HEINZE, 2014; GERICKE; HEINZE, 2015; HEUKO, 2015), que utilizam o nucleófilo em meio reacional contendo o solvente DMSO, 10 eq. de excesso do reagente, com auxílio de temperatura e pelo tempo de 24h. A carragenana tosilada (KCDTP) apresentou

uma boa solubilidade em DMSO, o que permitiu uma reação homogênea, deste modo foram realizadas as reações com azida de sódio (KCDA), com a pirrolidina (KCDP) e com a dietilamina (KCDD) (TABELA 14).

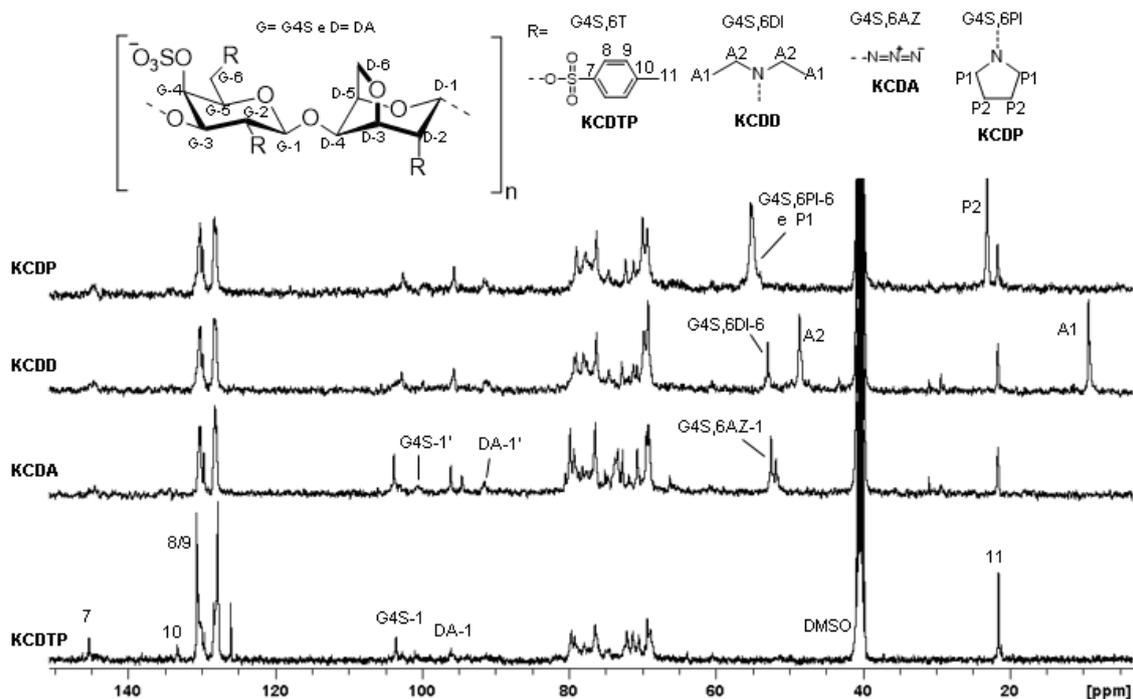
TABELA 14 – CONDIÇÕES REACIONAIS PARA A SÍNTESE DOS DERIVADOS AZIDO, *N*-DIETIL E PIRROLIDINA DE *KAPPA*-CARRAGENANA.

Amostra	Solv.	Reagente (10 eq.)	Tempo (h)	Temp. (°C)	Recup. (%)
KCDA	DMSO	NaN ₃	24	80	74
KCDP	DMSO	(CH ₂) ₄ NH	24	80	71,4
KCDD	DMSO	(C ₂ H ₅) ₂ NH	24	80	60

Reações realizadas com a fração KCDDP e considerado 1 equivalente igual a 562,5 g/mol. Concentração final de polissacarídeo 15 mg/mL.

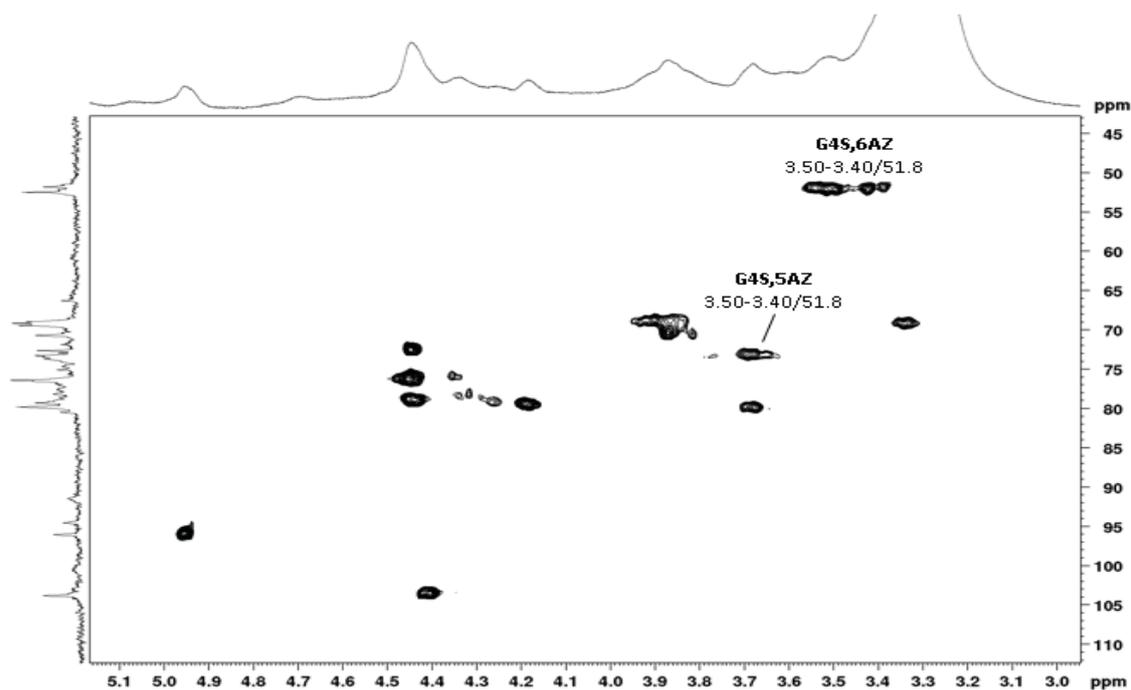
As análises dos espectros de RMN-¹³C (FIGURA 34) demonstraram a presença predominante dos grupamentos substituídos. Os sinais encontrados do C6 ligado da unidade G4S foram atribuídos, para o grupo azido (G4S,6AZ) em 52,0 ppm, dietilamina (G4S,6DI) em 52,9 ppm e pirrolidina (G4S,6PI) em 55,0 ppm, Após as reações de substituição ainda sobraram picos residuais referentes ao grupamento tosila, onde estes sinais são referentes ao grupo metil em 21,5 ppm e dos aromáticos em 130,3 ppm e 128,0 ppm, isto se deve provavelmente por ainda sobraem porções tosiladas que não foram substituídas em C2 das unidades DA e G4S, verificadas pelo deslocamento das unidades anoméricas DA-1' e G4S-1' que aparecem em 91,3 ppm e 100,2 ppm, respectivamente. A presença de grupos tosila no C2 das unidades monossacarídicas mesmo após as reações com os nucleófilos ocorre por estas posições serem sabidamente menos reativas para as reações do tipo SN2 (SCHMIDT; LIEBERT; HEINZE, 2014; GERICKE; HEINZE, 2015; HEUKO, 2015)

FIGURA 34 - COMPARATIVO ESPECTROS DE RMN-¹³C DAS FRAÇÕES KCDTP, KCDA, KCDD E KCDP.

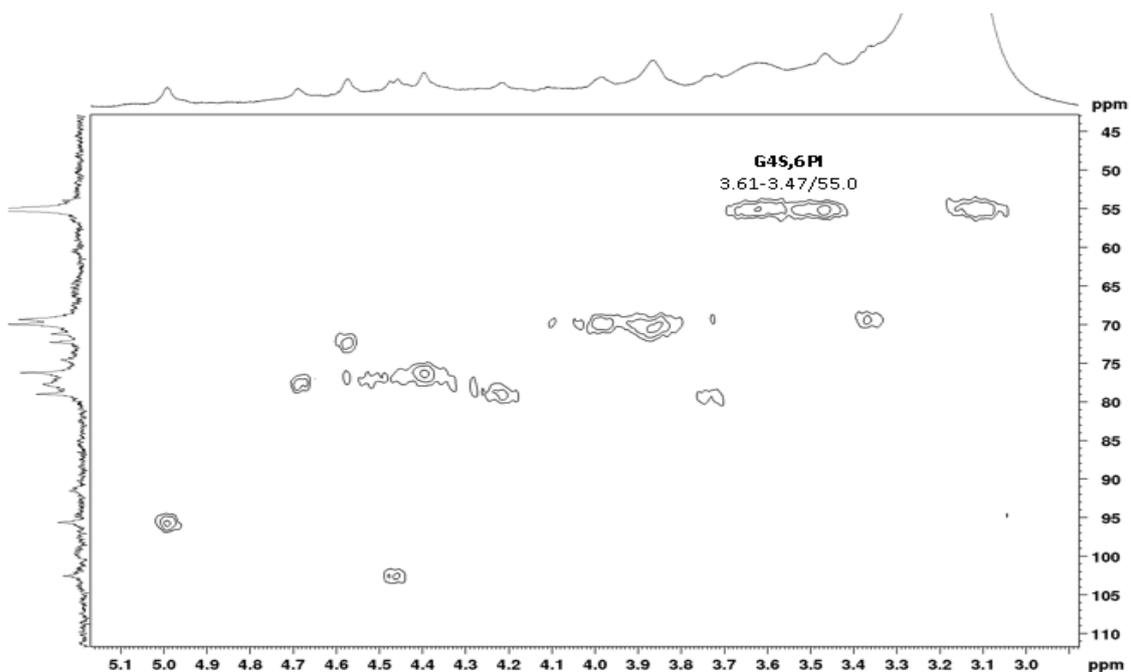


Espectros realizados a 70°C em DMSO-d₆, padrão interno DMSO, $\delta = 40,2$ ppm para ¹³C.

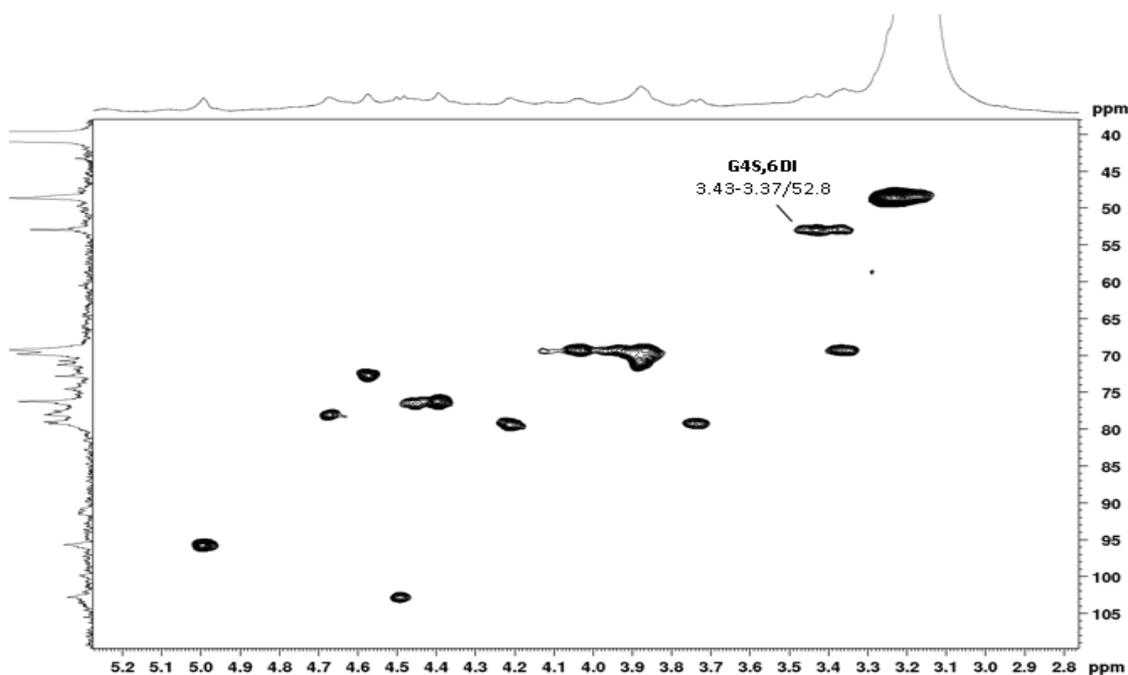
Através da análise dos espectros de RMN-HSQC também foi possível verificar uma substituição completa na posição C6 da unidade G4S, não sendo encontrado os deslocamentos de G4S,6T em 4,30-4,13/70,8 ppm, (FIGURA 35, FIGURA 36 e FIGURA 37). Foi observado um novo deslocamento do C6 da unidade G4S pertinente às frações substituídas (TABELA 13). As substituições ocorreram com uma taxa de recuperação em massa entre 60-70%, compatível com substituições semelhantes relatadas na literatura (SCHMIDT; LIEBERT; HEINZE, 2014; GERICKE; HEINZE, 2015; HEUKO, 2015).

FIGURA 35 - MAPA DE CORRELAÇÃO DE ^1H - ^{13}C HSQC DA AMOSTRA KCDA.

Realizado a 70 °C em DMSO- d_6 , padrão interno acetona $\delta = 2,09$ ppm para ^1H e $\delta = 30,56$ ppm para ^{13}C .

FIGURA 36 - MAPA DE CORRELAÇÃO DE ^1H - ^{13}C HSQC DA AMOSTRA KCDP.

Realizado a 70 °C em DMSO- d_6 , padrão interno acetona $\delta = 2,09$ ppm para ^1H e $\delta = 30,56$ ppm para ^{13}C .

FIGURA 37 - MAPA DE CORRELAÇÃO DE ^1H - ^{13}C HSQC DA AMOSTRA KCDD.

Realizado a 70 °C em DMSO- d_6 , padrão interno acetona $\delta = 2,09$ ppm para ^1H e $\delta = 30,56$ ppm para ^{13}C .

As frações KCDA, KCDD e KCDP também foram analisadas através de espectroscopia de infravermelho (FIGURAS 38, 39 e 40), onde as três frações apresentaram a banda em aproximadamente 1173 cm^{-1} referente ao estiramento simétrico da ligação $\text{O}=\text{S}=\text{O}$ do grupo tosil, reforçando o resultado observado nos espectros de RMN- ^{13}C , os quais indicam a presença do grupo tosil nas posições C2 das unidades DA e G4S (FIGURA 34). A fração KCDA, que foi substituída pelo grupamento azida, apresentou um novo sinal em 2105.57 cm^{-1} referente a ligação entre os nitrogênios da azida ($-\text{N}_3$) (SEKKAL et al., 1993; GERICKE; HEINZE, 2015; HEUKO, 2015), já as frações KCDD e KCDP não apresentaram novos sinais que sugerissem a ligação dos grupamentos dietilamina e pirrolidina, respectivamente, ao polissacarídeo.

FIGURA 38 – ESPECTRO DE FTIR DA FRAÇÃO KCDA.

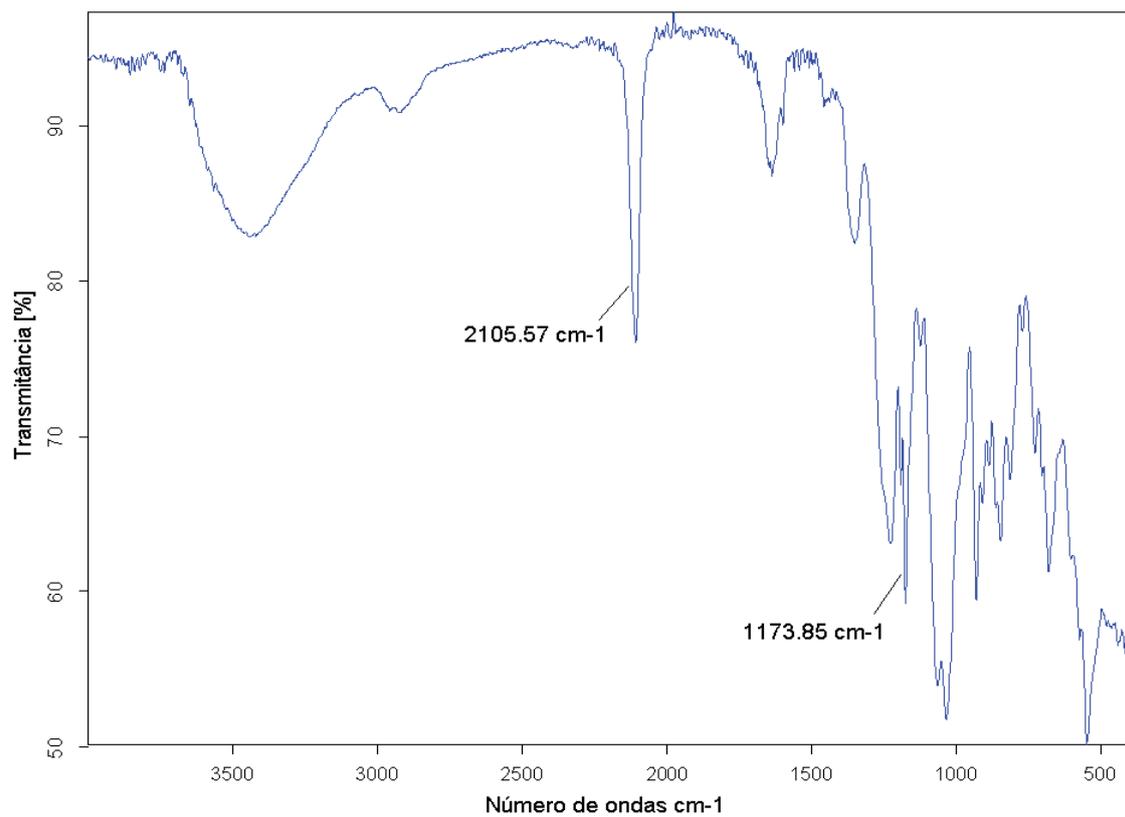


FIGURA 39 – ESPECTRO DE FTIR DA FRAÇÃO KCDD.

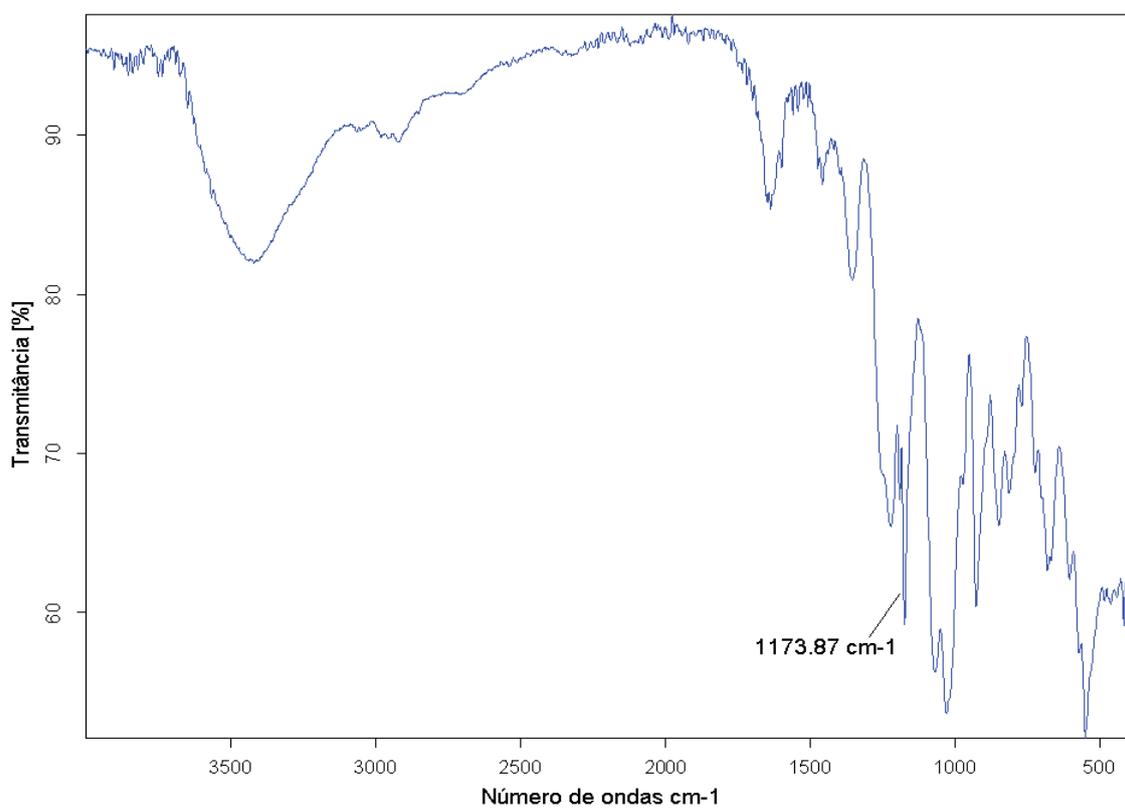
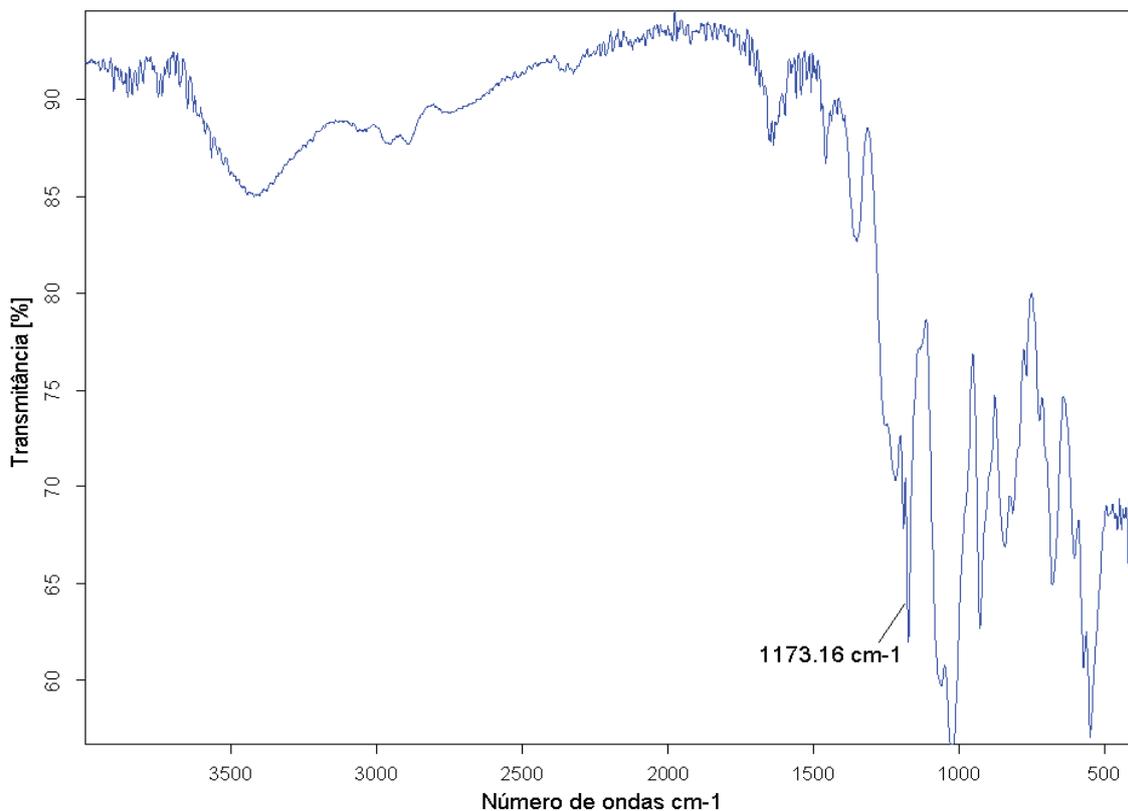


FIGURA 40 – ESPECTRO DE FTIR DA FRAÇÃO KCDP.



10. CONCLUSÃO

Este trabalho iniciou o estudo da reação de tosilação do polissacarídeo aniônico κ -carragenana. Apesar de ainda serem necessários mais estudos para tosilação deste polissacarídeo em solvente orgânico como DMAc e DMF, os primeiros dados obtidos indicam que esta abordagem é ineficiente. A tosilação em meio aquoso/orgânico em um formato heterogêneo apresentou sucesso, alcançando um $DS_{\text{soma}} > 1$, que pode ser encontrada na reação preparativa (KCDTP), a qual seguiu as condições reacionais da amostra analítica KCDT-7. Em baixos DS_{soma} foi observado apenas a tosilação da posição G4S-6, contudo ao aumentar o DS, DS_{soma} 0.51 (KCDT-6), foi possível detectar a tosilação nas posições de C2 da unidade de DA e G4S. Também foi demonstrado que a utilização da base $\text{Ca}(\text{OH})_2$ modifica o padrão de seletividade da reação (KCDT-3 e KCDT-10), promovendo aumento da tosilação em C2 de DA (DA,2T) e diminuição da tosilação da hidroxila primária em G4S-6. São necessários estudos mais aprofundados para investigar este fenômeno. Com relação aos

resultados obtidos nas reações de substituição com dietilamina, pirrolidina e azida, foi observado completa substituição do grupo tosilato da posição G4S-6. Vale ressaltar que o produto de substituição com azida de sódio gerou um polissacarídeo azido, o qual pode ser utilizado em novas reações de funcionalização, por meio de reações do tipo “*click chemistry*” a fim de gerar novos polímeros hibridizados com outras moléculas.

11. CONCLUSÃO GERAL

Neste presente trabalho foram sintetizadas e caracterizadas novas moléculas a partir da κ -carragenana, sendo sete frações contendo grupos *N*-alquilaminas, uma fração tosilada e três frações substituídas por azido, dietilamina e pirrolidina. Foram também obtidas frações despolimerizadas da κ -carragenana por meio de hidrólise ácida parcial, utilizando TFA 0,1 mol/L que foi efetiva para a quebra seletiva das ligações α -(1 \rightarrow 3) entre as unidades de DA e G4S, produzindo oligossacarídeos com menor massa molar e com bons rendimentos.

As frações *N*-alquilaminas, obtidas por meio de aaminação reductiva entre o terminal redutor da fração despolimerizada com as *N*-alquilaminas (5, 7, 9 e 12 carbonos), apresentaram uma recuperação média de 22%. Elas foram avaliadas quanto a sua capacidade antimicrobiana e as frações KAN1, KAD e KAD1 foram ativas contra as bactérias *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) e *Escherichia coli* (ATCC 8738). A maior atividade antimicrobiana foi observada com a fração KAD1, a qual possui a *N*-dodecilamina como substituinte. Vale ressaltar que esta fração, também, apresentou maior grau de inserção nos terminais redutores.

Para obtenção da fração tosilada (KCDTP) foi realizado um estudo de otimização da reação, utilizando como base metodologias na literatura que já realizaram reações de tosilação em outros polissacarídeos. Através da realização e comparação entre os graus de substituição (DS) obtidos em metodologias homogêneas e heterogêneas, foi possível alcançar dados consistentes a respeito da melhor forma de se obter essa fração. A reação de tosilação otimizada que apresentou DS>1 com substituição preferencial e completa em G4S-6 ocorreu em meio heterogêneo, utilizando acetonitrila/água (3:1), NaOH como base, adição de NaCl, à 0 °C e por 5 horas. Esta reação apresentou uma recuperação de 127%.

As frações KCDA, KCDD e KCDP foram obtidas através de substituição nucleofílica bimolecular a partir da fração tosilada KCDTP com azida de sódio, dietilamina e pirrolidina, respectivamente. Em todas as frações ocorreu a substituição completa do grupamento tosila pelo nucleófilo na posição G4S,6T e uma recuperação média de 68%.

Os resultados obtidos neste trabalho são um sólido ponto de partida para a elaboração de novas frações de *Kappa*-carragenana modificadas quimicamente para obtenção de polissacarídeos mais adequados para atuarem como biomoléculas ativas.

REFERÊNCIAS

ARAÚJO, C. Á. De. **Modificações químicas em carragenanas**: Estudo comparativo de diversos padrões de sulfatação na atividade anticoagulante. Dissertação (Mestrado em Ciências - Bioquímica) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

BABA, M. et al. Sulfated polysaccharides are potent and selective inhibitors of various enveloped viruses, including herpes simplex virus, cytomegalovirus, vesicular stomatitis virus, and human immunodeficiency virus. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 32, n. 11, p. 1742–1745, 1988.

BARAHONA, T. et al. Cationization of *Kappa*- and *Iota*-carrageenan – Characterization and properties of amphoteric polysaccharides. **Carbohydrate Polymers**, v. 126, p. 70–77, 1 ago. 2015.

BAWEJA, P. et al. Biology of Seaweeds. In: **Seaweed in Health and Disease Prevention**. Elsevier Inc., 2016, p. 41-106.

BETTOSCHI, A. et al. Fluorescent lactose-derived cationic aggregates: synthesis, characterisation and potential use as antibacterial agents. **RSC Advances**, v. 6, n. 28, p. 23340–23344, 2016.

BIXLER, H. J.; JOHNDRO, K.; FALSHAW, R. *Kappa*-2 carrageenan: structure and performance of commercial extracts. **Food Hydrocolloids**, v. 15, n. 4–6, p. 619–630, jul. 2001.

CAMPO, V. L. et al. Carrageenans: Biological properties, chemical modifications and structural analysis – A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 77, n. 2, p. 167–180, jun. 2009.

CHAN, S. W. et al. Comparative study on the physicochemical properties of κ -carrageenan extracted from *Kappaphycus alvarezii* (doty) doty ex Silva in Tawau, Sabah, Malaysia and commercial κ -carrageenans. **Food Hydrocolloids**, v. 30, n. 2, p. 581–588, mar. 2013.

CHEONG, K.-L. et al. Oligosaccharides Derived from Red Seaweed: Production, Properties, and Potential Health and Cosmetic Applications. **Molecules**, v. 23, n. 10, p. 2451, 25 set. 2018.

CHOPIN, N. et al. Design Polysaccharides of Marine Origin: Chemical Modifications to Reach Advanced Versatile Compounds. **Current Organic Chemistry**, v. 18, n. 7, p. 867–895, 31 maio 2014.

COGGINS, C. Preliminary safety and acceptability of a carrageenan gel for possible use as a vaginal microbicide. **Sexually Transmitted Infections**, v. 76, n. 6, p. 480–483, 1 dez. 2000.

COSENZA, V. A. et al. Partial and total C-6 oxidation of gelling carrageenans. Modulation of the antiviral activity with the anionic character. **Carbohydrate Polymers**, v. 128, p. 199–206, set. 2015.

COSENZA, V. A. et al. Seaweed Polysaccharides: Structure and Applications. In: **Industrial Applications of Renewable Biomass Products**. Cham: Springer International Publishing, 2017. p. 75–116.

CUMPSTEY, I. Chemical Modification of Polysaccharides. **ISRN Organic Chemistry**, v. 2013, p. 1–27, 2013.

DALLAGNOL, J. C. C. et al. Aqueous semisynthesis of C-glycoside glycamines from agarose. **Beilstein Journal of Organic Chemistry**, v. 13, p. 1222–1229, 23 jun. 2017.

DAUS, S.; ELSCHNER, T.; HEINZE, T. Towards unnatural xylan based polysaccharides: reductive amination as a tool to access highly engineered carbohydrates. **Cellulose**, v. 17, n. 4, p. 825–833, 14 ago. 2010.

DAX, D. et al. Amphiphilic spruce galactoglucomannan derivatives based on naturally-occurring fatty acids. **BioResources**, v. 8, n. 3, p. 3771–3790, 2013.

DE ARAÚJO, C. A. et al. Selective sulfation of carrageenans and the influence of sulfate regiochemistry on anticoagulant properties. **Carbohydrate polymers**, v. 91, n. 2, p. 483–91, 16 jan. 2013.

DESFTISCHER, P. et al. 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, 18 mar. 2006.

DODGSON, K. S. Determination of inorganic sulphate in studies on the enzymic and non-enzymic hydrolysis of carbohydrate and other sulphate esters. **The Biochemical journal**, v. 78, p. 312–9, fev. 1961.

DUBOIS, M. et al. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350–356, mar. 1956.

DUCATTI, D. R. B. **Hidrólise ácida de galactanas para produção de oligossacarídeos e C-Glicosídeos**: Semi-síntese de *N*-Alquil e *C*-Dihidropiridina Glicosídeos. Tese (Doutorado em Ciências - Bioquímica) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

DUCATTI, D. R. B. et al. Production of agaro- and carra-oligosaccharides by partial acid hydrolysis of galactans. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 21, n. 2, p. 296–304, abr. 2011.

ELCHINGER, P.-H. et al. Tosylcellulose synthesis in aqueous medium. **Green Chemistry**, v. 14, n. 11, p. 3126, 2012.

ERMAK, I. M. et al. Natural polysaccharide carrageenan inhibits toxic effect of gram-negative bacterial endotoxins. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, v. 141, n. 2, p. 230–232, fev. 2006.

ESTEVEZ, J. M.; CIANCIA, M.; CERESO, A. S. The system of galactans of the red seaweed, *Kappaphycus alvarezii*, with emphasis on its minor constituents. **Carbohydrate Research**, v. 339, n. 15, p. 2575–2592, 20 out. 2004.

FIGUEIREDO, D. B. **Desenvolvimento de um método por eletroforese capilar para quantificação e identificação de oligossacarídeos sulfatados**. Dissertação (Mestrado em Ciências - Bioquímica) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

GERICKE, M.; HEINZE, T. Homogeneous tosylation of agarose as an approach toward novel functional polysaccharide materials. **Carbohydrate Polymers**, v. 127, p. 236–245, ago. 2015.

GONÇALVES, A. G. et al. Positional isomers of sulfated oligosaccharides obtained from agarans and carrageenans: preparation and capillary electrophoresis separation. **Carbohydrate Research**, v. 340, n. 13, p. 2123–2134, set. 2005.

HEINZE, T.; LIEBERT, T.; KOSCHELLA, A. **Esterification of Polysaccharides**. Berlin: Heidelberg: Springer-Verlag, 2006.

HEINZE, T.; MICHEALIS, N.; HORNIG, S. Reactive polymeric nanoparticles based on unconventional dextran derivatives. **European Polymer Journal**, v. 43, n. 3, p. 697–703, mar. 2007.

HEUKO, J. G. **Síntese e caracterização de derivado amino carboxilado da agarose**. Dissertação (Mestrado em Ciências - Bioquímica) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2015.

HOAGLAND, P. D.; PFEFFER, P. E.; VALENTINE, K. M. Reductive amination of lactose: unusual ^{13}C -N.M.R. spectroscopic properties of *N*-alkyl-(1-deoxylactitol-1-yl)amines. **Carbohydrate Research**, v. 74, n. 1, p. 135–143, set. 1979.

JOUANNEAU, D. et al. New insights into the structure of hybrid κ -/ μ -carrageenan and its alkaline conversion. **Food Hydrocolloids**, v. 24, n. 4, p. 452–461, jun. 2010.

KALITNIK, A. A. et al. Low molecular weight derivatives of different carrageenan types and their antiviral activity. **Journal of Applied Phycology**, v. 25, n. 1, p. 65–72, 2013.

KAMIŃSKA-DWÓRZNICKA, A. et al. The influence of *Kappa* carrageenan and its hydrolysates on the recrystallization process in sorbet. **Journal of Food Engineering**, v. 167, p. 162–165, 2015.

KNUTSEN, S. H. et al. A Modified System of Nomenclature for Red Algal Galactans. **Botanica Marina**, v. 37, n. 2, p. 163, 1994.

KOLENDER, A. A.; MATULEWICZ, M. C. Desulfation of sulfated galactans with chlorotrimethylsilane. Characterization of β -carrageenan by ^1H NMR spectroscopy. **Carbohydrate Research**, v. 339, n. 9, p. 1619–1629, jun. 2004.

KUMAR, M. et al. Salinity and Desiccation Induced Oxidative Stress Acclimation in Seaweeds. In: **Advances in Botanical Research**. Elsevier Ltd, 2014. p. 91–123.

LATGE, P. et al. Synthesis of long chain *N*-alkyllactylamines from unprotected lactose a new series of non-ionic surfactants. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 12, n. 3–4, p. 227–237, jan. 1991.

LEIBBRANDT, A. et al. *Iota*-Carrageenan Is a Potent Inhibitor of Influenza A Virus Infection. **PLoS ONE**, v. 5, n. 12, p. e14320, 14 dez. 2010.

LI, L. et al. Carrageenan and its applications in drug delivery. **Carbohydrate Polymers**, v. 103, n.1, p. 1-11, 15 mar. 2014.

LI, S. et al. Molecular Modification of Polysaccharides and Resulting Bioactivities. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 15, n. 2, p. 237–250, mar. 2016.

MILLER, I.; WONG, H.; NEWMAN, R. A ^{13}C N.M.R. study of some disaccharides from algal polysaccharides. **Australian Journal of Chemistry**, v. 35, n. 4, p. 853, 1982.

MUÑOZ-BONILLA, A.; FERNÁNDEZ-GARCÍA, M. Polymeric materials with antimicrobial activity. **Progress in Polymer Science**, v. 37, n. 2, p. 281–339, fev. 2012.

NAKATSUKASA, T.; INAKURA, T.; YABANA, K. Finite amplitude method and systematic studies of photoresponse in deformed nuclei. **AIP Conference Proceedings**, v. 1165, n. 12, p. 173–176, 2009.

NECAS, J.; BARTOSIKOVA, L. Carrageenan: A review. **Veterinarni Medicina**, v. 58, n. 4, p. 187–205, 2013.

NICHIFOR, M.; MOCANU, G.; STANCIU, M. C. Micelle-like association of polysaccharides with hydrophobic end groups. **Carbohydrate Polymers**, v. 110, n. 2014, p. 209–218, set. 2014.

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.

PEREIRA, L.; GHEDA, S. F.; RIBEIRO-CLARO, P. J. A. Analysis by Vibrational Spectroscopy of Seaweed Polysaccharides with Potential Use in Food, Pharmaceutical, and Cosmetic Industries. **International Journal of Carbohydrate Chemistry**, v. 2013, n. vi, p. 1–7, 2013.

POMIN, V. H. An overview about the structure-function relationship of marine sulfated homopolysaccharides with regular chemical structures. **Biopolymers**, v. 91, n. 8, p. 601–609, 2009.

PRASEDYA, E. S. et al. Carrageenan delays cell cycle progression in human cancer cells in vitro demonstrated by FUCCI imaging. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 16, n. 1, p. 1–9, 2016.

QUELEMES, P. V. et al. Quaternized cashew gum: An anti-staphylococcal and biocompatible cationic polymer for biotechnological applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 157, n. 2017, p. 567–575, fev. 2017.

RAHN, K. et al. Homogeneous synthesis of cellulose p-toluenesulfonates in N , N-dimethylacetamidel LiCl solvent system. **Die Angewandte Makromolekulare Chemie**, v. 238, n. 1, p. 143–163, 1996.

REN, W. et al. Developments in antimicrobial polymers. **Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry**, v. 55, n. 4, p. 632–639, 15 fev. 2017.

RIOUX, L.; TURGEON, S. L. Seaweed carbohydrates. In: **Seaweed Sustainability**. Elsevier, 2015. p. 141–192.

SANTOS, G. C. DOS. **Oxidação seletiva de carragenanas: síntese e caracterização**. Dissertação (Mestrado em Ciências - Bioquímica) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2015.

SCHMIDT, S.; LIEBERT, T.; HEINZE, T. Synthesis of soluble cellulose tosylates in an eco-friendly medium. **Green Chem.**, v. 16, n. 4, p. 1941–1946, 2014.

SEKKAL, M. et al. The use of FTIR microspectrometry as a new tool for the identification in situ of polygalactanes in red seaweeds. **Journal of Molecular Structure**, v. 294, n. C, p. 227–230, mar. 1993.

SILVA, F. R. F. et al. Anticoagulant activity, paw edema and pleurisy induced carrageenan: Action of major types of commercial carrageenans. **Carbohydrate Polymers**, v. 79, n. 1, p. 26–33, jan. 2010.

SISU, I. et al. Synthesis and structural characterization of amino-functionalized polysaccharides. **Open Chemistry**, v. 7, n. 1, p. 66–73, 1 jan. 2009.

SOUZA, R. B. et al. In vitro activities of *Kappa* -carrageenan isolated from red marine alga *Hypnea musciformis* : Antimicrobial, anticancer and neuroprotective potential. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 112, p. 1248–1256, jun. 2018.

STEVENSON, T. T.; FURNEAUX, R. H. Chemical methods for the analysis of sulphated galactans from red algae. **Carbohydrate research**, v. 210, n. C, p. 277–98, 20 mar. 1991.

SUN, Y. et al. Structural characterization and antioxidant activities of κ -carrageenan oligosaccharides degraded by different methods. **Food Chemistry**, v. 178, p. 311–318, jul. 2015.

TIMOFEEVA, L.; KLESHCHEVA, N. Antimicrobial polymers: mechanism of action, factors of activity, and applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 89, n. 3, p. 475–492, 15 fev. 2011.

TUCHILUS, C. G. et al. Antimicrobial activity of chemically modified dextran derivatives. **Carbohydrate Polymers**, v. 161, n. 2017, p. 181–186, abr. 2017.

USOV, A. I. Polysaccharides of the red algae. **Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry**, v. 65, p. 115–217, jan. 2011.

USOV, A. I.; ELASHVILI, M. Y. Polysaccharides of Algae. Investigation of Sulfated Galactan from *Laurencia nipponica* Yamada (Rhodophyta, Rhodomelaceae) Using Partial Reductive Hydrolysis. **Botanica Marina**, v. 34, n. 6, p. 367–373, 1991.

VAN DE VELDE, F. et al. ^1H and ^{13}C high resolution NMR spectroscopy of carrageenans: application in research and industry. **Trends in Food Science & Technology**, v. 13, n. 3, p. 73–92, mar. 2002.

VAN DE VELDE, F. et al. The structure of κ/ι -hybrid carrageenans II. Coil-helix transition as a function of chain composition. **Carbohydrate Research**, v. 340, n. 6, p. 1113–1129, 2005.

VEIGA, A. et al. Colorimetric microdilution assay: Validation of a standard method for determination of MIC, IC50%, and IC90% of antimicrobial compounds. **Journal of Microbiological Methods**, v. 162, p. 50–61, jul. 2019.

WANG, F. F. et al. Antibacterial Activities of *Kappa*-Carrageenan Oligosaccharides. **Applied Mechanics and Materials**, v. 108, n. 2012, p. 194–199, out. 2011a.

WANG, W. et al. In vitro inhibitory effect of carrageenan oligosaccharide on influenza A H1N1 virus. **Antiviral Research**, v. 92, n. 2, p. 237–246, 2011b.

WITVROUW, M.; DE CLERCQ, E. Sulfated Polysaccharides Extracted from Sea Algae as Potential Antiviral Drugs. **General Pharmacology: The Vascular System**, v. 29, n. 4, p. 497–511, out. 1997.

YALPANI, M. **Polysaccharides - Synthesis, Modifications and Structure/Property Relations**. Amsterdam – Oxford – New York – Tokyo: Elsevier Ltd, 1988.

YAMAMURA, H. et al. Synthesis of antimicrobial cyclodextrins bearing polyarylamino and polyalkylamino groups via *click chemistry* for bacterial membrane disruption. **Chemical Communications**, v. 50, n. 41, p. 5444, 2014.

YAMASHITA, S.; KONISHI, Y. S.; SHIMIZU, M. In vitro Bacteriostatic Effects of Dietary Polysaccharides. **Food Science Technology**, v. 7, n. 3, p. 262–264, 2001.

YUAN, H.; SONG, J. Preparation, structural characterization and in vitro antitumor activity of *Kappa*-carrageenan oligosaccharide fraction from *Kappaphycus striatum*. **Journal of Applied Phycology**, v. 17, n. 1, p. 7–13, 2005.