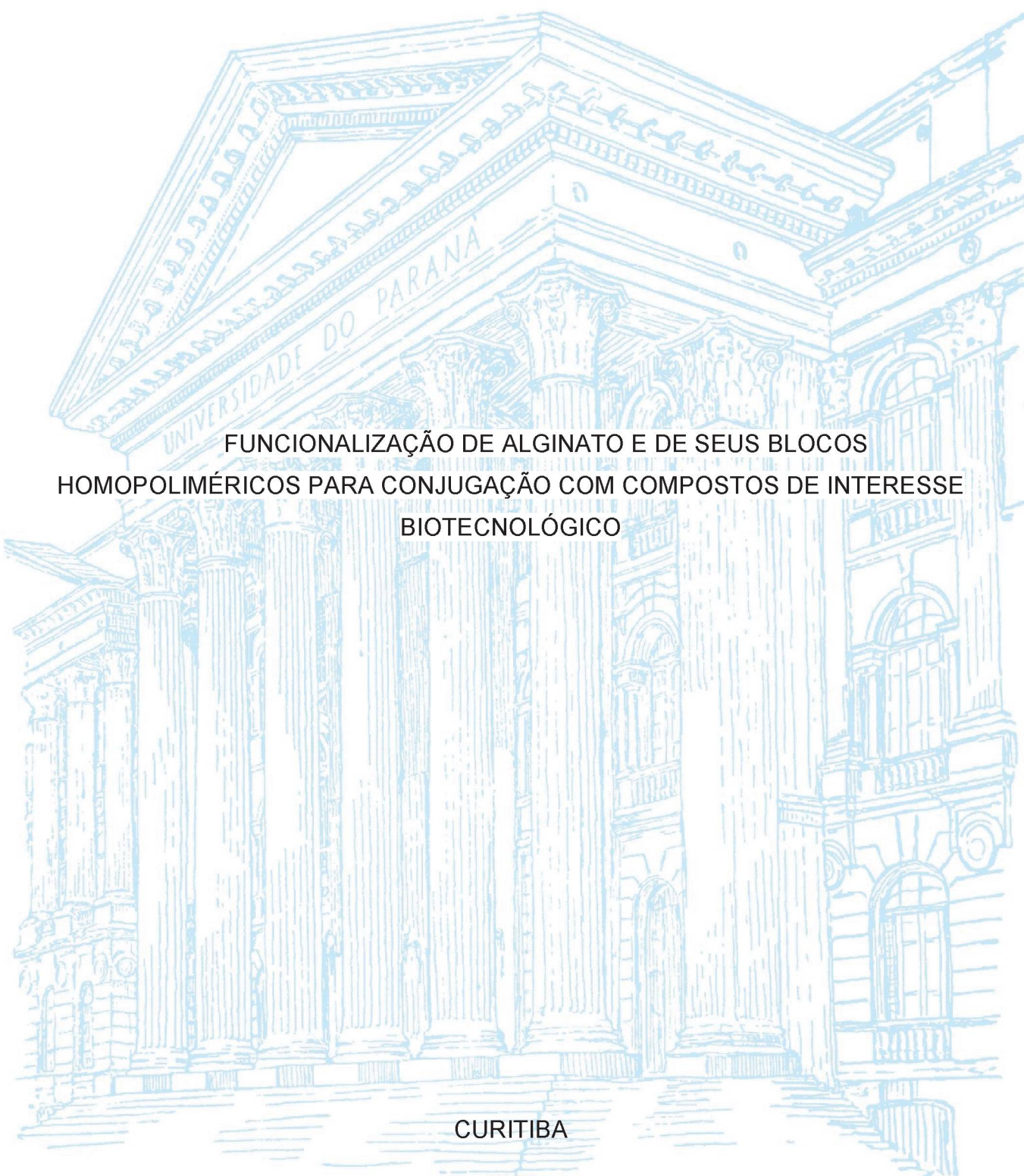


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

FRANCISCO PAUL SOTAMINGA RIPALDA



FUNCCIONALIZAAÇÃO DE ALGINATO E DE SEUS BLOCOS
HOMOPOLIMÉRICOS PARA CONJUGAAÇÃO COM COMPOSTOS DE INTERESSE
BIOTECNOLÓGICO

CURITIBA

2020

FRANCISCO PAUL SOTAMINGA RIPALDA

FUNCIONALIZAÇÃO DE ALGINATO E DE SEUS BLOCOS HOMOPOLIMÉRICOS
PARA CONJUGAÇÃO COM COMPOSTOS DE INTERESSE BIOTECNOLÓGICO

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, no Curso de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Setor de Tecnologia, da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Eugênia Duarte Nosedá

Coorientadores: Prof. Dr. Miguel Daniel Nosedá

Dra. Jaqueline Carneiro

CURITIBA

2020

Catálogo na Fonte: Sistema de Bibliotecas, UFPR
Biblioteca de Ciência e Tecnologia

S717f Sotaminga, Francisco Paul
Funcionalização de alginato e de seus blocos homopoliméricos para conjugação com compostos de interesse biotecnológico [recurso eletrônico] / Francisco Paul Sotaminga. – Curitiba, 2020.

Dissertação - Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, 2020.

Orientadora: Maria Eugênia Duarte Nosedá.
Coorientadores: Miguel Daniel Nosedá, Jaqueline Carneiro.

1. Espectroscopia por ressonância magnética nuclear. 2. Polissacarídeos. 3. Algas.
I. Universidade Federal do Paraná. II. Nosedá, Maria Eugênia Duarte. III. Nosedá, Miguel Daniel. IV. Carneiro, Jaqueline. V. Título.

CDD: 572.566

Bibliotecária: Vanusa Maciel CRB- 9/1928



TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS E BIOTECNOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **FRANCISCO PAUL SOTAMINGA RIPALDA** intitulada: **FUNCIONALIZAÇÃO DE ALGINATO E DE SEUS BLOCOS HOMOPOLIMÉRICOS PARA CONJUGAÇÃO COM COMPOSTOS DE INTERESSE BIOTECNOLÓGICO**, sob orientação da Profa. Dra. MARIA EUGÊNIA DUARTE NOSEDA, que após terem inquirido o aluno e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre 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, 10 de Abril de 2020.

Assinatura Eletrônica

10/04/2020 17:00:08.0

MARIA EUGÊNIA DUARTE NOSEDA

Presidente da Banca Examinadora (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

10/04/2020 16:59:45.0

DIOGO RICARDO BAZAN DUCATTI

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

10/04/2020 17:03:57.0

ALAN GUILHERME GONÇALVES

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Profa. Dra. Maria Eugênia Duarte Nosedá, pela dedicada orientação, pelo apoio e pelos ensinamentos transmitidos.

A meus coorientadores, Prof. Dr. Miguel D. Nosedá e Dra. Jaqueline Carneiro, pelas contribuições e ensinamentos ao longo do desenvolvimento deste projeto.

Ao Centro de RMN - UFPR pelas análises de RMN.

Aos colegas de laboratório E3 e 248 e demais colegas por toda ajuda, troca de ideias e amizade.

À CAPES pela concessão de bolsa. Às demais agências de fomento e projetos que financiaram este trabalho: CNPQ, Fundação Araucária e Projeto Universal.

Agradeço, por fim, a banca avaliadora deste projeto, pela disposição e atenção investidas neste trabalho.

Dedico este trabalho à minha família e amigos
Obrigado por tudo

RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi obter, caracterizar e explorar o potencial de derivados de alginato e seus blocos homopoliméricos (ácido α -L-GulAp e ácido β -D-ManAp) obtidos por hidrólise ácida parcial funcionalizados com a inserção de um grupo propilazida por amidação usando carbodiimida/NHS como reagentes de acoplamento e 3-azidopropilamina previamente sintetizada. Os compostos funcionalizados ALG-N3, BG-N3 e BM-N3, foram caracterizados por IV e RMN, são compostos intermediários para reações de *click chemistry* do tipo cicloadição azido-alcino catalisada por cobre (I) *CuAAC*, (*copper(I)-catalyzed alkyne-azide cycloaddition*), essas reações são ferramentas altamente versáteis para a obtenção de derivados de interesse biotecnológico. Os compostos obtidos após a reação *CuAAC* entre o alginato e seus derivados funcionalizados e a propargilamina que possui um terminal amina e um terminal alcino em sua estrutura, reação catalisada por CuSO_4 e ácido ascórbico, os compostos obtidos ALG-NH₂, BG-NH₂ e BM-NH₂ foram caracterizados por RMN, os novos produtos foram avaliados a atividade antimicrobiana contra uma cepa ATCC 25922 de *Escherichia coli* confirmada mediante experimento microbiológico de concentração inibitória mínima (CIM), obtendo a concentração inibitória dos três compostos um valor de 5000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, atividade biológica que o alginato e seus blocos homopoliméricos nativos não apresentaram.

Palabras-chave: alginato, gulurônico, manurônico, amidação, EDC, azida, click chemistry, *CuAAC*

ABSTRACT

This study aimed to obtain, characterize and explore the potential of functionalized alginate derivatives and their homopolymeric blocks (α -L-GulAp acid and β -D-ManAp acid) obtained by functionalized partial acid hydrolysis with the insertion of a propylazide by amidation using as carbodiimide/NHS as coupling reagents and previously synthesized 3-azidopropylamine. The functionalized compounds ALG-N3, BG-N3, and BM-N3, which were characterized by FTIR and NMR, are intermediate compounds for click chemistry reactions of azide-alkaline cycloaddition type catalyzed by copper (I) CuAAC, these reactions are highly versatile tools for obtaining derivatives of biotechnological interest. The compounds obtained after the CuAAC reaction between alginate and its functionalized derivatives with propargylamine which has an amine terminal and an alkaline terminal in its structure, the reaction catalyzed by CuSO_4 and ascorbic acid, the compounds obtained ALG-NH₂, BG-NH₂ and BM-NH₂ were characterized by NMR, the new products were evaluated for antimicrobial activity against an ATCC 25922 strain of *Escherichia coli* confirmed by microbiological experiment with minimum inhibitory concentration (MIC) obtaining the inhibitory concentration of the three compounds a value of 5000 mg.mL⁻¹, biological activity that alginate and its native homopolymeric blocks did not have.

Keywords: alginate, guluronic, mannuronic, amidation, EDC, azida, click chemistry, CuAAC

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1- ESTRUTURA QUÍMICA DO ALGINATO	17
FIGURA 2 MODELO CAIXA DE OVOS	18
FIGURA 3 - MECANISMO DE REAÇÃO COM CARBODIIMIDA (EDC)	25
FIGURA 4 – ESQUEMA DE REAÇÃO EDC/NHS	26
FIGURA 5 - ESQUEMA DE REAÇÃO CuAAC	27
FIGURA 6 - MECANISMO DE REAÇÃO <i>CLICK</i> CuAAC	27
FIGURA 7 CÁLCULO M/G DO ALGINATO	31
FIGURA 8 - ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL	32
FIGURA 9 - ESQUEMA GERAL DE MODIFICAÇÃO ALGINATO	33
FIGURA 10 - ESQUEMA GERAL DE OBTENÇÃO DOS BLOCOS BG E BM A PARTIR DE ALGINATO DE SÓDIO	34
FIGURA 11 - FLUXOGRAMA DE OBTENÇÃO DOS BLOCOS HOMOPOLIMÉRICOS DE MENOR MASSA MOLECULAR A PARTIR DE ALGINATO DE SÓDIO	35
FIGURA 12 - FLUXOGRAMA DE PURIFICAÇÃO DAS FRAÇÕES BM E BG	36
FIGURA 13 - ESQUEMA DE SÍNTESE DA 3-AZIDOPROPILAMINA	37
FIGURA 14 - ESQUEMA DE REAÇÃO PARA OBTENÇÃO DE DERIVADOS DE ALGINATO FUNCIONALIZADOS COM GRUPO AZIDA	38
FIGURA 15 - ESQUEMA DE REACAO DE CLICK CHEMISTRY ENTRE POLISSACARÍDEO AZIDA E PROPARGILAMINA	39
FIGURA 16 - REPRESENTAÇÃO DILUÇÃO SERIADA EM MICROPLACA	40
FIGURA 17 - ESPECTRO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO DO ALGINATO (3- ALG)	41
FIGURA 18 - ESPECTRO DE RMN HSQC DO ALGINATO (3-ALG) (400 MHZ)	42
FIGURA 19 - ESPECTRO RMN ¹ H ALGINATO COMERCIAL (3-ALG)	43
FIGURA 20 - ESPECTRO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO DA FRAÇÃO BM	45
FIGURA 21 - ESPECTRO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO DA FRAÇÃO BG	45
FIGURA 22 - ESPECTRO DE RMN HSQC DA FRAÇÃO BG EM D ₂ O	46
FIGURA 23 - ESPECTRO DE RMN HSQC DA FRAÇÃO BM EM D ₂ O	47
FIGURA 24 - ESPECTRO DE RMN HSQC DA FRAÇÃO BG COM E SEM PURIFICAÇÃO EM D ₂ O	48

FIGURA 25 - ESPECTRO DE RMN HSQC DA FRAÇÃO BM COM E SEM PURIFICAÇÃO EM D ₂ O	49
FIGURA 26 - ESPECTRO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO DA 3-CLOROPROPILAMINA (1)	50
FIGURA 27 -ESPECTRO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO DA 3-AZIDOPROPILAMINA (2)	51
FIGURA 28 - ESPECTRO DE RMN DE ¹ H DA 3-AZIDOPROPILAMINA (2) EM CDCl ₃ (200 MHZ)	51
FIGURA 29 - ESPECTRO ¹³ C RMN 3-AZIDOPROPILAMINA (2) EM CDCl ₃ (200 MHZ)	52
FIGURA 30 - ESPECTRO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO DO ALGINATO FUNCIONALIZADO COM 3-AZIDOPROPILAMINA (4-ALG-N3).....	53
FIGURA 31 - ESPECTRO DE RMN HSQC DA AMOSTRA ALG-N3	54
FIGURA 32 - ESPECTRO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO DO ALG, ALG-N3 E ALG-NH ₂	57
FIGURA 33 - ESPECTRO DE RMN DE ¹ H DA alg-NH ₂ EM D ₂ O	59
FIGURA 34 - ESPECTRO DE RMN DE ¹ H DA 4-BM-N3 E 6-BM-NH ₂ EM D ₂ O.....	60
FIGURA 35 - ESPECTRO DE HSQC DA AMOSTRA 6-BM-NH ₂	61
FIGURA 36 - RESULTADO DE MIC ALG-NH ₂ -48, BM-NH ₂ -48 E BG-NH ₂ -48.....	63

LISTA DE ESQUEMAS

ESQUEMA 1 - ESTRATÉGIA DE OBTENÇÃO DE DERIVADOS DE ALGINATO E DE BLOCOS HOMOPOLIMÉRICOS (BM E BG) FUNCIONALIZADOS	15
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - AVALIAÇÃO QUANTITATIVA (%) DE ÁCIDO GULURÔNICO E MANURÔNICO DE ALGINATOS DE DIFERENTES ALGAS.....	18
TABELA 2 - ASSINALAMENTO DE $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ DO ALGINATO (3-ALG).....	42
TABELA 3 - PORCENTAGEM DE BLOCOS M E G DE ALGINATOS APÓS HIDRÓLISE PARCIAL	44
TABELA 4 - ASSINALAMENTOS $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ DAS FRAÇÕES gulAp (BG) e ManAp (BM)	47
TABELA 5 - RENDIMENTOS DAS FRAÇÕES BM E BG ANTES E DEPOIS DA PURIFICAÇÃO.....	48
TABELA 6 - ASSINALAMENTOS NO ESPECTRO DE RMN ^1H E ^{13}C (ppm) DA 3-AZIDOPROPILAMINA COMPARADOS DE LITERATURA	52
TABELA 8 - ASSINALAMENTOS DE ^1H E ^{13}C DA O-ACILISOUREIA	55
TABELA 9 - RESULTADOS DOS TESTES DE NINHIDRINA	56

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

3-ALG	-	Alginato
4-ALG-N3	-	Alginato-azida
6-ALG-NH2	-	Alginato funcionalizado aminado
3-BG	-	Bloco gulurônico
4-BG-N3	-	Bloco gulurônico-azida
6-BG-NH2	-	Bloco gulurônico funcionalizado aminado
3-BM	-	Bloco manurônico
4-BM-N3	-	Bloco manurônico-azida
6-BM-NH2	-	Bloco manurônico funcionalizado aminado
CuAAC	-	Cu(I)-Catalyzed azide-alkyne cycloaddition
HSQC	-	Heteronuclear Single Quantum Coherence
IV	-	Infravermelho
RMN	-	Ressonância Magnética Nuclear
TTPA	-	Tempo de tromboplastina parcial ativada

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVO	15
2.1 OBJETIVO GERAL.....	15
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
3.1 POLISSACARÍDEOS DE ALGAS.....	16
3.2 ALGINATO	16
3.3 APLICAÇÕES DO ALGINATO	19
3.4 MODIFICAÇÕES QUÍMICAS DE POLISSACARÍDEOS	21
3.4.1 SULFATAÇÃO	22
3.4.2 ACETILAÇÃO	23
3.4.3 AMINAÇÃO	23
3.4.4 N-ACILAÇÃO	24
3.4.5 CLICK CHEMISTRY	26
4 MATERIAIS E MÉTODOS	30
4.1 MÉTODOS DE CARACTERIZAÇÃO	30
4.1.1 REAÇÃO DA NINHIDRINA	30
4.1.2 ESPECTROSCOPIA POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN) 30	
4.1.3 ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO (IV)	31
4.2 ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL	32
4.3 MODIFICAÇÕES QUÍMICAS	34
4.3.1 HIDRÓLISE ACIDA PARCIAL DO ALGINATO	34
4.3.2 PURIFICAÇÃO DAS FRAÇÕES BG E BM COM BROMETO DE HEXADECILTRIMETILAMÔNIO (CTAB)	35
4.3.3 OBTENÇÃO DO INTERMEDIÁRIO 3-AZIDOPROPILAMINA	37
4.3.4 OBTENÇÃO DE DERIVADO DE ALGINATO E DE BLOCOS BM E BG FUNCIONALIZADOS COM GRUPO AZIDA	37
4.3.5 REAÇÃO DE CLICK CHEMISTRY POLISSACARÍDEO AZIDA E PROPARGILAMINA	38
4.3.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA - CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (MIC)	39
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	41

5.1	CARACTERIZAÇÃO DO ALGINATO COMERCIAL	41
5.2	OBTENÇÃO DE BLOCOS HOMOPOLIMÉRICOS BM E BG	43
5.3	PURIFICAÇÃO DAS FRAÇÕES BG E BM COM BROMETO DE HEXADECILTRIMETILAMÔNIO (CTAB)	48
5.4	SÍNTESE DO INTERMEDIÁRIO 3-AZIDOPROPILAMINA	49
5.5	OBTENÇÃO DE DERIVADO DE ALGINATO FUNCIONALIZADOS COM GRUPO AZIDA	53
5.6	OBTENÇÃO DE DERIVADO AMINADO ATRAVÉS DE <i>CLICK CHEMISTRY</i> <i>CUAAC</i>	56
5.7	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE DERIVADO DE ALGINATO FUNCIONALIZADO	61
6.	CONCLUSÃO	64
	ANEXOS	65
	REFERÊNCIAS	69

INTRODUÇÃO

Os alginatos são polissacarídeos que podem ser obtidos da parede celular de algas marrons (Phaeophyta) e de bactérias dos gêneros *Azotobacter* e *Pseudomonas*. Os alginatos utilizados comercialmente são os obtidos de algas (DRAGET; TAYLOR, 2011; SZEKALSKA et al., 2016) (DRAGET; TAYLOR, 2011; SZEKALSKA et al., 2016).

Na indústria alimentícia o alginato é utilizado para melhorar propriedades reológicas e na indústria farmacêutica o alginato de cálcio produz filmes que são usados como curativos de lesões. O alginato é utilizado para aplicações biomédicas porque é biocompatível, não tóxico, biodegradável e apresenta baixo custo (MCHUGH, 2003; CHING et al., 2017).

Muitos polissacarídeos apresentam propriedades biológicas, tais como antioxidantes, antitumoral, hipoglicêmico, imunomodulador e anticoagulante. Essas atividades dependem da estrutura química e conformação do polímero (XIAO et al. (2019).

Modificações químicas de polissacarídeos permitem obter novos derivados a partir de celulose, alginato, amido e quitosana, para obtenção de derivados com novas propriedades biológicas, como atividade antimicrobiana. Os métodos de modificação mais utilizados incluem sulfatação, carboximetilação, acetilação, *N*-acilação e fosforilação (CHEN; HUANG, 2018; LEE; MOONEY, 2012; MENG; EDGAR, 2016; XIAO et al., 2019).

Nesse contexto, tendo em vista a biodegradabilidade e a acessibilidade de polissacarídeos de algas marinhas, o presente trabalho explora o potencial do alginato para obtenção de derivados inéditos funcionalizados com grupo azida, que atuam como intermediários em reações de *click chemistry* do tipo CuAAC, cicloadição azido-alcino catalisada por cobre (I) (*copper(I)-catalyzed alkyne-azide cycloaddition*), sendo de alta versatilidade para obtenção de derivados de interesse biotecnológico.

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo Geral

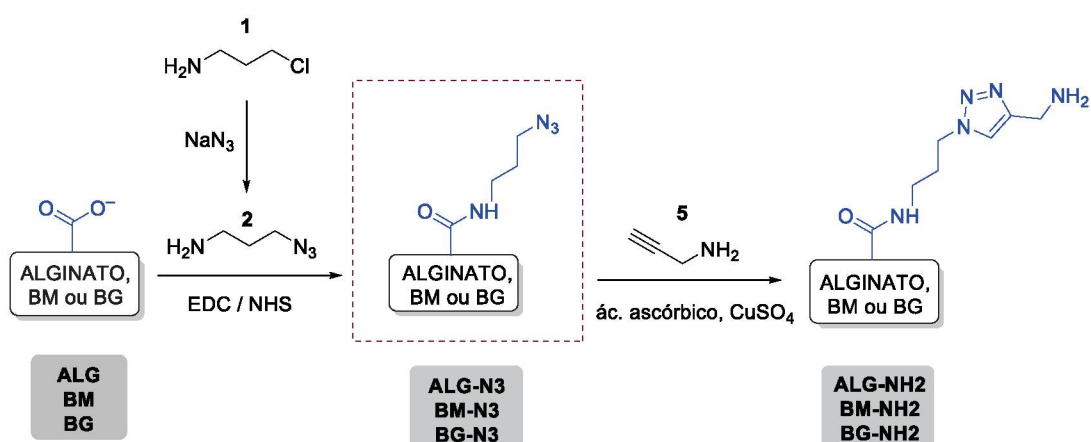
- Obter derivados de alginato funcionalizados com grupo azida, através de reação de amidação e utilizar os materiais obtidos para funcionalização utilizando *click chemistry*.

2.2 Objetivos Específicos

- Obter blocos homopoliméricos a partir de alginato comercial através de hidrólise parcial;
- Obter derivados de alginato e dos blocos homopoliméricos funcionalizados com grupo azida terminal através de reações de amidação;
- Obter derivados funcionalizados aminados através de reações de *click chemistry*;
- Caracterizar os compostos obtidos por Espectroscopia por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e Espectroscopia na região do Infravermelho (IV);
- Avaliar atividade antimicrobiana dos compostos obtidos.

O esquema 1 apresenta a estratégia para obtenção de alginato e seus blocos homopoliméricos funcionalizados.

ESQUEMA 1 - ESTRATÉGIA DE OBTENÇÃO DE DERIVADOS DE ALGINATO E DE BLOCOS HOMOPOLIMÉRICOS (BM E BG) FUNCIONALIZADOS



EDC: 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida
NHS: *N*-hidroxisuccinamida

Fonte: O autor (2020)

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Polissacarídeos de algas

Os polissacarídeos têm funções estruturais e de armazenamento nas algas, sendo os estruturais os mais explorados comercialmente, tais como: agarose, carragenanas e ácidos algínicos (MISURCOVÁ et al., 2015).

O teor de polissacarídeos em algas varia de 4 a 76% em peso seco. Dentre as espécies de algas que contêm maior teor de polissacarídeos estão as dos gêneros *Ascophyllum*, *Porphyra*, *Palmaria* e especialmente as espécies do gênero *Ulva*, que possuem mais de 65% em peso seco (USMAN et al., 2017).

A composição química dos polissacarídeos das algas varia de acordo com a espécie da alga, sua função estrutural, forma de cultivo, habitat e condições ambientais de crescimento, que refletem em suas propriedades (RAMAWAT; MÉRILLON, 2015).

O aumento no uso biotecnológico de polissacarídeos deve-se à tendência de substituir o uso de polímeros sintéticos por aqueles de origem natural (ARAD; LEVY-ONTMAN, 2010).

A vantagem dos polissacarídeos em comparação com os polímeros sintéticos existentes é a sua não toxicidade, baixo custo e biodegradabilidade (KUMAR et al., 2017).

3.2 Alginato

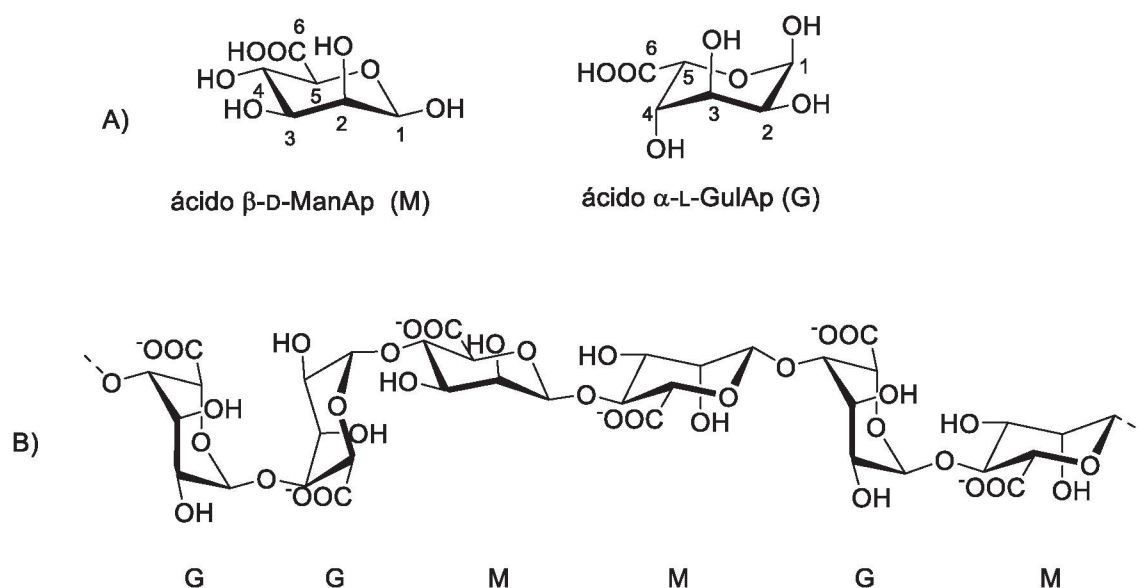
Os alginatos são polissacarídeos obtidos a partir de algas marrons (*Phaeophyta*), sendo constituintes da parede celular, e de bactérias dos gêneros *Azotobacter* e *Pseudomonas*, os quais apresentaram grupos acetila em sua estrutura. Os alginatos comerciais são extraídos principalmente de algas dos gêneros *Ascophyllum nodosum*, *Laminaria* spp, *Lessonia nigrescens*, *Ecklonia maxima*, *Macrocystis pyrifera* e *Durvillea antarctica*, com tratamento alcalino e posterior precipitação com cloreto de sódio ou cálcio para obtenção do correspondente sal de alginato. O alginato constitui entre 18% a 40% do peso seco das algas marrons (BEMILLER, 2018, SZEKALSKA et al., 2016).

Os alginatos são copolímeros lineares formados por unidades 4-ligadas de ácido β -D-manurônico (ManAp) (M), na conformação 4C_1 , e de ácido α -L-gulurônico

(GulAp) (G), na conformação 1C_4 (Figura 1A) (BEMILLER, 1996; FENORADOSOA et al., 2010).

Estes monossacarídeos são arranjados em blocos homopoliméricos (M ou G) ou heteropoliméricos alternados (MGMG) (Figura 1B) (HAUG; LARSEN, 1966).

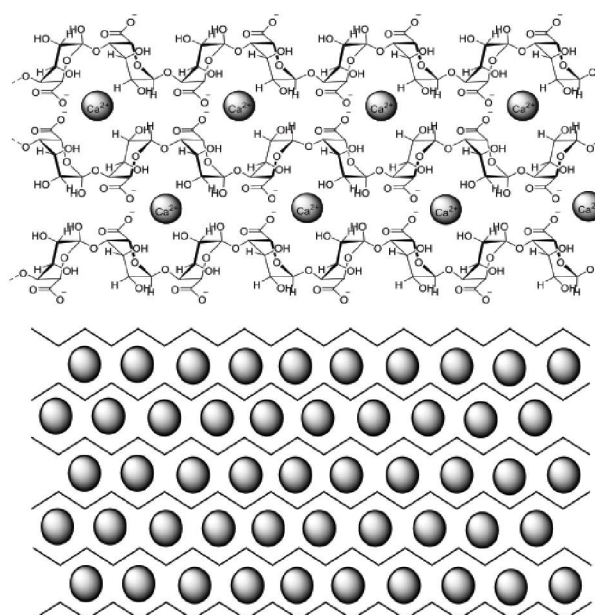
FIGURA 1- ESTRUTURA QUÍMICA DO ALGINATO



Fonte: O autor (2020)

A composição do alginato depende da espécie, localização geográfica, época de coleta e das partes das algas de que é extraído. A relação entre blocos M e G (razão M/G) pode variar e assim resultar em poliurônídeos com propriedades físico-químicas diferenciadas (LEAL et al., 2008; YANG et al., 2011). Por exemplo, géis formados por alginatos que possuem alto teor de ácido GulAp possuem melhores propriedades mecânicas, pois a presença de ácido GulAp permite formação de “egg box” (figura 2) com cátions divalentes (p. ex. Ca^{2+}), originando um gel com maior rigidez quando comparado aos géis de alginato com alto teor de ácido manurônico (BEMILLER, 1996; DRAGET, TAYLOR; 2011; FENORADOSOA et al., 2010; LEE, MOONEY, DAVID; 2012).

FIGURA 2 MODELO CAIXA DE OVOS



Fonte: O autor (2020)

A Tabela 1 mostra as proporções de ácidos ManAp e GulAp de alginatos produzidos por diferentes espécies de algas, calculadas por experimentos de ressonância magnética nuclear de alta resolução ^1H (RMN), onde G representa a porcentagem total de ácido GulAp B_G indica a porcentagem de blocos constituídos apenas por ácido GulAp, M é a porcentagem total de ácido ManAp, B_M representa a porcentagem do blocos contendo somente ácido ManAp e B_{GM} representa a porcentagem de alginato contendo blocos heteropoliméricos constituídos por ácido GulAp e ManAp (STEPHEN; PHILLIPS, 2016).

TABELA 1 - AVALIAÇÃO QUANTITATIVA (%) DE ÁCIDO GULURÔNICO E MANURÔNICO DE ALGINATOS DE DIFERENTES ALGAS

FONTE	G	M	B_G	B_M	B_{GM}
<i>Laminaria longicurris</i>	33	67	23	57	10
<i>L. japonica</i>	35	65	18	48	17
<i>L. digitata</i>	41	59	25	43	16
<i>L. saccharina</i>					
Folha nova	35	65	25	55	10
Folha velha	46	54	32	40	14
<i>L. basilinsis</i>					

Folha	53	47	33	27	20
Estipe	54	46	31	23	23
<i>L. hyperborea</i>					
Folha	55	45	38	28	17
Estipe	68	32	56	20	12
Outro corte	75	25	66	16	09
<i>Saccorhiza polyschides</i>					
Folha	58	42	46	30	12
Estipe	49	51	34	36	15
<i>Lessonia nigrescens</i>	38	62	19	43	19
<i>Ecklonia maxima</i>	45	55	22	32	32
<i>Macrocystis pyrifera</i>	39	61	16	38	23
<i>Egregia laevigata</i>	43	57	26	40	17
<i>Eisenia bicyclis</i>	38	62	25	49	13
<i>Durvillea antarctica</i>	29	71	15	57	14
<i>Ascophyllum nodosum</i>					
Receptáculo	10	90	04	84	06
Tecido velho	36	64	16	44	20
<i>Hormosira bnaksii</i>	39	61	35	57	04
<i>Himanthalia elongata</i>	39	61	21	43	18
<i>Dictyosiphon foeniculaceus</i>	67	33	61	27	06
<i>Elachista fuicola</i>	78	22	68	12	10
<i>Scytosiphon lomentaria</i>	50	50	41	41	09

Fonte: Adaptado de Stephen; Phillips, 2016

3.3 Aplicações do alginato

A produção global anual de alginato é estimada em 26.500 toneladas, correspondentes à 126.500 toneladas de algas. O alginato é extensivamente utilizado na indústria têxtil, alimentícia, farmacêutica e médica, produzindo uma receita anual de 214 milhões de dólares (FERNANDO et al., 2019; MCHUGH, 2003).

As principais propriedades do alginato que são exploradas pela indústria são a sua capacidade de aumentar a viscosidade das soluções aquosas e de formar géis e filmes na presença de íons cálcio (MCHUGH, 2003).

Apesar de ter um maior custo quando comparado ao amido, na indústria têxtil o alginato é utilizado como espessante de tinta para aumentar o rendimento no processo de tingimento de tecidos, pois não reage com corantes e sai facilmente com lavagem (ŠOSTAR TURK; SCHNEIDER, 2000).

A propriedade espessante do alginato é extensivamente explorada na indústria alimentícia na preparação de molhos, xaropes e coberturas de sorvetes, em emulsões água-óleo, como maionese e molhos para saladas, a adição de alginato como aditivo ajuda a não separar a mistura. Ainda, o alginato melhora a textura, o corpo e o brilho desses produtos, evitando que haja precipitação em produtos como iogurtes, achocolatados e cremes (MCHUGH, 2003).

O alginato de cálcio na forma de filme é utilizado como revestimento para a conservação de peixes congelados, impedindo a oxidação espontânea do mesmo quando em contato com o ar. A carne, por outro lado, é coberta por filmes de alginato para evitar a contaminação bacteriana, sendo também de fácil remoção (STEPHEN; PHILLIPS, 2016).

Nas indústrias química e bioquímica, o alginato é utilizado como matriz de imobilização para a biocatálise como, por exemplo, de enzimas utilizadas para a produção de glicose a partir da frutose e a conversão de amido em etanol (GAO et al., 2016; ILLANES, 2011; MCHUGH, 2003).

Na área da saúde, a propriedade de formação de filmes é explorada na obtenção de membranas para uso como curativos de lesões cutâneas, ajudando a melhorar o tempo de cicatrização e evitando a infecção. Entre os produtos disponíveis comercialmente estão o AlgiDERM® e o Sorban®, que são capazes de absorver exsudato em até 20 vezes o seu peso (RINAUDO, 2006). Ainda, pode ser utilizado como biomaterial na engenharia de tecidos, devido à sua biocompatibilidade e capacidade de formação de hidrogéis, microesferas, microcápsulas, esponjas, espuma e fibras, bem como à sua biodegradabilidade e resistência mecânica. Na literatura encontram-se vários exemplos, como o uso de alginato para o encapsulamento de fatores de crescimento, como BMP-2 (*Bone Morphogenetic Proteins*) e RGD (Arginina-Glicina-Ácido Aspártico), com melhora na regeneração do tecido ósseo (VENKATESAN et al., 2015).

Quanto à sua atividade biológica, dentre as diversas já reportadas, uma delas é a atividade antitumoral contra células RAW264.7, linhagem de macrófagos de camundongos que induzem a produção de TNF- α (fator de necrose tumoral). Nesse estudo, foi observada uma atividade dependente da massa molecular bem como da razão M/G (UENO; ODA, 2014). A atividade antitumoral contra sarcoma 180, células de Ehrlich e carcinoma IMC em camundongos de alginatos extraídos de algas marrons

das espécies *Sargassum fulvellum* e *Sargassum kjellma nianum*, foi relacionada com alta percentagem de ácido manurônico (KHOTIMCHENKO, 2010).

3.4 Modificações químicas de polissacarídeos

As diferentes atividades biológicas que os polissacarídeos podem apresentar estão diretamente relacionadas com a estrutura química, conformação e massa molecular dos mesmos (LEE et al., 2012). Por exemplo, no trabalho de Ferreira et al. (2019), foram avaliadas a atividade hemolítica, proteolítica e hemorrágica de agaranas sulfatadas extraídas da alga vermelha *Laurencia dendroidea*, apresentando potencial atividade contra o veneno de serpentes *Lachesis muta* e *Bothrops jararaca*.

Os polissacarídeos que têm baixa ou nenhuma atividade biológica podem ser funcionalizados por modificações químicas para introduzir, amplificar ou modificar uma bioatividade, o que permite obter novos derivados a partir de diversos polímeros como celulose, amido, quitosana e alginato (GOPINATH et al., 2018; MENG; EDGAR, 2016). Como exemplo, carragenanas extraídas das algas vermelhas *Kappaphycus alvarezzi*, *Gigartina skottsbergii* e *Eucheuma denticulatum* foram submetidas a modificação química por oxidação seletiva usando *N*-oxil-2,2,6,6-tetrametilpiperidina e ácido tricloroisocianúrico. Após esta modificação, as carragenanas apresentaram potencialização na atividade anticoagulante (DOS SANTOS-FIDENCIO et al., 2019).

Polissacarídeos são extensivamente estudados e modificados para gerar novas propriedades como: liberação controlada de medicamentos (GUPTA et al., 2012), obtenção de materiais biomédicos (DALHEIM et al., 2016) e curativos de feridas (BALDWIN; KIICK, 2010). Além disto, polissacarídeos modificados podem apresentar atividades antioxidante (WANG et al., 2008), antimicrobiana (SALEM et al., 2019), antiviral (MENDES et al., 2014), e anticoagulante (DE ARAÚJO et al., 2013). Outro aspecto importante é a utilização para formação de nanogéis e hidrogéis com propriedades adequadas para uma aplicação específica desejada (MENG; EDGAR, 2016).

As modificações químicas mais utilizadas para obtenção de novos derivados de polissacarídeos são: sulfatação, acetilação, aminação, esta última modificação serve para criar polissacarídeos com terminal azida precursores realizar reações *click chemistry* de tipo ciclo adição azida-acilo (*CuAAC*).

3.4.1 Sulfatação

A sulfatação química de polissacarídeos é utilizada para aumentar a solubilidade em água e gerar produtos com novas atividades biológicas, como antitumoral e anticoagulante (BEDINI et al., 2017; XIAO et al., 2019).

Diversos estudos mostram que os polissacarídeos sulfatados podem potencializar a característica imunomoduladora do mesmo. Dentre os métodos de sulfatação mais comuns está o de Wolfrom (método ácido clorossulfônico-piridina) (CHEN; HUANG, 2018).

As frações polissacarídicas contendo fucose, ramnose, arabinose, galactose, glicose e xilose, obtidas da alga parda *Sargassum pallidum*, após sulfatação química com ácido clorossulfônico piridina (CSA-Pir), apresentaram propriedades antioxidantes e potencialização da atividade hipoglicêmica em comparação com o polissacarídeo nativo (XIAO et al., 2019).

Polissacarídeos naturalmente sulfatados como a heparina possuem atividade anticoagulante. Polissacarídeos sulfatados quimicamente, como o alginato de sódio, por meio do ácido clorossulfônico em formamida, também apresentaram atividade anticoagulante com concentração de 16,7µg/mL em testes de TTPA (Tempo de tromboplastina parcial ativada) *in vitro* (RONGHUA et al., 2003).

A ulvana obtida da alga verde *Ulva pertusa* é um polissacarídeo que apresenta grupos sulfato em sua estrutura nativa. Esse polissacarídeo foi submetido à sulfatação química utilizando óxido sulfúrico/dimetilformamida (SO₃/DMF) e sua atividade antioxidante foi testada em comparação à ulvana nativa. A atividade antioxidante foi potencializada nas frações que apresentaram 30,8 e 32,8% de sulfato na sua estrutura (QI et al., 2005). Ulvanas extraídas de alga verde *Ulva fasciata* por extração aquosa, foram modificadas por reações de oxidação com periodato de sódio, reduzidas por borohidrato de sódio e subsequentemente sulfatadas quimicamente pelo complexo de piridina enxofre. Após a modificação, a atividade anticoagulante *in vitro* foi avaliada por meio do teste de tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA), que mostrou que as ulvanas modificadas apresentaram melhor atividade que a fração nativa (ALVES, 2019; DE CARVALHO et al., 2018).

3.4.2 Acetilação

A acetilação modifica a solubilidade em água dos polímeros, sendo uma propriedade para atividade biológica. Os agentes de acilação mais utilizados são ácido acético e anidrido acético em solventes orgânicos (CHEN; HUANG, 2018).

Como exemplo, ulvanas extraídas da alga *Ulva pertusa* foram quimicamente acetiladas utilizando *N,N*-dimetilacetamida (DMAc), obtendo-se substituição nos carbonos C-2 e C-3 da ulvana nativa. Após essa modificação, a atividade anti hiperlipidêmica foi avaliada *in vivo*, sendo que as ulvanas acetiladas apresentaram maior diminuição de colesterol no sangue em comparação com as ulvanas nativas (QI et al., 2012).

A atividade antioxidante de carragenanas nativas e carragenanas quimicamente acetiladas com anidrido acético em dimetilformamida foi avaliada pelo método do 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH), demonstrando a maior atividade das carragenanas acetiladas (YUAN et al., 2005).

3.4.3 Aminoação

Polissacarídeos aminados, nativos e modificados quimicamente (seja por reações de aminoação ou inserção de grupos amino por outras estratégias), vêm sendo estudados para utilização como agente antimicrobiano. A quitosana, um polissacarídeo naturalmente aminado, inibe o crescimento de várias bactérias e fungos, possui poder antibacteriano de amplo espectro e tem baixa toxicidade em células de mamíferos (VENKATRAMAN, 2018).

Existem três mecanismos propostos que explica o poder antibacteriano dos polissacarídeos aminados: a interação com as cargas negativas da superfície celular, produzindo permeabilidade na parede do microrganismo, quelção de metais desestabilizando as paredes microbianas e a interação com DNA bacteriano. Dessa forma, percebe-se a influência da presença de grupos amino para atividade antimicrobiana de polissacarídeos (ARORA et al., 2016; SUDARSHAN et al., 1992).

A atividade antibacteriana de derivados de quitosana após inserção de grupos amino foi avaliada e observou-se melhor atividade nos derivados que possuem maior grau de substituição na estrutura, aumentando a carga catiônica natural do polissacarídeo nativo e, assim, melhorando a interação com as cargas negativas das paredes dos microrganismos (MOHY ELDIN et al., 2012).

Uma xiloglucana extraída de tamarindo e funcionalizada com grupos amino, apresentou maior atividade antimicrobiana comparando-a com quitosana, mostrando inibição do crescimento de bactérias na concentração de 1% (SIMI; ABRAHAM, 2010).

3.4.4 Amidação

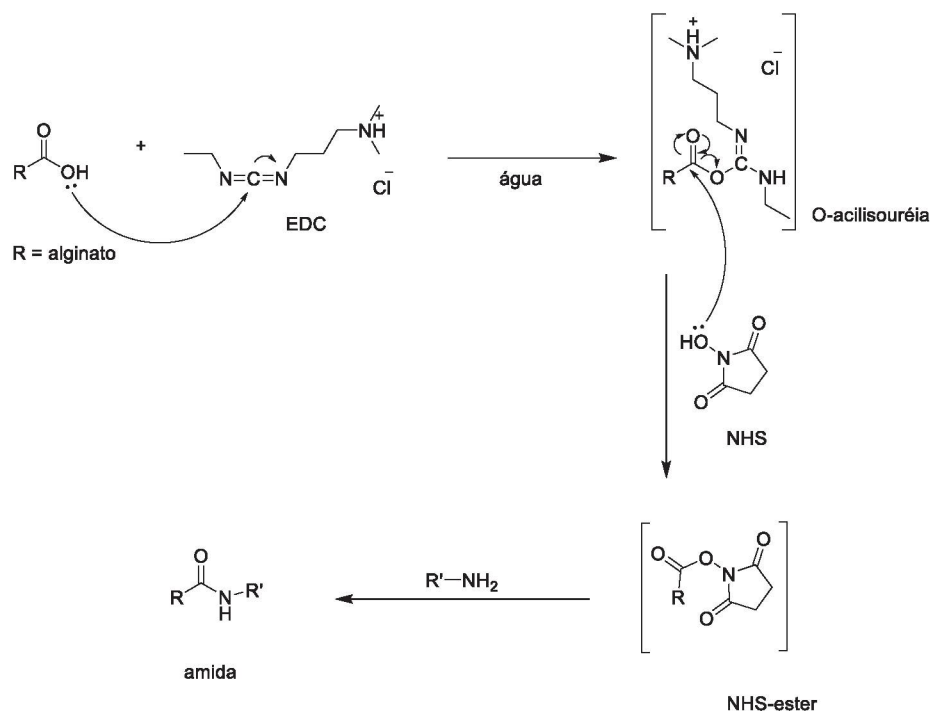
Um dos grupos funcionais mais reativos no polissacarídeos é o grupamento ácido carboxílico, que permite modificação química sem técnicas de proteção/desproteção. Uma das estratégias mais utilizadas é a amidação (CHHATBAR et al., 2011; MENG e EDGAR, 2016; PAWAR e EDGAR, 2013; SCHANTÉ et al., 2011; TAUBNER et al., 2017).

Estas transformações químicas referem-se ao processo pelo qual uma amida é formada na estrutura do polissacarídeo. Entre as técnicas de amidação polissacarídica, pode-se descrever a reação utilizando carbodiimida que tem sido extensivamente estudada. Esta reação esterifica os grupos carboxila do polissacarídeo com 1-etil-3(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) introduzindo os grupos amidas ao polissacarídeo (Figura 3) (CUMPSTEY, 2013; FERNANDO et al., 2019; TAUBNER et al., 2017). Esta reação inicia com a ionização do carboxila (1) e a protonação da carbodiimida formando um intermediário *O*-acilisouréia que é instável (2). Esse intermediário pode sofrer rearranjo formando o subproduto *N*-aciluréia (6) ou ainda pode se converter na forma protonada e posteriormente em amida (3), com o ataque de uma amina primária (SCHANTÉ et al., 2011).

A *O*-acilisouréia (2) também pode ser atacada por outro grupo carboxila, sofrer um ataque de uma amina e produzir ureia (4) como subproduto (COLODI, 2017). Um meio ligeiramente ácido é necessário para a protonação do EDC. A formação do subproduto *N*-aciluréia não é desejável, uma vez que não forma ligação amida, gerando baixo desempenho da reação (BULPITT; AESCHLIMANN, 1999).

apresentou alta atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, avaliada com diferentes graus de amidação (KOUASSI et al., 2017).

FIGURA 4 – ESQUEMA DE REAÇÃO EDC/NHS



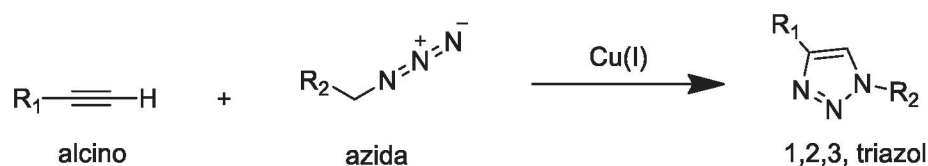
Fonte: Adaptada Park et al., 2015

3.4.5 Click chemistry

Sharpless e colaboradores definiram reações *click* como um conjunto de reações que geram produtos que podem ser removidos por métodos não cromatográficos, estereoespecíficos, sendo fáceis de executar e que requerem solvente menos tóxico e de fácil remoção, tal como água. Esse tipo de reação tem sido utilizada em várias sínteses orgânicas e de carboidratos (HEIN et al., 2008; KOLB et al., 2001; KRITCHENKOV; SKORIK, 2017; LEOPHAIRATANA et al., 2018).

As reações *click* mais utilizadas são as reações de cicloadição de azida-alcino catalisada por cobre (CuAAC - *Cu(I)-Catalyzed azide-alkyne cycloaddition*). Estas reações são conhecidas pela formação de 1,2,3-triazóis (Figura 5), ao contrário das reações de *click* de Huisgen, que não são seletivas e produzem substituição de 1,4 e 1,5-triazóis (BINDER; SACHSENHOFER, 2007; LIANG; ASTRUC, 2011).

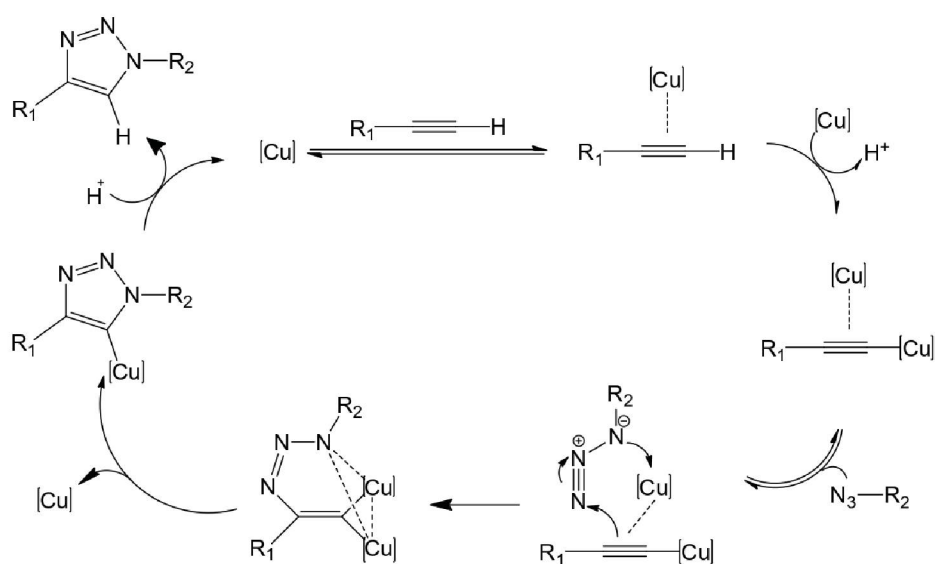
FIGURA 5 - ESQUEMA DE REAÇÃO CuAAC



Fonte: Modificada de Haldón et al. (2015)

O papel do Cu^{I} como catalisador contribui para a regioseletividade da reação de CuAAC em 1,4 (Figura 6). O Cu^{I} é obtido por catálise prévia de um sal de Cu^{II} , geralmente CuSO_4 , e o ácido ascórbico é usado como agente redutor (MENG; EDGAR, 2016).

FIGURA 6 - MECANISMO DE REAÇÃO CLICK CuAAC



Fonte: B. T. Worell et al (2013)

A inserção de um grupo azida em inulina, com posterior reação de *click* CuAAC para inserção de grupo amina terminal livre, demonstrou-se eficaz para a produção de derivados com atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* (DONG et al., 2014). Ainda, foi reportado que polissacarídeos modificados por reações *click* obtêm ou melhoram a atividade biológica como antimicrobianos e antifúngicos em comparação com os polissacarídeos nativos (PETROVA et al. 2015; TAN et al., 2017).

3.5 Modificações químicas de alginato

Várias modificações químicas do alginato fornecem novas propriedades gelificantes, solubilidade e características mecânicas de seus hidrogéis em comparação com o alginato nativo, expandindo suas aplicações em biomedicina (PAWAR; EDGAR, 2013).

O alginato, por ser um polissacarídeo constituído apenas por ácidos urônicos, é um excelente modelo para realização de modificações químicas. Alginato sulfatado quimicamente através de reação com bissulfito de sódio e nitrito de sódio, apresentou atividade anticoagulante em teste de APTT *in vitro*, com tempo de coagulação de 27s na concentração de 75g/mL de polissacarídeo modificado (FAN et al., 2011).

A heparina é um polissacarídeo sulfatado e possui atividade anticoagulante. Ronghua et al. (2003) realizaram uma sulfatação química usando o sistema HClSO_3 /formamida para avaliar a atividade anticoagulante *in vitro* do alginato modificado e seus derivados quaternizados com cloreto-3-epoxipropiltrimetilamônio em diferentes concentrações, obtendo diferentes produtos, aquele com melhor atividade anticoagulante nos testes APTT foi de 226s com uma concentração de 16,7 ug/mL, valor que diminuiu em comparação com o alginato sulfatado na mesma concentração (ARLOV; SKJÅK- BRÆK, 2017).

A acetilação do alginato tem sido usada para comparar com o alginato de origem bacteriana que possui grupos acetil em sua estrutura, a modificação química é realizada usando ácido acético glacial em meio aquoso usando como catalisador ácido sulfúrico ou perclórico, outra alternativa é usar cetena. Após essa modificação química, pode-se observar que quanto maior o grau de acetilação no alginato, menor a afinidade por íons divalentes, criando hidrogéis com melhor flexibilidade do que o alginato nativo usado em aplicações biomédicas (SKJÅK-BRÆK et al., 1989).

Por meio da oxidação seletiva com periodato de sódio dos ácidos urônicos em C2-C3, alginatos dialdeídicos foram obtidos utilizando dois métodos de condensação, um por agitação e outro por micro-ondas com *orto*-fenildiamina. Um composto com atividade antimicrobiana foi obtido, apresentando inibição de diversos microrganismos (SALEM et al., 2019).

Por degradação induzida por radiação, foi possível obter frações de alginato de sódio com diferentes proporções G/M e de menor massa molecular, as quais foram avaliadas quanto ao seu potencial antioxidante. Observou-se que a atividade

antioxidante de alginatos é inversamente proporcional ao tamanho da fração, ou seja, quanto menor o fragmento, maior sua atividade (ŞEN; ATIK, 2012).

Foram obtidos derivados de alginato com propriedades anfipáticas, ou seja, eles podem formar micelas tendo solubilidade em dois tipos de solventes, neste caso água e solvente orgânico, para obter esses derivados, uma modificação de amidação foi feita com o uso de EDC-HCl para ligar na estrutura do alginato, a cadeia octilamina através de uma ligação amida. Com esse novo recurso do alginato funcionalizado, ele pode ser usado para microencapsular materiais hidrofílicos e hidrofóbicos, como a cialotrina, que é um inseticida comercial, atingindo sua dosagem a longo prazo e evitando as emissões atmosféricas do composto que podem ser prejudiciais à saúde humana. (YANG et al., 2011).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

O alginato de sódio utilizado no presente trabalho foi obtido comercialmente da marca SIGMA, como sal de alginato de algas marrons (número de produto A1112; Lote SLBT1081).

4.1 MÉTODOS DE CARACTERIZAÇÃO

4.1.1 Reação da Ninhidrina

A reação da ninhidrina, análise colorimétrica que determina qualitativamente a presença de aminas primárias, foi realizado utilizando o método descrito para detecção de aminoácidos, com modificações (HEUKO, 2015; YEMM; COCKING, 1955).

Preparou-se uma solução do polissacarídeo nativo (20 mg.mL⁻¹) para controle negativo, uma solução de glucosamina (20 mg.mL⁻¹) como controle positivo e uma solução de polissacarídeo modificado (20 mg.mL⁻¹). Para a avaliação qualitativa da presença de grupos amino livres, a coloração azul/violeta representa positividade para o teste. Adicionou-se 100 µL da solução a ser avaliada em tubo de ensaio, onde em seguida foram adicionados 2 mL de solução de ninhidrina (0,1% p/v) em tampão fosfato (0,01 M, pH=7). Os tubos foram colocados em banho-maria fervente por 5 minutos.

4.1.2 Espectroscopia por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) ¹H – ¹³C

As amostras foram caracterizadas utilizando Espectroscopia por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ¹H, ¹³C. Os espectros foram obtidos com o espectrômetro BRUKER Avance DRX 400 operando na frequência base de 200 MHz e 400 MHz para o núcleo de ¹H e 100 MHz para o núcleo de ¹³C. As amostras foram primeiramente solubilizadas em água deuterada (D₂O), congeladas, liofilizadas e novamente solubilizadas em D₂O. Para esses casos, utilizou-se acetona como padrão interno ($\delta = 2,224$ ppm para ¹H e $\delta = 30,20$ ppm para ¹³C) (DUCATTI et al., 2011). Para análises utilizando clorofórmio deuterado (CDCl₃), a amostra foi solubilizada no solvente deuterado, o qual foi utilizado também como padrão interno ($\delta = 7,26$ ppm para ¹H e $\delta = 77,04$ ppm para ¹³C) (GOTTLIEB et al.,1997). As amostras foram colocadas em tubos de 5 mm de diâmetro e, quando necessário, foi utilizada

temperatura de 70 °C. Os espectros foram analisados com o auxílio do programa TOPSPIN 4.0.8.

4.1.3 Espectroscopia na Região do Infravermelho (IV)

A obtenção dos espectros na região do infravermelho foi realizada com o uso de um espectrômetro ALPHA Bruker, com Transformada de Fourier (TF). A análise direta das amostras foi realizada utilizando acessório de reflectância atenuada - ATR (Centro de Estudos em Biofarmácia - UFPR). O processamento e a interpretação dos espectros deram-se com auxílio do software Opus Viewer.

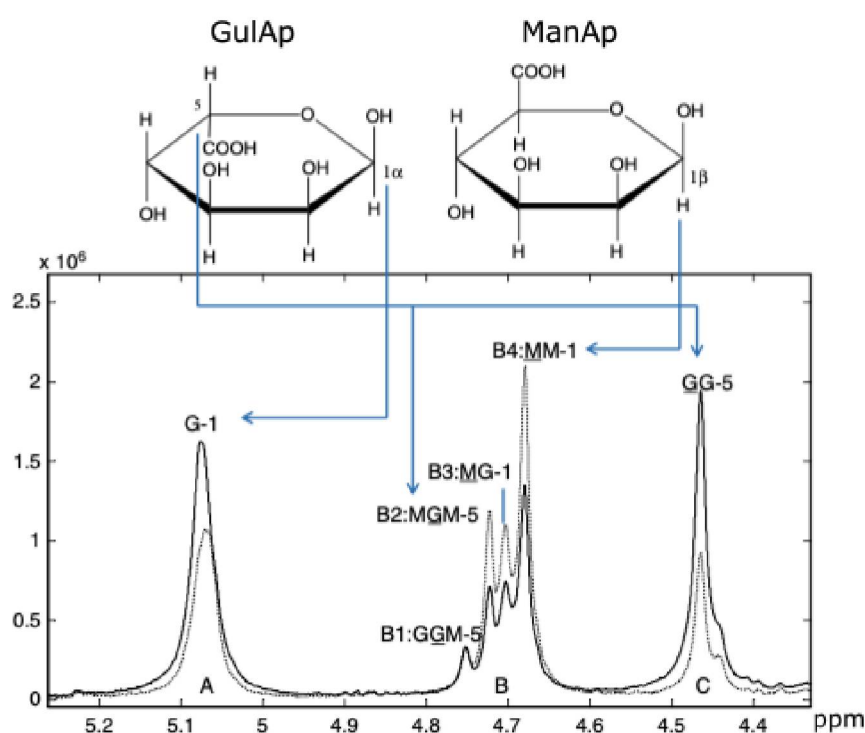
4.1.4 Cálculo M/G do alginato e blocos G e M.

A relação entre unidades de ácido ManAp e ácido GulAp (M/G) foi calculada pelo método proposto por Jensen et al. (2015), utilizando espectro de RMN de ^1H .

Nessa metodologia, são utilizados os valores das integrais das três áreas indicadas na Figura 7, aplicando na seguinte equação:

$$\frac{M}{G} = (I_B + I_C - I_A) / (I_A).$$

FIGURA 7 CÁLCULO M/G DO ALGINATO



Fonte: Adaptado de Jensen, 2015

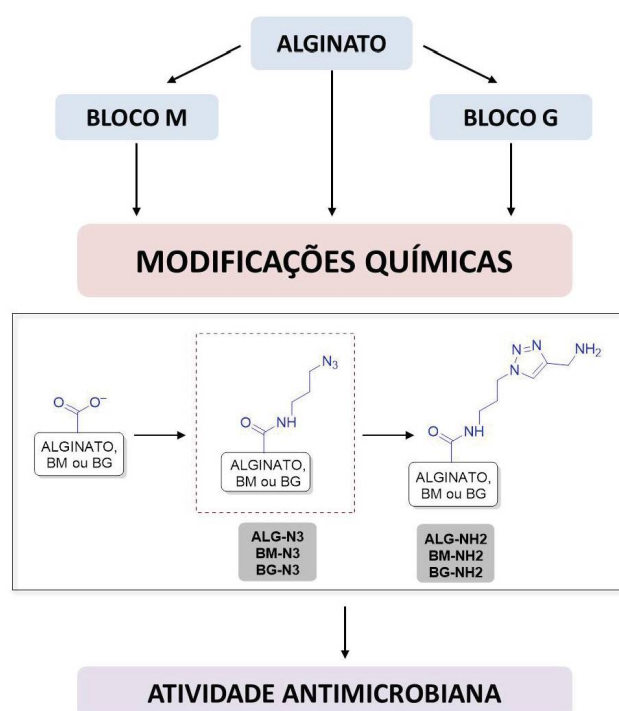
Essa determinação é importante devido à diferença de propriedades mecânicas apresentadas por alginatos com diferentes proporções M/G.

4.2 ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL

A estratégia experimental utilizada no presente trabalho está apresentada nas Figura 8 e 9. A partir do alginato comercial (ALG) e seus produtos homopoliméricos de hidrólise ácida parcial (BG e BM), propôs-se obter derivados versáteis funcionalizados com grupo azida, utilizando os mesmos para obtenção de derivados aminados utilizando *click chemistry*, para posterior avaliação de atividade antimicrobiana (Figura 8).

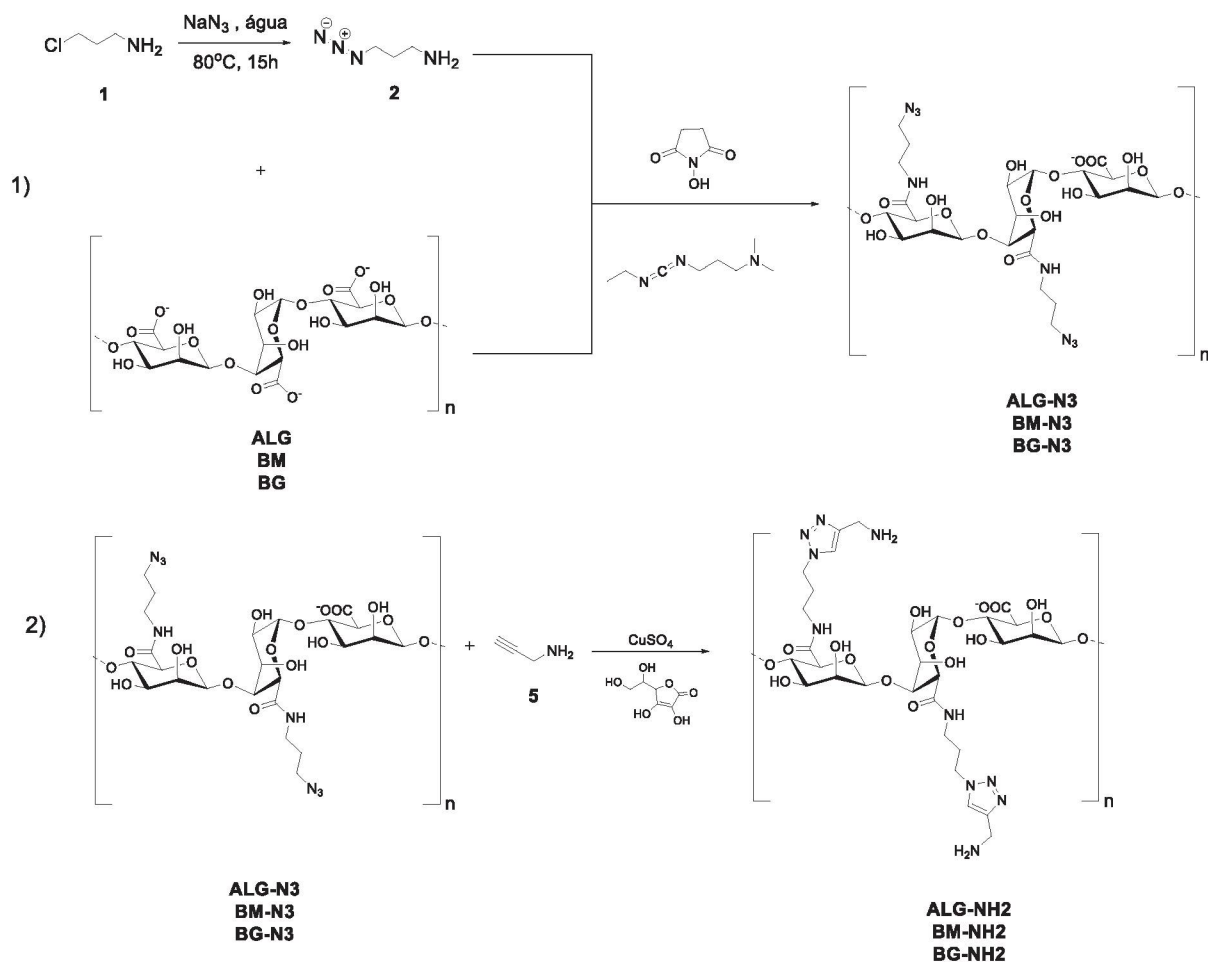
A inserção do grupo azida foi estudada através de reação de amidação, utilizando 3-azidopropilamina (**2**), previamente obtida a partir de 3-cloropropilamina (**1**) e azida sódica. Em seguida, propôs-se a aplicação dos derivados azida (ALG-N3) obtidos em reações de *click chemistry* com a propargilamina (**3**) para obtenção de derivados aminados (ALG-NH2, BG-NH2 e BM-NH2) (Figura 8).

FIGURA 8 - ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL



Fonte: O autor (2020)

FIGURA 9 - ESQUEMA GERAL DE MODIFICAÇÃO ALGINATO



1: 3-cloropropilamina
 2: 3-azidopropilamina
 5: propargilamina

ALG, BG, BM: alginato, bloco G, bloco M e seus derivados

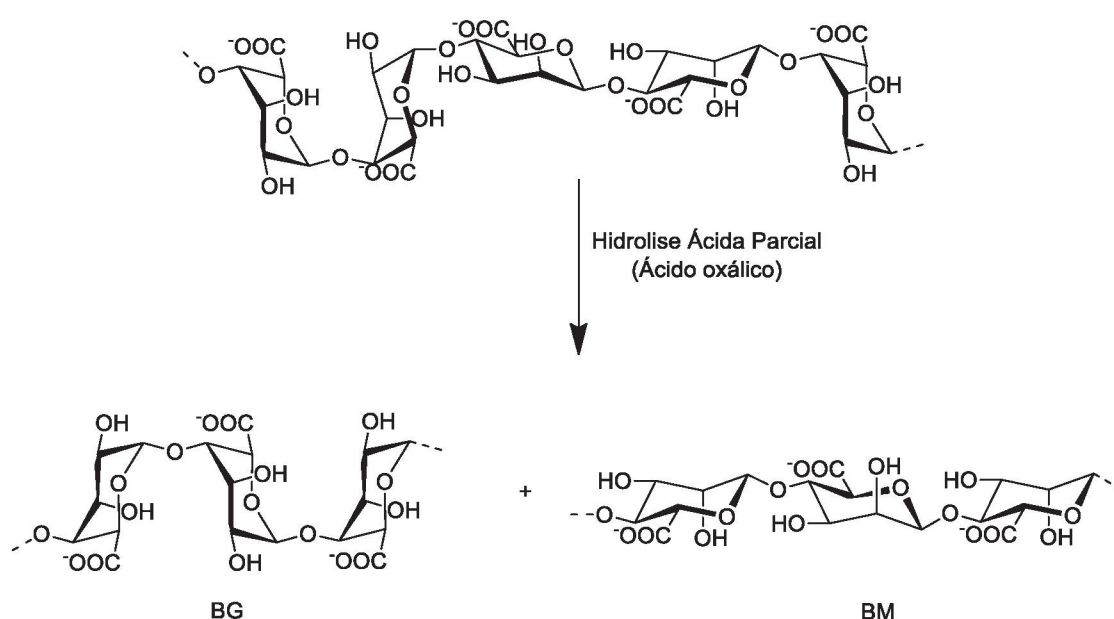
Fonte: O autor (2020)

4.3 MODIFICAÇÕES QUÍMICAS

4.3.1 Hidrólise ácida parcial do alginato

Para a obtenção de blocos homopoliméricos, o alginato foi submetido à hidrólise ácida parcial, seguindo metodologia descrita por Haug et al. (1966) (Figura 10).

FIGURA 10 - ESQUEMA GERAL DE OBTENÇÃO DOS BLOCOS BG E BM A PARTIR DE ALGINATO DE SÓDIO

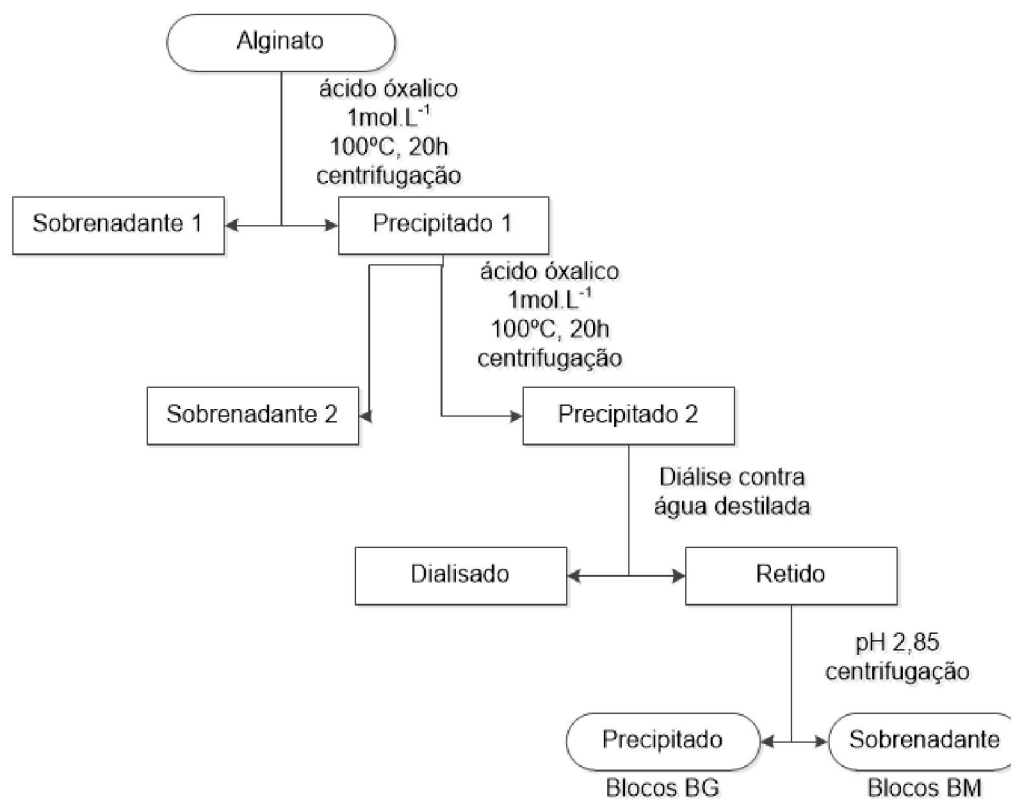


Fonte: O autor (2020)

O alginato de sódio (ALG) (1g) foi solubilizado em 100 mL de solução aquosa de ácido oxálico (1 mol.L^{-1}) e permaneceu por 20 horas, a $100 \text{ }^\circ\text{C}$, em refluxo. Após centrifugação (3500 rpm, $4 \text{ }^\circ\text{C}$, por 30 min), a fração insolúvel foi novamente submetida à hidrólise parcial nas mesmas condições. Após nova centrifugação, a fração insolúvel foi dialisada em membranas (*cut-off* de 6-8 KDa) contra água destilada por 48 horas, e logo após liofilizada. O material resultante foi solubilizado em água destilada sob agitação e, então, o pH foi ajustado para 2,85, utilizando solução de HCl ($0,1 \text{ mol.L}^{-1}$). Após centrifugação (3500 rpm, 4°C , por 30 min), a fração solúvel foi denominada (BM) e a insolúvel (BG) 15,4% e 13,6% respectivamente a partir de 1 g de alginato de sódio.

O pH de ambas as frações foi ajustado até pH 7, com solução de NaOH ($0,1 \text{ mol.L}^{-1}$) e as mesmas foram dialisadas em membranas (*cut-off* de 6-8 KDa) contra água destilada e liofilizadas (Figura 11).

FIGURA 11 - FLUXOGRAMA DE OBTENÇÃO DOS BLOCOS HOMOPOLIMÉRICOS DE MENOR MASSA MOLECULAR A PARTIR DE ALGINATO DE SÓDIO



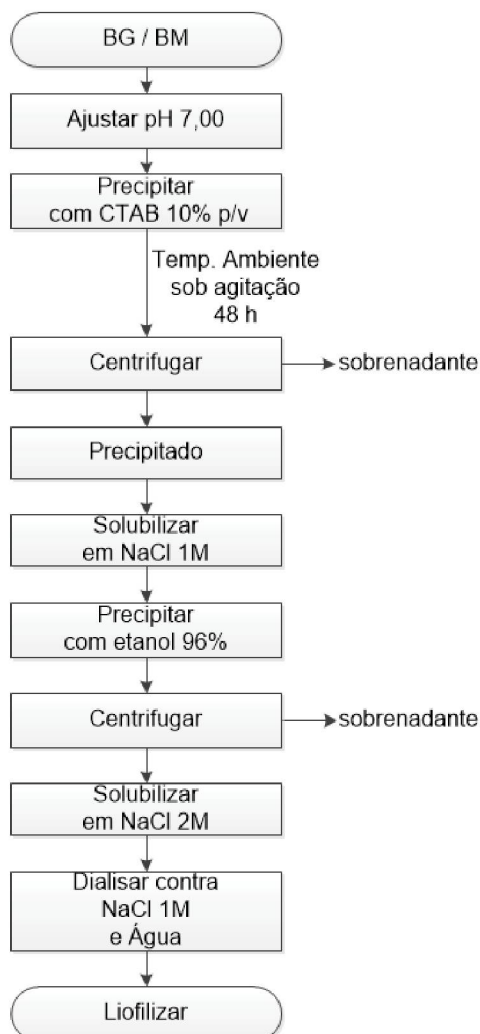
Fonte: O autor (2020)

4.3.2 Purificação das frações BG e BM com brometo de hexadeciltrimetilamônio (CTAB)

A metodologia utilizada para a purificação das frações (BG) e (BM), obtidos na etapa previamente descrita, está apresentada na Figura 12 (FRASES et al., 2008; RABELLO DUARTE et al., 1991)

Os blocos (BM) e (BG) foram solubilizados em água destilada a 1% p/v e em seguida, foi adicionada uma solução de brometo de hexadeciltrimetilamônio (CTAB) a 10%, até concentração final aproximada de CTAB 3% v/v (até não observar mais a formação de precipitado). O material resultante foi deixado em repouso por 48 horas, para então ser centrifugado por 30 minutos a 3500 rpm. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi solubilizado em solução de NaCl 1 mol.L^{-1} .

FIGURA 12 - FLUXOGRAMA DE PURIFICAÇÃO DAS FRAÇÕES BM E BG



CTAB: brometo de cetiltrimetilamônio

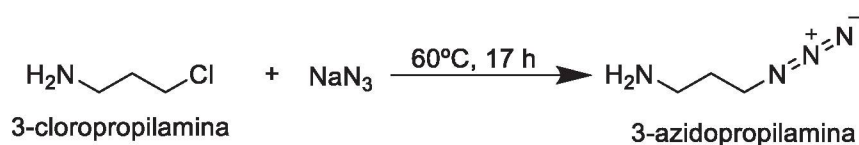
Fonte: O autor (2020)

Posteriormente, o material obtido foi precipitado com 2,5 volumes de etanol 96%, separando novamente por centrifugação (30 min, 3500 rpm), descartando o sobrenadante e solubilizando o precipitado em solução de NaCl 2 mol.L⁻¹. O material obtido foi dialisado em membranas de 6-8KDa contra NaCl 1 mol.L⁻¹ para eliminar o excesso de CTAB durante 24 horas, depois contra água e finalmente congelado e liofilizado.

4.3.3 Obtenção do intermediário 3-azidopropilamina

O intermediário 3-azidopropilamina (Figura 13) foi obtido como o derivado azida a ser posteriormente inserido na cadeia polissacarídica. A metodologia para a obtenção da 3-azidopropilamina foi adaptada de Hanna et al. (2017)

FIGURA 13 - ESQUEMA DE SÍNTESE DA 3-AZIDOPROPILAMINA



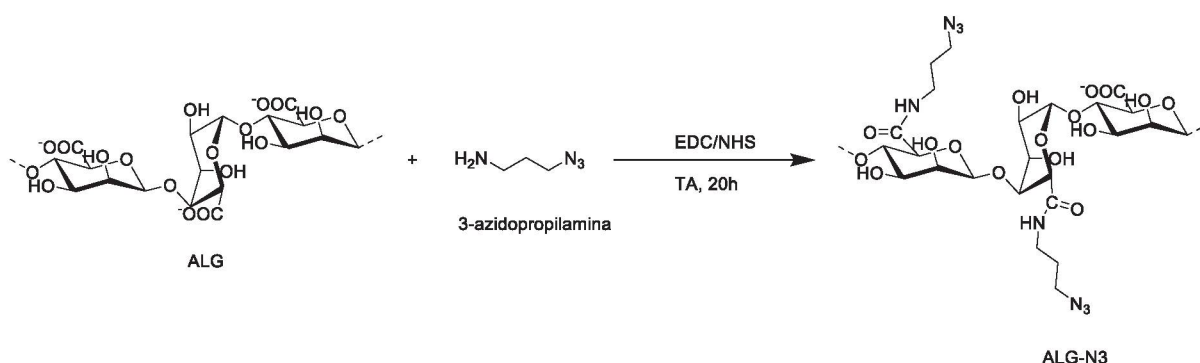
Fonte: O autor (2020)

Solubilizou-se 1 g de 3-cloropropilamina em 4 mL de água destilada. Posteriormente, foram adicionados 1,49 g de NaN_3 e a reação foi aquecida a 80°C durante 15 horas. Em seguida, a solução foi resfriada e foram adicionados 1,10 g de KOH . O material resultante foi extraído com 1 volume de éter dietílico, processo o qual foi repetido durante 3 vezes ($3 \times 5 \text{ mL}$). A fase orgânica foi filtrada num leito de Na_2SO_4 anidro e o filtrado foi evaporado para obtenção da 3-azidopropilamina na forma de um óleo incolor.

4.3.4 Obtenção de derivado de alginato e de blocos BM e BG funcionalizados com grupo azida

Para inserção do intermediário azida na cadeia polissacarídica foram realizadas reações de amidação entre o alginato, ou blocos BM e BG, e a 3-azidopropilamina (Figura 14). Para tal, foi utilizada a metodologia de Park e colaboradores (2017) com modificações.

FIGURA 14 - ESQUEMA DE REAÇÃO PARA OBTENÇÃO DE DERIVADOS DE ALGINATO FUNCIONALIZADOS COM GRUPO AZIDA



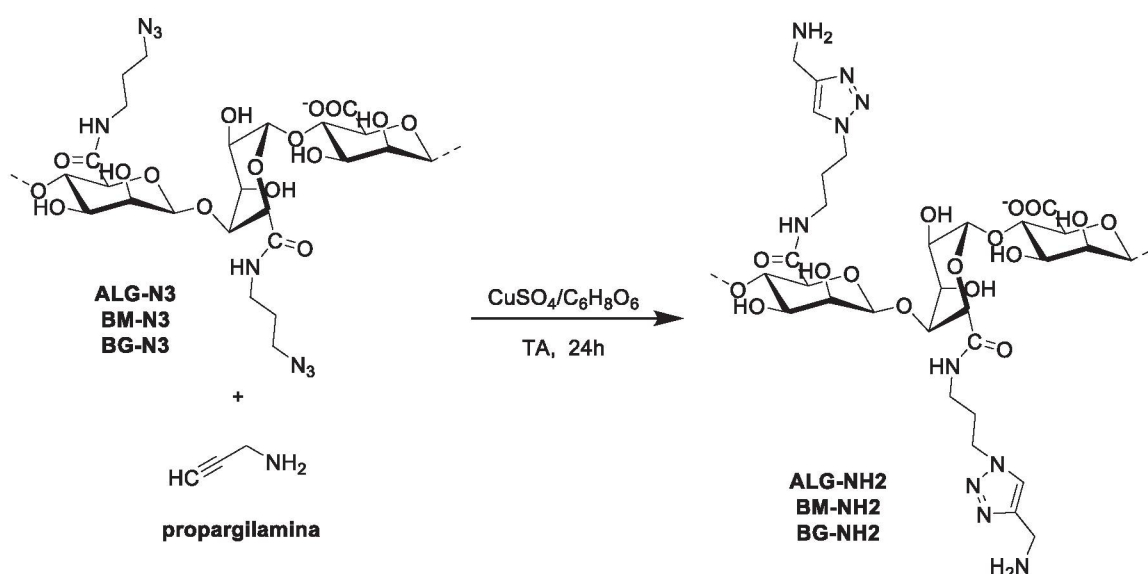
Fonte: O autor (2020)

Primeiramente, foram solubilizados 50 mg de polissacarídeo (ALG, BM ou BG) em solução tampão MES 0,1 M (ácido-(*N*-morfolino)etanossulfônico) pH 6,5 e adicionou-se 10 equivalentes molares de 3-azidopropilamina (91 μ L). Depois foi adicionado EDC (1-etil-3-(dimetilaminopropil)carbodiimida (36 mg) e NHS (*N*-hidroxisuccinimida) (11 mg), numa proporção molar de 2:1. O meio reacional foi mantido por 20 horas à temperatura ambiente. O material obtido (ALG-N3, BM-N3, BG-N3) foi dialisado contra água destilada em membrana MWCO 6-8 kDa, congelada e liofilizada.

4.3.5 Reação *click chemistry* de ciclo adição alcino-azida (CuAAC) entre polissacarídeo azida e propargilamina

A reação entre os polissacarídeos-azida (ALG-N3, BM-N3, BG-N3) e a propargilamina foi realizada de acordo com a metodologia de Uliniuc et al. (2013), com modificações (Figura 15).

FIGURA 15 - ESQUEMA DE REACAO DE CLICK CHEMISTRY ENTRE POLISSACARÍDEO AZIDA E PROPARGILAMINA



Fonte: O autor (2020)

O polissacarídeo previamente funcionalizado com grupo azida (80 mg) foi solubilizado em 8 mL em água deionizada. Então, foram adicionados por gotejamento 5 equivalentes de propargilamina (41 μ L). Em seguida, foram adicionados por gotejamento 0,1 equivalente de solução recém preparada de ácido ascórbico (2,2 mg) em 1 mL em água deionizada, e 0,05 equivalentes de uma solução de sulfato de cobre anidro (1 mg) em 1 mL em água deionizada. Após 24 e 48 horas, a 60 °C em atmosfera inerte (argônio) e protegido da luz, a amostra foi dialisada contra água em membrana de 6-8 kDa e liofilizada para dar origem as frações ALG-NH₂-24, BM-NH₂-24, BG-NH₂-24, ALG-NH₂-48, BM-NH₂-48, BG-NH₂-48.

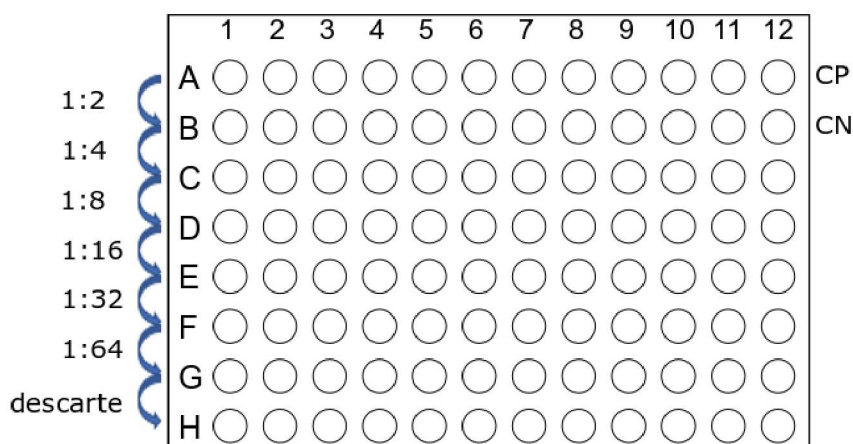
4.3.6 Avaliação da atividade antimicrobiana - Concentração inibitória mínima (MIC)

O teste de concentração mínima inibitória (MIC) foi realizado segundo Veiga et al. (2019), com modificações. Como inóculo, foi utilizada a bactéria *Escherichia coli* ATCC 25922 crescida em ágar Mueller-Hinton, a 35°C, por 24 horas. O mesmo foi diluído em solução salina a 0,9% e até concentração 0,5 na escala de McFarland.

Em microplaca de 96 poços, pipetaram-se 100 μ L da amostra em análise no primeiro poço da primeira coluna da microplaca, depois pipetaram-se 50 μ L de meio

Mueller-Hinton nos demais poços da coluna, e procedeu-se diluição seriada das amostras (5000, 2500, 1250, 625, 312,5, 156,25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). 50 μL de inóculo foram, então, pipetados em todos os poços. O último poço da coluna, sem amostra, foi considerado o controle positivo. Além disso na última coluna foi colocado a solução de penicilina (1 g.mL^{-1}) como agente antimicrobiano positivo (Figura 16). Após 16 horas de incubação a 35 °C, foram adicionados 30 μL de resazurina (150 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e a microplaca foi incubada por mais 1 hora. A mudança de coloração para rosa indica que houve crescimento bacteriano (sem inibição pela amostra). Os testes foram feitos em triplicata.

FIGURA 16 - REPRESENTAÇÃO DILUIÇÃO SERIADA EM MICROPLACA



CP: Controle positivo, CN: Controle negativo

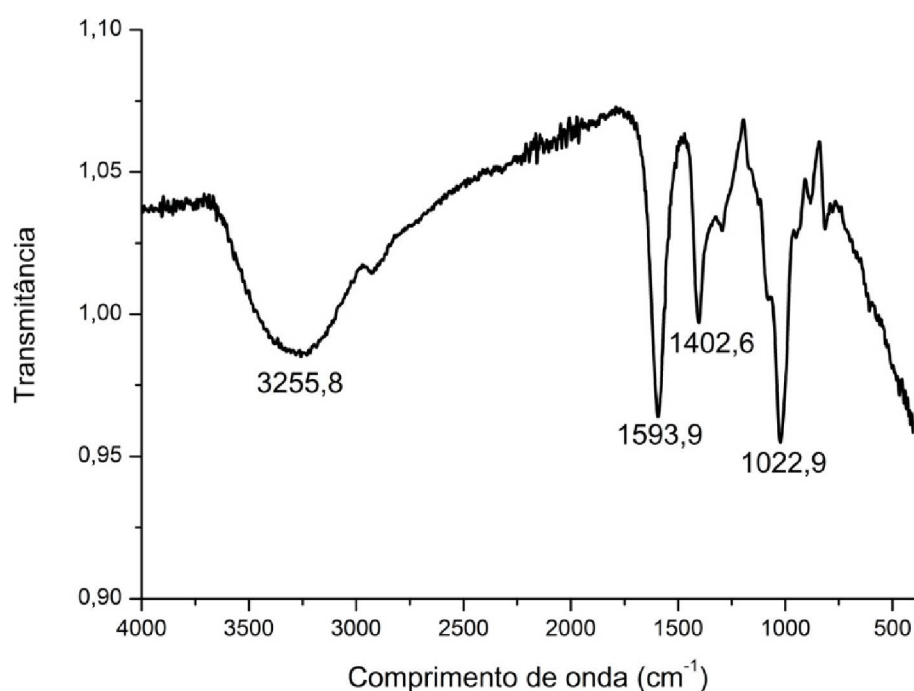
Fonte: O autor (2020)

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização do alginato comercial

O alginato comercial (3-ALG) utilizado no presente trabalho foi caracterizado por espectroscopia na região do IV e RMN bidimensional HSQC. A Figura 17 mostra o espectro infravermelho, onde podem ser observadas bandas na região de 3000-3600 cm^{-1} atribuídas às vibrações O-H e banda característica em torno de 1600 cm^{-1} atribuída ao grupo carbonila da carboxila das unidades de ManAp e GulAp (SANTOS DE LAIA et al., 2014; DAEMI; BARIKANI, 2012; SALOMONSEN et al., 2008; TAUBNER et al., 2017).

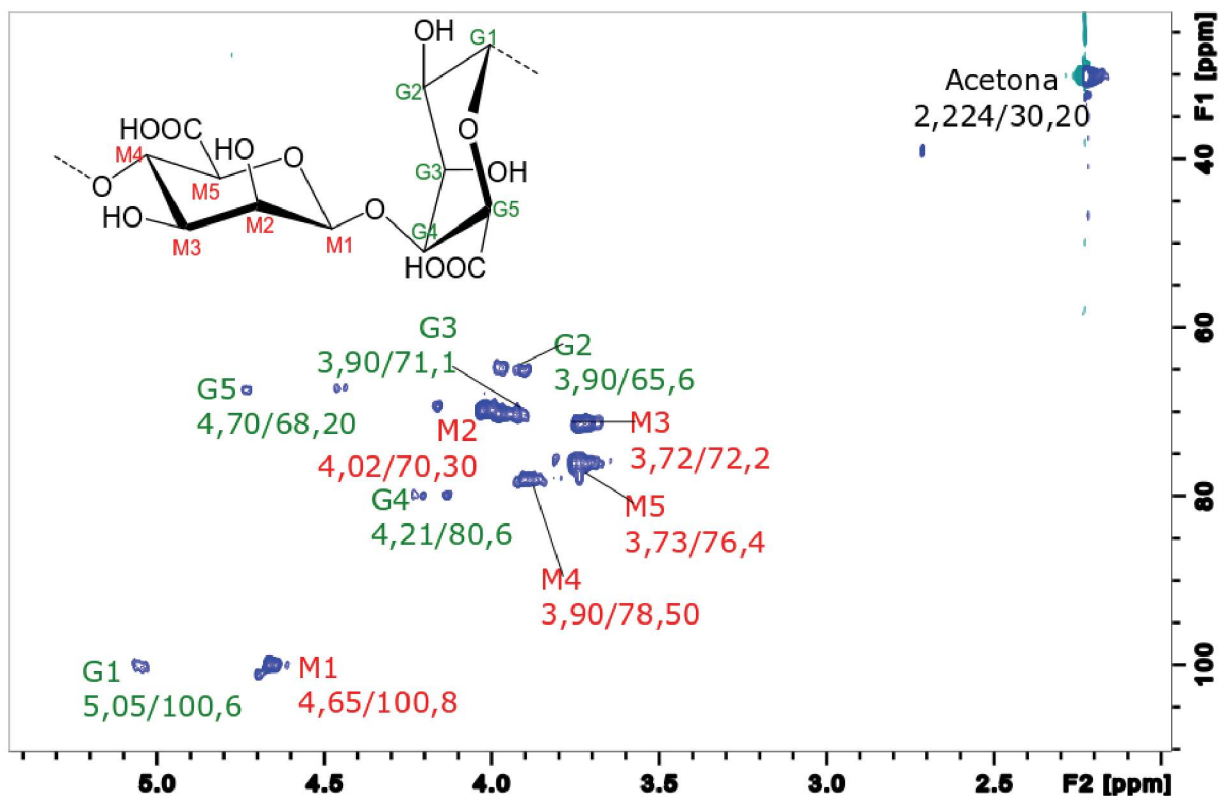
FIGURA 17 - ESPECTRO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO DO ALGINATO (3-ALG)



Fonte: O autor (2020)

Na Figura 18, está apresentado o espectro de RMN HSQC do alginato assinalado e as correlações $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ estão representadas na Tabela 2. Os valores das correlações G1 e M1 (carbono anomérico do ácido α -L-GulAp e do ácido β -D-ManAp) são encontrados em 5,05/100,65 e 4,65/100,80 ppm, respectivamente. Na região entre 65 e 80 ppm são observados os sinais referentes às anéis das unidades GulAp e ManAp (HAUG et al., 1966; JENSEN et al., 2015; LARSEN et al., 2003).

FIGURA 18 - ESPECTRO DE RMN HSQC DO ALGINATO (3-ALG) (400 MHZ)

Solvente: D₂O, 70 °C, acetona padrão interno (2,224/30,20)

Fonte: O autor (2020)

TABELA 2 - ASSINALAMENTO DE $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ DO ALGINATO (3-ALG)

ácido β -D-manurônico	$^1\text{H}/^{13}\text{C}$	ácido α -L-gulurônico	$^1\text{H}/^{13}\text{C}$
M1	4,65/100,80	G1	5,05/100,60
M2	4,02/70,30	G2	3,90/65,60
M3	3,72/72,20	G3	3,90/71,1
M4	3,90/78,50	G4	4,21/80,60
M5	3,73/76,40	G5	4,70/68,20

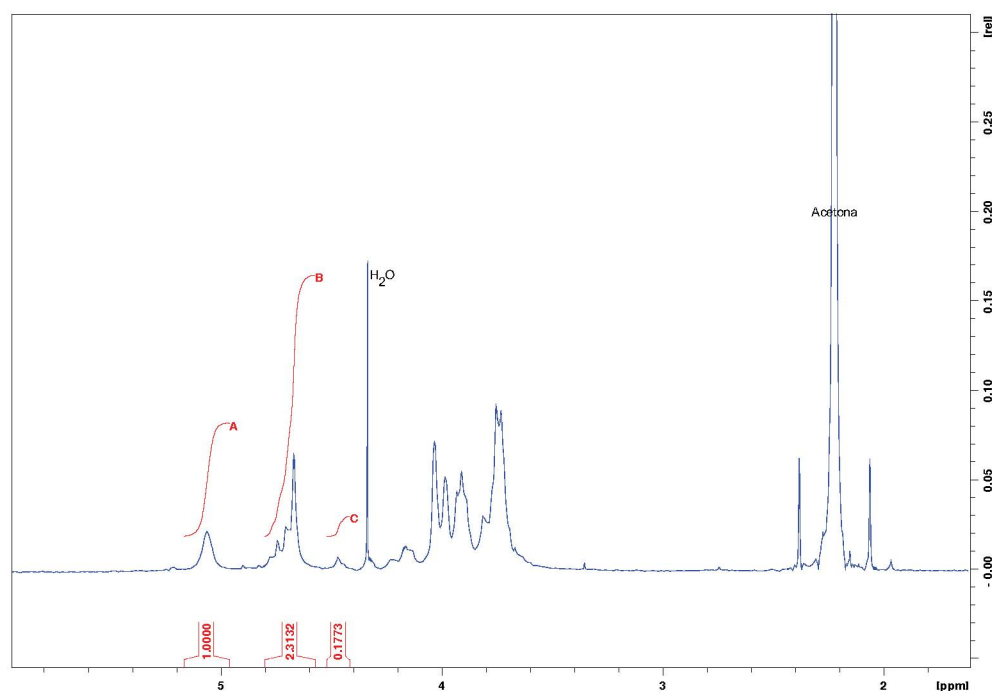
Fonte: O autor (2020)

O valor de M/G foi obtido pelo método proposto por Jensen et al (2015), nessa metodologia, são utilizados os valores das integrais das três áreas indicadas na Figura 19 aplicando na seguinte equação:

$$\frac{M}{G} = (I_B + I_C - I_A)/(I_A)$$

Para o alginato analisado foi de 1,85, sendo esse um valor próximo da média dos valores encontrados para alginatos comerciais. Valores maiores que 1 indicam que a quantidade de ManAp é maior que a do GulAp, representando um alginato de baixa viscosidade (DRAGET, 2009; LEE et al., 2012).

FIGURA 19 - ESPECTRO RMN ^1H ALGINATO COMERCIAL (3-ALG)



Fonte: O autor (2020)

5.2 Obtenção de blocos homopoliméricos BM e BG

A solubilidade em água das duas frações que GulAp e ManAp presentes no alginato permitem a separação dos blocos homopoliméricos dos heteropoliméricos, por apresentarem uma formação cristalina mais forte, os blocos homopoliméricos (BM e BG) permanecem insolúveis na solução de ácido oxálico após do tempo de reação, diferentemente dos blocos de heteropolímeros que são solubilizados e podem ser separados por centrifugação (HAUG et al., 1966)

Para obtenção dos blocos homopoliméricos a partir do alginato, realizou-se a hidrólise parcial com ácido oxálico 1 M para obtenção de duas frações polissacarídicas denominadas BM e BG, que foram obtidas com rendimentos em massa de 15,4% e 13,6%, respectivamente. A variação de rendimento quando comparado à resultados reportados na literatura (Tabela 3) é esperado, sendo que o teor de ácido β -D-ManAp

e α -L-GulAp em alginatos é dependente de diversos fatores como sazonalidade e espécie da alga (DRAGET, 2009; DRAGET et al., 2005; LEE; MOONEY, 2012).

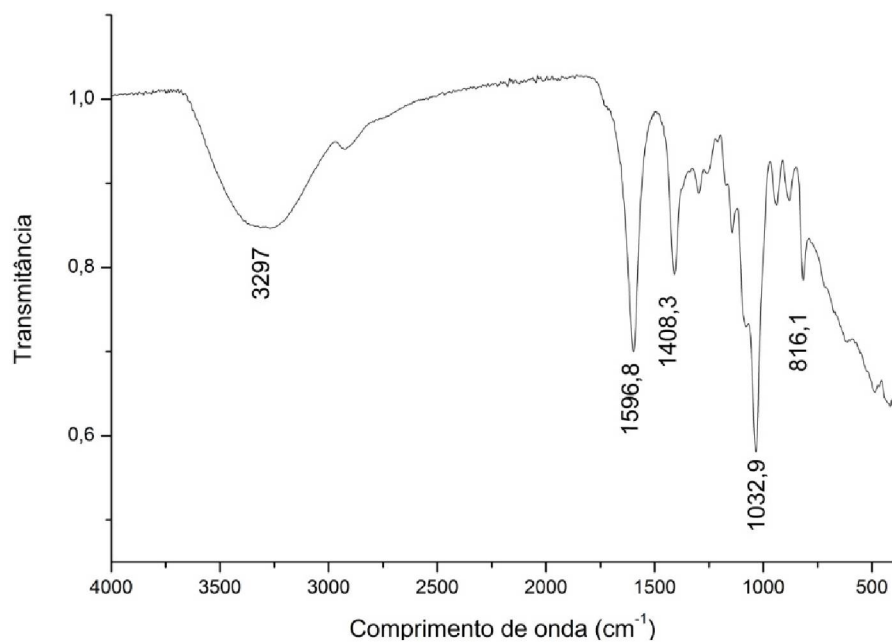
TABELA 3 - PORCENTAGEM DE BLOCOS M E G DE ALGINATOS APÓS HIDRÓLISE PARCIAL

Fonte	Metodologia	(%)		Referência
		BM	BG	
<i>Laminaria digita</i>	1 M ácido oxálico 100 °C 2 x 20h	27,5	18,3	HAUG et al., 1966
<i>Laminaria brasiliensis</i>	1 M ácido oxálico 100 °C 2 x 20h	6,0	17,0	DUARTE et al., 1991
<i>Cystoseira trinode</i>	3 M HCl 100 °C 5 h	11,5	30,4	LARSEN et al., 2003
<i>Sargassum latifolium</i>	3 M HCl 100 °C 5 h	12,4	25,9	LARSEN et al., 2003
<i>Lessonia vadosa</i>	3 M HCl 100 °C 0,5 h	15,3	39,0	CHANDÍA et al.; 2004
Alginato comercial (Sigma) A1112 Lote SLBT1081	1 M ácido oxálico 100 °C 2 x 20h	15,4	13,6	Presente estudo

Fonte: O autor (2020)

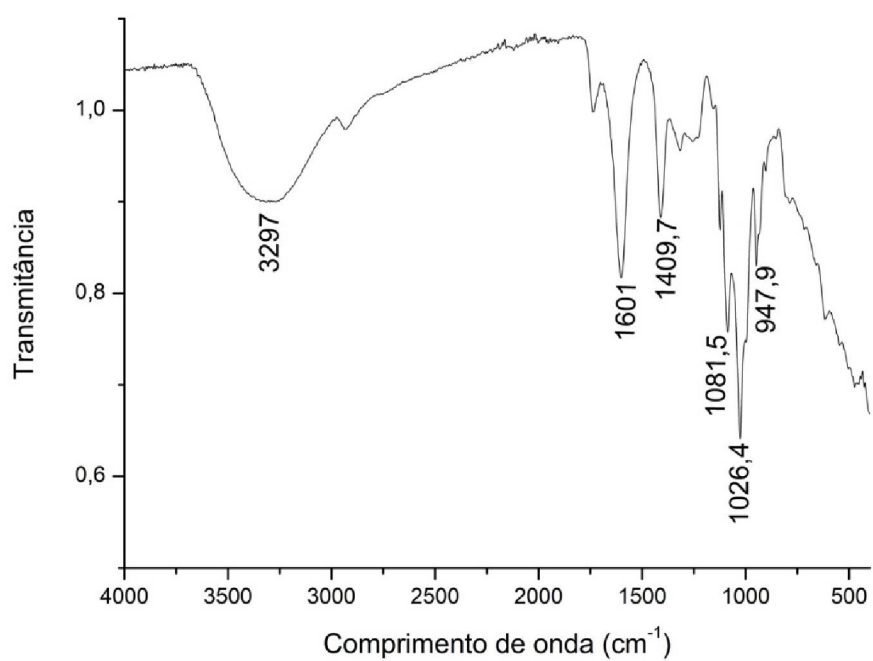
Nas Figuras 18 e 19 estão apresentados os espectros na região do infravermelho das frações BM e BG. Nestes espectros são observadas bandas de absorção características de alginato, como na região de 3432 cm^{-1} , atribuídas ao estiramento de ligação O-H das hidroxilas, em 2920 cm^{-1} , referente à ligações C-H, e próximo à $1597,91\text{ cm}^{-1}$, sendo a banda característica dos grupos carbonila de grupamentos ácidos (LEAL et al., 2008).

FIGURA 20 - ESPECTRO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO DA FRAÇÃO BM



Fonte: O autor (2020)

FIGURA 21 - ESPECTRO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO DA FRAÇÃO BG

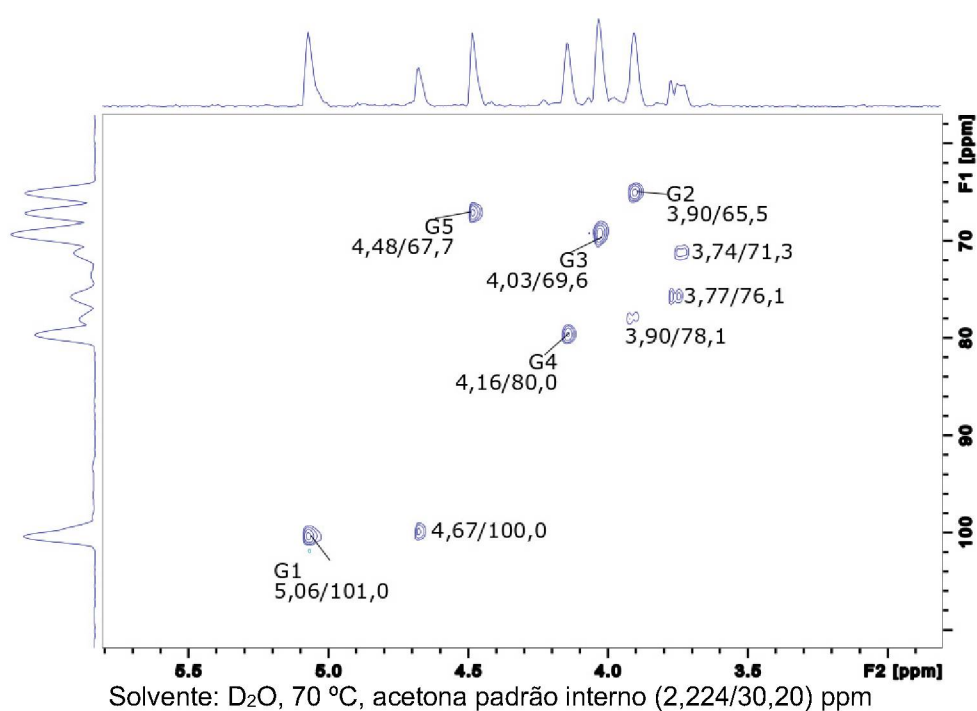


Fonte: O autor (2020)

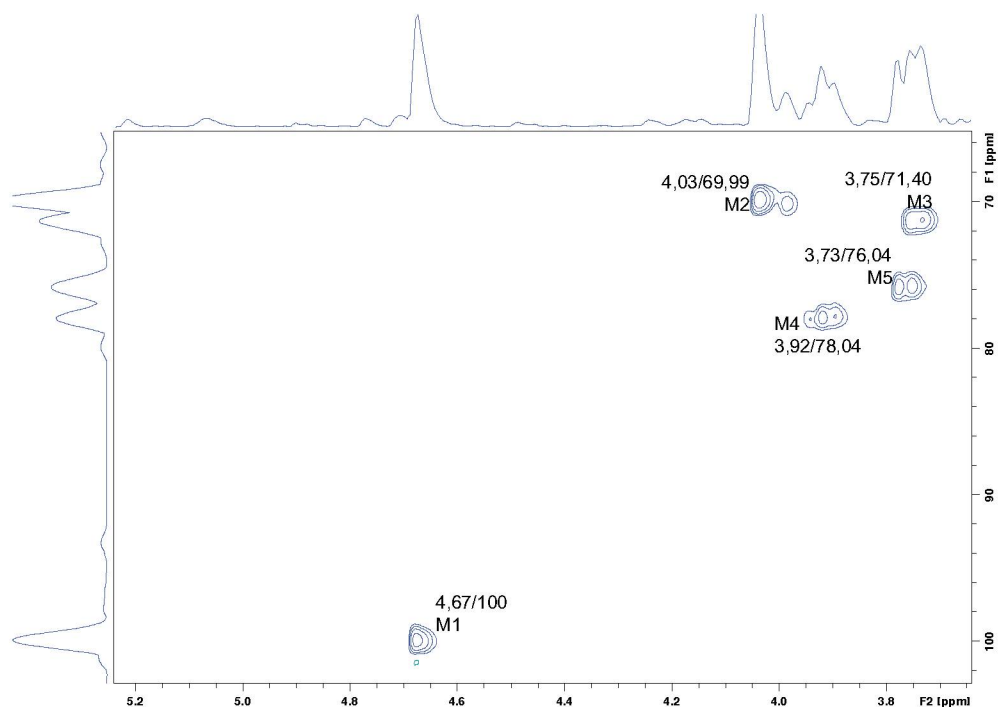
A região de absorção entre 950 a 750 cm^{-1} , referente à região anomérica, distingue características estruturais importantes das duas frações. Na fração BM está presente uma banda em 816,1 cm^{-1} , característica de ácido manurônico, e na fração BG é possível observar uma banda em 947,9 cm^{-1} atribuída à deformação vibracional em C1-H (LEAL et al., 2008; MUCHIUTI, 2018; TUL'CHINSKY et al., 1976).

Os espectros de RMN bidimensionais (HSQC) para as frações BM e BG, estão apresentados nas Figuras 22 e 23, e as correlações estão na Tabela 4.

FIGURA 22 - ESPECTRO DE RMN HSQC DA FRAÇÃO BG EM D₂O



Fonte: O autor (2020)

FIGURA 23 - ESPECTRO DE RMN HSQC DA FRAÇÃO BM EM D₂O

Solvente: D₂O, 70 °C, acetona padrão interno (2,224/30,20) ppm

Fonte: O autor (2020)

TABELA 4 - ASSINALAMENTOS ¹H/¹³C DAS FRAÇÕES GulAp (BG) E ManAp (BM)

BG	¹ H/ ¹³ C	BM	¹ H/ ¹³ C
1	5,06/101,00	1	4,67/100,00
2	3,90/65,50	2	4,03/69,99
3	4,03/69,60	3	3,75/71,40
4	4,16/80,00	4	3,92/78,04
5	4,48/67,70	5	3,73/76,06

Fonte: O autor (2020)

As correlações observadas encontram-se coerentes com as correlações reportadas na literatura para blocos homopoliméricos de ácido β-D-ManAp e de ácido α-L-GulAp referentes portanto, respectivamente aos blocos BM e BG, comprovando a obtenção das duas frações a partir da hidrólise do alginato (MUCHIUTI, 2018; RABELLO DUARTE et al., 1991; TAKO et al., 2000).

5.3 Purificação das frações BG e BM com brometo de hexadeciltrimetilamônio (CTAB)

Os blocos obtidos foram submetidos à um processo de purificação com brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB). Esse processo permite a separação de polissacarídeos neutros e outros subprodutos por precipitação de polissacarídeos com carga iônica, como é o caso do ácido algínico e os seus blocos homopoliméricos de menor massa (RABELLO DUARTE et al., 1991; FILALI MOUHIM et al., 1993).

Os rendimentos encontrados para os complexos CTAB-BM e CTAB-BG recuperados, em relação à massa inicial de alginato, estão apresentados na Tabela 5, sendo observada uma diminuição no rendimento quando comparado ao produto sem etapa de purificação. Essa diminuição do rendimento é esperada devido à manipulação da fração e remoção de subprodutos.

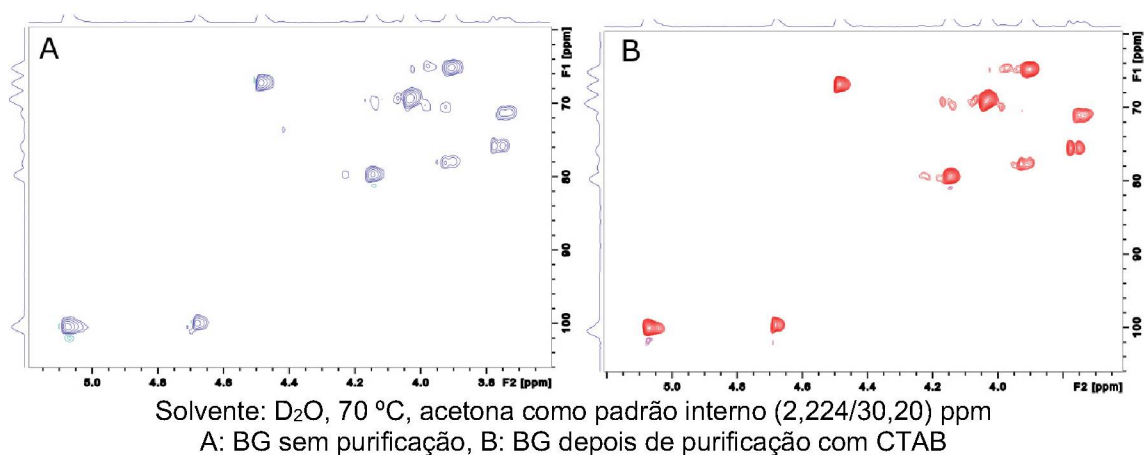
TABELA 5 - RENDIMENTOS DAS FRAÇÕES BM E BG ANTES E DEPOIS DA PURIFICAÇÃO

	Sem CTAB		Com CTAB	
	mg	%	mg	%
BM	153,6	15,4	70	7,0
BG	135,5	13,6	85	8,5

Fonte: O autor (2020)

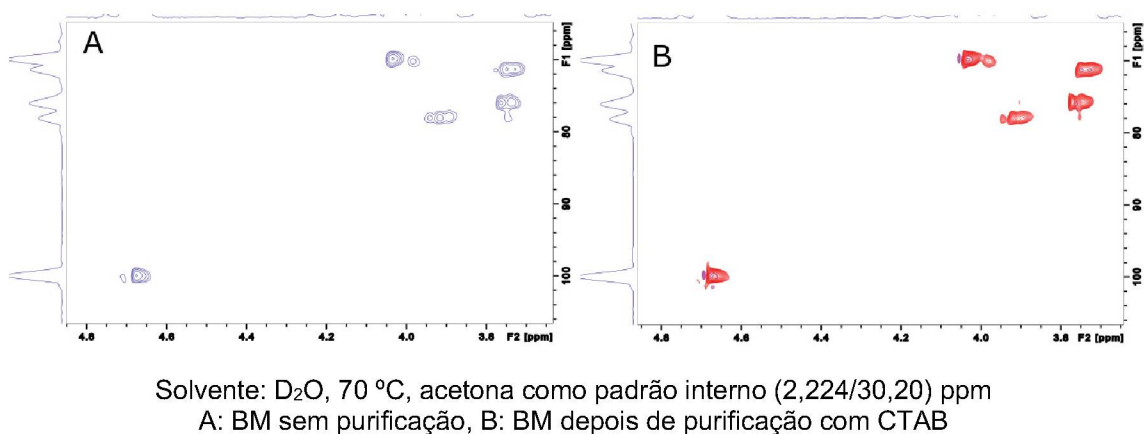
As Figuras 24 e 25 mostram os espectros de RMN HSQC dos blocos BM e BG antes e depois da purificação com CTAB. Apesar da metodologia empregada separar polissacarídeos ácidos de neutros, e ambas as frações serem ácidas, esperava-se a obtenção de blocos mais puros devido à diferença da estrutura tridimensional entre BM e BG, e conseqüentemente diferenças na disponibilidade dos grupos ácidos carboxílicos. Entretanto, os sinais foram analisados comparativamente e não foram observadas diferenças nas correlações.

FIGURA 24 - ESPECTRO DE RMN HSQC DA FRAÇÃO BG COM E SEM PURIFICAÇÃO EM D₂O



Fonte: O autor (2020)

FIGURA 25 - ESPECTRO DE RMN HSQC DA FRAÇÃO BM COM E SEM PURIFICAÇÃO EM D₂O



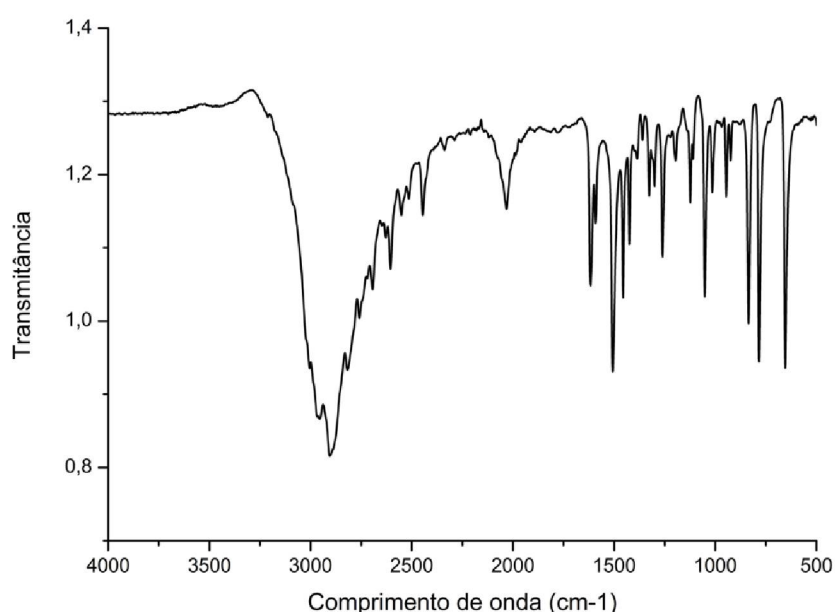
Fonte: O autor (2020)

5.4 Síntese do intermediário 3-azidopropilamina

A síntese da 3-azidopropilamina (**2**), usando 3-cloropropilamina (**1**) e azida sódica, foi realizada para obtenção de um intermediário contendo grupo azida para posterior inserção na cadeia polissacarídica mediante uma reação de substituição em que o cloro da 3-cloropropilamina é substituído pelo grupo N₃ da azida de sódio. Obteve-se um rendimento de 56%, o qual apresenta-se coerente com rendimentos anteriormente reportados, variando de 76 a 55% (GUO et al., 2016; HANNA et al., 2017; ROE et al., 2015).

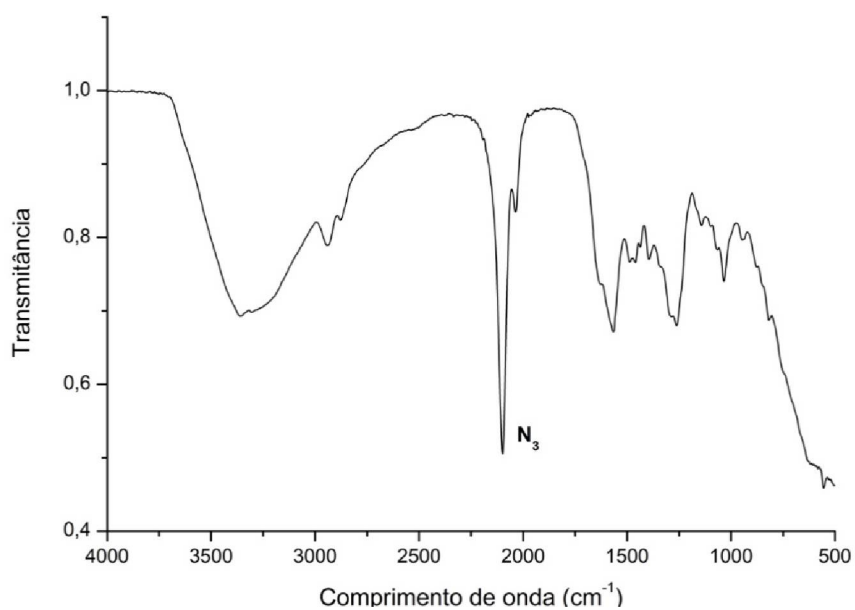
No espectro obtido na região do infravermelho para o produto, apresentado na Figura 26, foi possível identificar os principais grupos funcionais presentes. A banda de absorção de alta intensidade observada na região de 3415 cm^{-1} corresponde ao estiramento N-H, enquanto a banda característica de grupo N_3 pôde ser observada em 2107 cm^{-1} . A presença de tal banda difere do espectro do infravermelho do reagente inicial 3-cloropropilamina (**1**) (Figura 26), onde não é observada (DUTTA et al., 2015; HANNA et al., 2017; LOPES; FASCIO, 2004).

FIGURA 26 - ESPECTRO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO DA 3-CLOROPROPILAMINA (**1**)



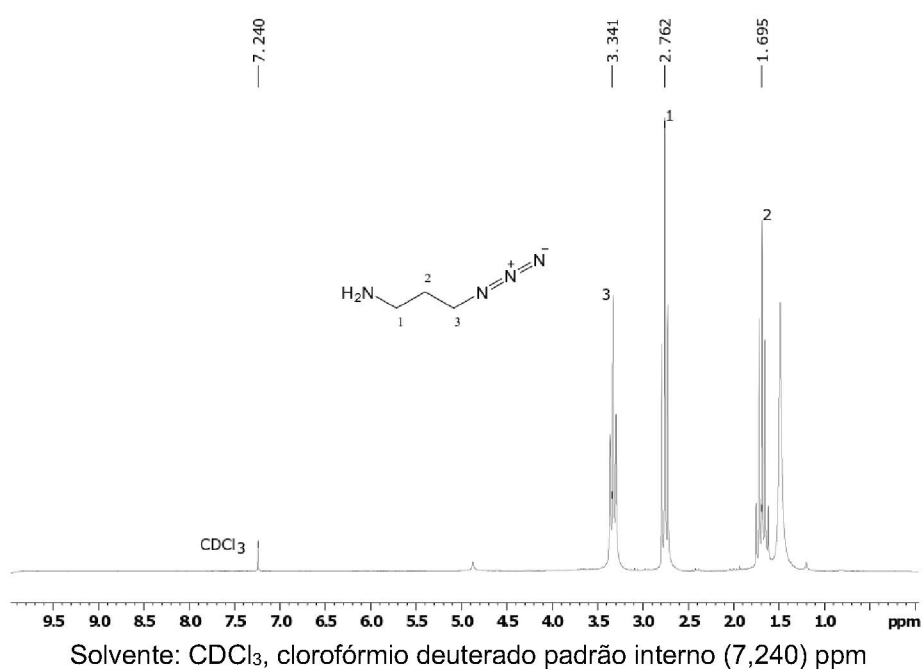
Fonte: O autor (2020)

FIGURA 27 - ESPECTRO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO DA 3-AZIDOPROPILAMINA (2)

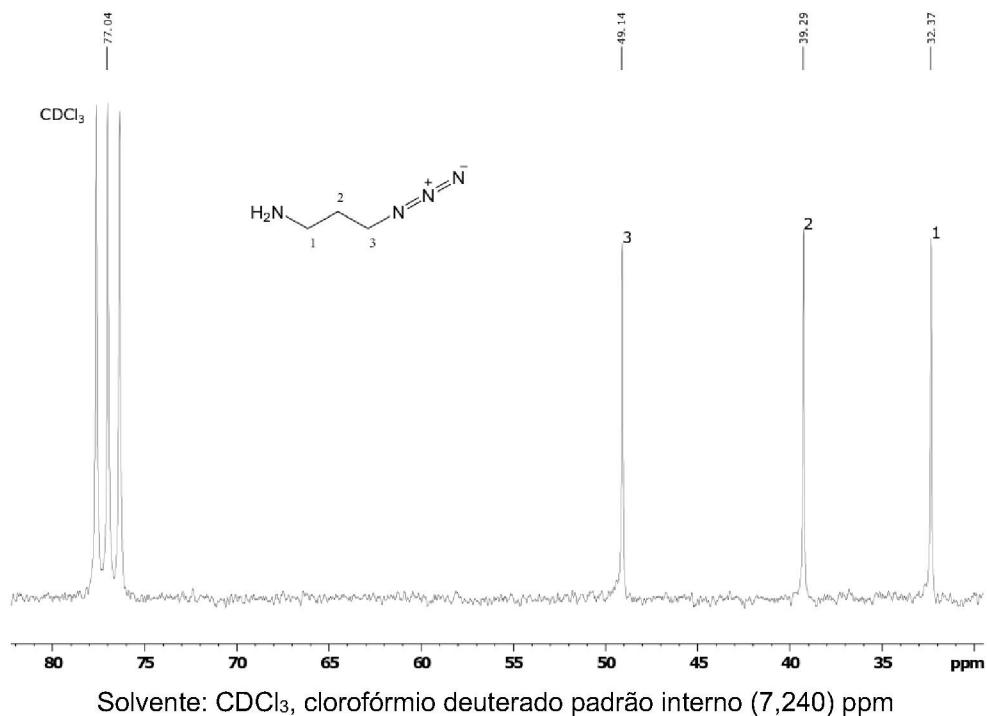


Fonte: O autor (2020)

Para confirmar a síntese do composto 3-azidopropilamina (**2**), foram obtidos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C que se apresentam assinalados nas Figuras 28 e 29, respectivamente.

FIGURA 28 - ESPECTRO DE RMN DE ^1H DA 3-AZIDOPROPILAMINA (2) EM CDCl_3 (200 MHz)

Fonte: O autor (2020)

FIGURA 29 - ESPECTRO ^{13}C RMN 3-AZIDOPROPILAMINA (2) EM CDCl_3 (200 MHZ)

Fonte: O autor (2020)

Os deslocamentos de ^1H e ^{13}C observados foram: (CH_2N_3) 3,33/49,08 ppm, (CH_2NH_2) 2,75/39,25 ppm e ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$) 1,68/32,34 ppm, que encontram-se de acordo com a literatura (Tabela 6), comprovando a obtenção de **2** (DUTTA et al., 2015; HANNA et al., 2017; KLINKER et al., 2015). Ainda, o deslocamento referente ao grupo CH_2Cl no reagente inicial (**1**), que é 3,61/41,9 ppm, não aparece no espectro do produto obtido, reforçando que a ligação $\text{CH}_2\text{-Cl}$ foi substituída pela ligação $\text{CH}_2\text{-N}_3$ (HALLETT et al., 2009).

TABELA 6 - ASSINALAMENTOS NO ESPECTRO DE RMN ^1H E ^{13}C (ppm) DA 3-AZIDOPROPILAMINA COMPARADOS DE LITERATURA

Sinais obtidos		HANNA et al., 2015		KLINKER et al., 2015	
^1H	^{13}C	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C
3,33	49,08	3,16	48,6	3,36	49,13
2,75	39,25	2,59	38,8	2,79	39,31
1,68	32,34	1,51	32,0	1,71	32,43

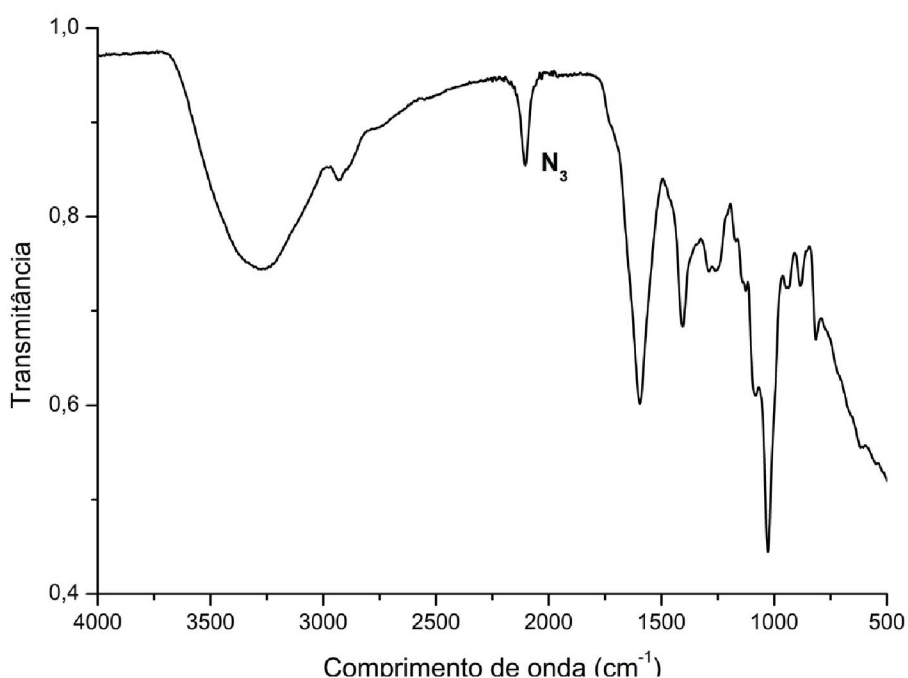
Fonte: O autor (2020)

5.5 Obtenção de alginato e de seus derivados funcionalizados com grupo propilazida (ALG-N3, BM-N3 e BG-N3)

A reação de amidação foi utilizada para inserção do intermediário 3-azidopropilamina (**2**) na cadeia polissacarídica através da formação de grupos amida. Utilizou-se carbodiimida como agente de acoplamento, método o qual é bastante explorado na literatura (CHHATBAR et al., 2011; JOHNSON et al., 2011; MAROUNEK et al., 2017; MUCHIUTI, 2018; PARK et al., 2017). A reação foi repetida nas mesmas condições para os blocos homopolímeros BM e BG.

Para confirmar a formação da ligação amida foram realizadas análises espectroscópicas (IV e RMN bidimensional). Na Figura 30 está apresentado o espectro de infravermelho do produto ALG-N3 (**4**). Pôde-se observar a banda em 2107 cm^{-1} característica do grupo funcional azida (N_3), assim como em 1633 cm^{-1} a banda característica de COOH, e em 1618 cm^{-1} de estiramento C=O (CHHATBAR et al., 2011; HANNA et al., 2017; LIEBER et al., 1957; NAKAJIMA; IKADA, 1995). observando las mismas bandas en los espectros, as mesmas bandas foram observadas para os compostos BM-N3 e BG-N3 (**4**) (anexos).

FIGURA 30 - ESPECTRO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO DO ALGINATO FUNCIONALIZADO COM 3-AZIDOPROPILAMINA (4-ALG-N3)

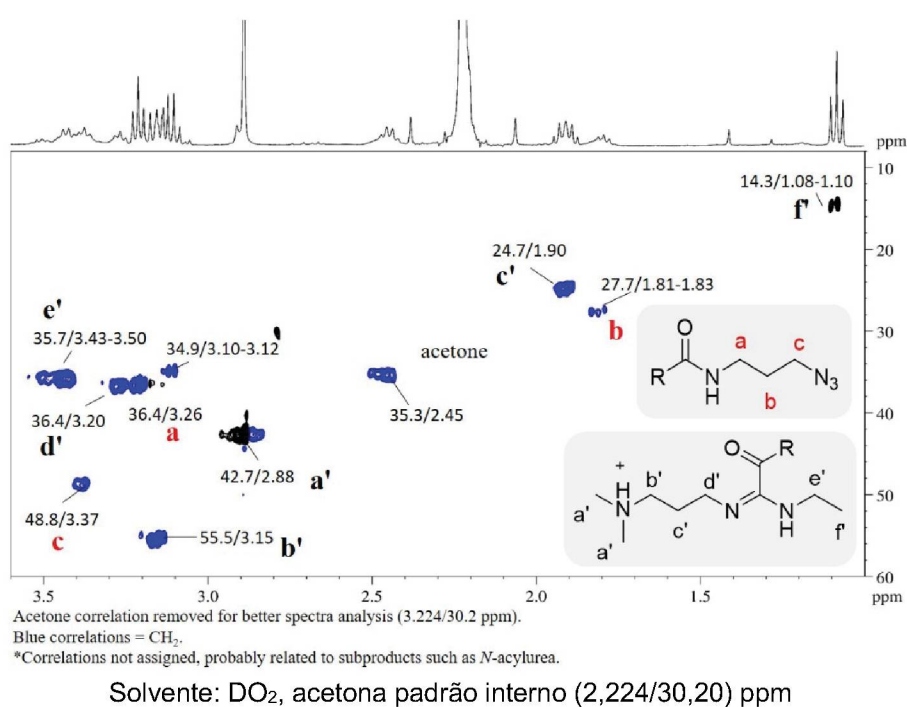


Fonte: O autor (2020)

No espectro de RMN ^1H ^{13}C HSQC de ALG-N3 (figura 18) foram observadas as correlações referentes as unidades monossacarídicas do polissacarídeo inicial não apresentaram diferenças significativas com as do polímero de origem. Os assinalamentos correspondentes as unidades de ácido ManAp e GulAp.

Na Figura 31 está apresentada parte do espectro de HSQC do produto ALG-N3 (4), que foi ampliado para melhor interpretação.

FIGURA 31 - ESPECTRO DE RMN HSQC DA AMOSTRA ALG-N3



Fonte: O autor (2020)

Na região ampliada do espectro, entre 3,5-1,0 ppm, novas correlações foram observadas (CH_2N_3 48,8/3,37 ppm); ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ 27,7/1,81 ppm) e ($\text{CH}_2\text{NHC}=\text{O}$ 36,4/3,10 ppm) (Figura 28). A correlação característica da 3-azidopropilamina (CH_2NH_2 2,75/39,25 ppm) não aparece no produto obtido. Ainda, a correlação atribuída à ligação amida formada ($\text{CH}_2\text{NHC}=\text{O}$) é próxima à valores relatados na literatura (DUTTA et al., 2015; HANNA et al., 2017; HU et al., 2013; PARK et al., 2017; XU et al., 2017). O deslocamento do sinal de hidrogênio da posição $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ de 1,68 ppm na 3-azidopropilamina para 1,90 ppm após reação, foi também observado em estudos anteriores, onde foi reportado deslocamento de 1,45 ppm para 2,08 ppm, atribuído à ligação amida formada (HU et al., 2013, XU et al., 2017; YANG; et al., 2011).

A reação de amidação com EDC/NHS produz um intermediário *O*-acilissouréia que, na ausência de um ataque nucleofílico, é reorganizado em um composto mais estável como *N*-aciluréia (COLODI, 2017; KUO et al., 1991; NAKAJIMA; IKADA, 1995). A utilização de NHS na reação favorece a formação da ligação amida e não do subproduto, formando intermediários mais estáveis e menor produção do subproduto *N*-aciluréia (CONDE et al., 2014; PARK et al., 2017). Ainda assim, foi observada a presença do intermediário *O*-acilissouréia, cujos assinalamentos estão apresentados na Tabela 8 em comparação com correlações reportadas na literatura (NAKAJIMA; IKADA, 1995; COLODI, 2017).

TABELA 7 - ASSINALAMENTOS DE ^1H E ^{13}C DA O-ACILISOURÉIA

	Colodi, 2017	Presente estudo
	$^1\text{H}/^{13}\text{C}$	$^1\text{H}/^{13}\text{C}$
A	2,91/44,2	2,88/42,7
B	3,19/56,4	3,15/55,5
C	2,05/24,9	1,90/24,7
D	3,85/43,0	3,20/36,4
E	3,34/37,2	3,43/35,7
F	1,19/14,6	1,08/14,3

Fonte: O autor (2020)








Correlações similares foram observadas para as amostras BM-N3 e BG-N3 (anexos), o que indica a formação dos correspondentes polissacarídeos-azida.

5.6 Obtenção de derivado aminado através de *click chemistry* CuAAC (ALG-NH₂, BM-NH₂, BG-NH₂)

Para a obtenção de derivados de alginato e seus blocos homopoliméricos funcionalizados com grupo amina (ALG-NH₂, BM-NH₂, BG-NH₂) foi utilizada a metodologia de *click chemistry* catalisada por cobre (I) CuAAC, utilizando propargilamina. Para avaliação dos compostos obtidos foram realizadas análises colorimétricas qualitativas (ninhidrina) e também análises espectroscópicas (IV e RMN bidimensional).

A formação de coloração roxa após reação com ninhidrina indica a presença de grupo amino livre (HEUKO, 2015; YEMM; COCKING, 1955). Foram avaliados e comparados resultados de ninhidrina de amostras de polissacarídeo após reação de amidação e após reação de *click chemistry* CuAAC, resultados que estão apresentados na Tabela 9.

TABELA 8 - RESULTADOS DOS TESTES DE NINHIDRINA

AMOSTRA	NINHIDRINA	
CONTROLE POSITIVO	POSITIVO	
4-ALGN3	NEGATIVO	
6-ALGNH2 (24h)	POSITIVO	
6-ALGNH2 (48h)	POSITIVO	
4-BGN3	NEGATIVO	
6-BGNH2 (24h)	POSITIVO	
6-BGNH2 (48h)	POSITIVO	
4-BMN3	NEGATIVO	
6-BMNH2 (24h)	POSITIVO	
6-BMNH2 (48h)	POSITIVO	

Controle positivo: glicosamina

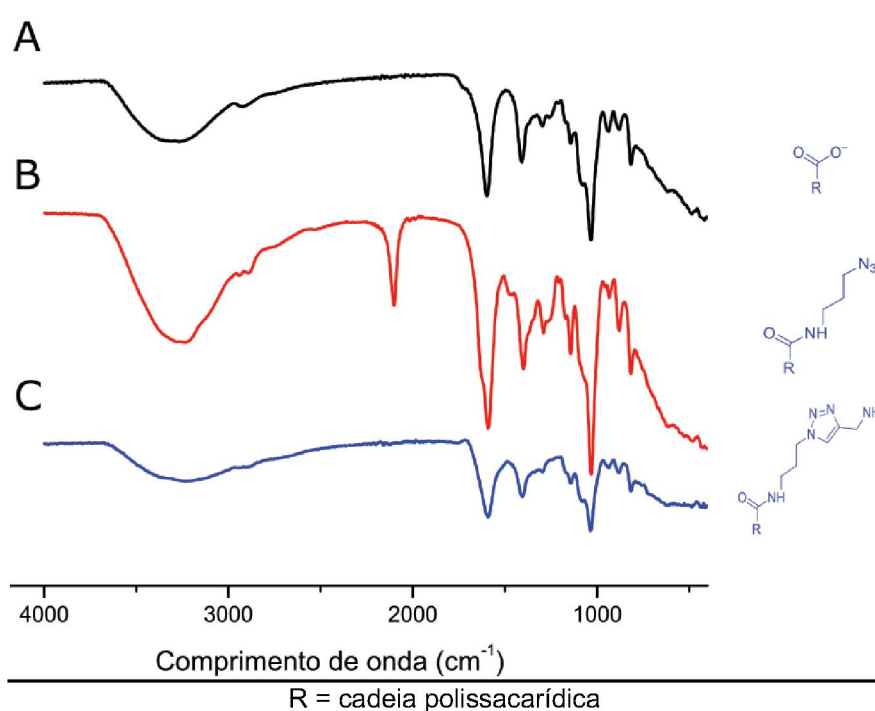
Fonte: O autor (2020)

Os polissacarídeos-poliazida, utilizados como controle negativo, não apresentaram coloração arroxeada, o que era esperado por estes não possuírem grupos amino livre em sua estrutura. Já os produtos da reação “click” apresentaram

resultado positivo, indicando sucesso da reação de *click chemistry*, com a inserção de grupo NH_2 na cadeia polissacarídica. A coloração arroxeadada apresentou-se mais intensa para as amostras BG-NH2 e BG-NH2 obtidas com 48 horas de reação. Sugere-se que os blocos homopoliméricos, por possuírem uma menor massa molecular, que pode afetar na solubilidade, apresentaram maior substituição do que os produtos derivados do alginato.

Na Figura 32 estão apresentados os espectros na região do infravermelho das frações BG, BG-N3 e BG-NH2, comparativamente. Ressalta-se a banda próxima de 2100 cm^{-1} , característica de grupo azida, que aparece somente no produto de reação de amidação BG-N3, sendo ausente na amostra BG-NH2, o que também sugere a formação do produto esperado. As mesmas alteração no aparecimento da banda característica do grupo azida foi observada para todos os produtos de “click”. Aminas primárias apresentam bandas características na região entre $3000\text{-}3500\text{ cm}^{-1}$, região onde também aparecem bandas características de grupos hidroxila, as quais podem estar sobrepostas dificultando a visualização da mesma (ENGELSEN; NØRGAARD, 1996; KIM et al., 2012; LABRE et al., 2018).

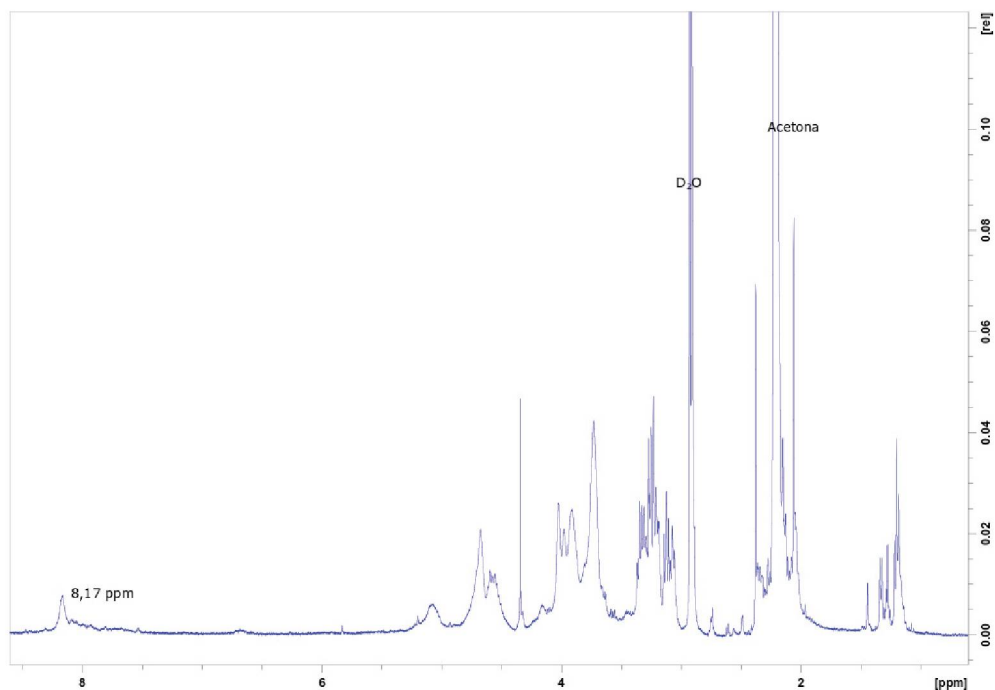
FIGURA 32 - ESPECTRO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO DO ALG, ALG-N3 E ALG-NH2



ALG (A), ALG-N3 (B), ALG-NH2 (C)

Fonte: O autor (2020)

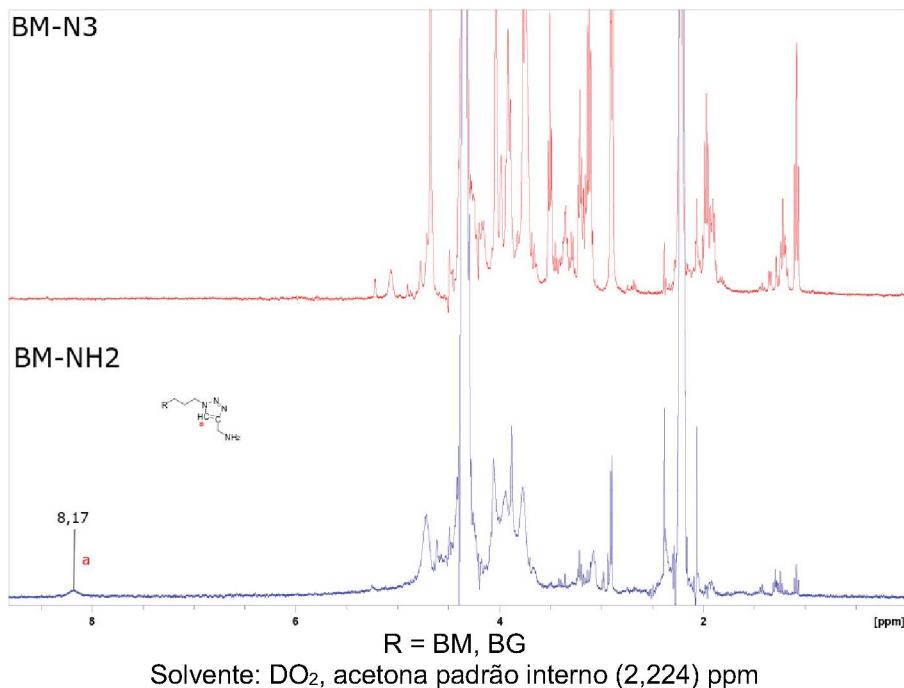
Para confirmar a formação do anel triazol, foi obtido o espectro de RMN de ^1H e HSQC dos produtos. Apesar do resultado positivo no teste da ninhidrina, nos espectros da amostra ALG-NH2 obtido com 48 horas de reação só foi possível observar sinais referentes ao produto funcionalizado com terminal amina no espectro de RMN de ^1H (Figura 33).

FIGURA 33 - ESPECTRO DE RMN DE ^1H DA ALG-NH₂ EM D₂O

Solvente: D₂O, acetona padrão interno (2,224) ppm

Fonte: O autor (2020)

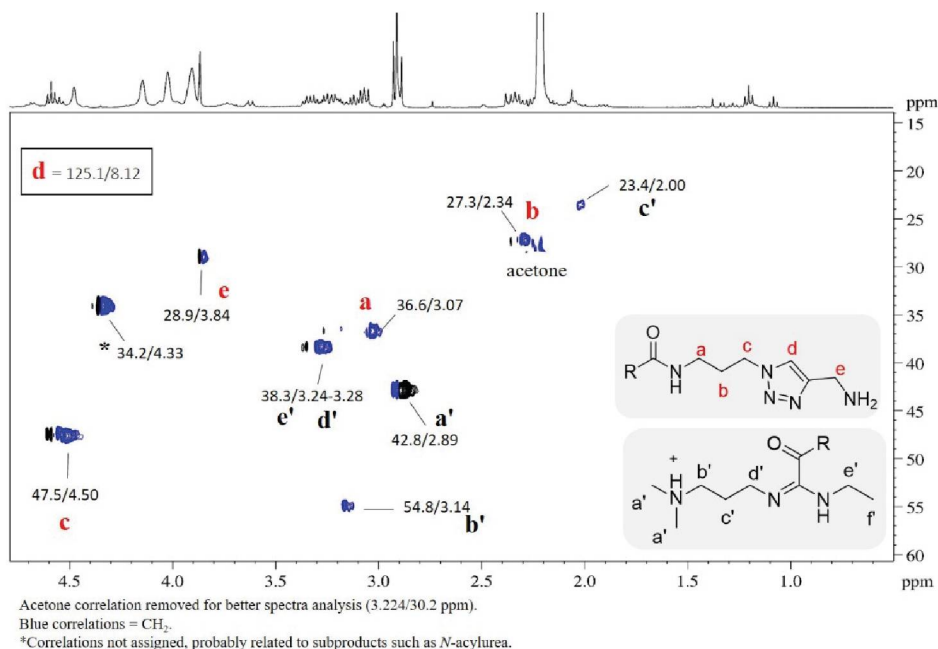
Já nos espectros das amostras BM-NH₂-48 e **6**-BG-NH₂-48, foi possível observar correlações em 125,0/8,15 ppm referente ao hidrogênio de anel 1,2,3-triazol. A Figura 34 compara os espectros de RMN de ^1H das frações BM-N3 e BM-NH₂, onde pode ser observado o sinal em 8,15 ppm somente no produto de “click”, coerente com sinais de triazol reportados anteriormente na literatura (7,1 a 8,9 ppm) (LEMECHKO et al., 2012; OMTVEDT et al., 2019; TAN et al., 2017).

FIGURA 34 - ESPECTRO DE RMN DE ^1H DA 4-BM-N3 E 6-BM-NH2 EM D_2O 

Fonte: O autor (2020)

Na Figura 35 está apresentado o espectro de HSQC do composto **6-BM-NH2**. A correlação 48,6/3,50 ppm, atribuída ao grupo **CH₂-N₃** da amostra **4-BM-N3**, não mais aparece no espectro após a reação de *click chemistry*, tendo um deslocamento novo (47,5/4,50 ppm) relativo à grupo CH₂ que foi atribuído à posição mais próxima do anel triazol (TAN et al., 2016, 2017). Ainda, a correlação característica de **CH₂-C≡** da propargilamina que, segundo a literatura, aparece entre 70,5/3,38-3,39 ppm, não foi observada no espectro dos produtos obtidos. A correlação 28,9/3,84 ppm foi atribuída ao grupo **CH₂-NH₂** (ZWIKKER et al., 2003; PAHIMANOLIS et al., 2010; FICHTALI et al., 2016; INAGAKI et al., 2018) Dessa forma, foram obtidos derivados aminados dos blocos homopoliméricos de alginato através de reações de *click chemistry*.

FIGURA 35 - ESPECTRO DE HSQC DA AMOSTRA 6-BM-NH2



R = BM, BG

Solvente: DO₂, acetona padrão interno (2,224/30,20) ppm

Fonte: O autor (2020)

5.7 Avaliação da atividade antimicrobiana de derivado de alginato funcionalizado

Os polissacarídeos com a presença de grupos amina e hidroxila são biodegradáveis, biocompatíveis e apresentam atividade biológica, como atividade antimicrobiana. Dentre os polissacarídeos aminados está a quitosana, que é um polissacarídeo com carga catiônica devido à sua estrutura, e apresenta atividade antimicrobiana contra bactérias gram-positivas e negativas. A carga positiva que possui sua estrutura e a estabilidade cristalina da quitosana, a torna solúvel em soluções aquosas ácidas sob um pH 6.3, onde os grupos amina NH₂ se tornam a forma solúvel protonada NH₃⁺, esse grupo amino protonado é o grupo funcional ativo essencial para que o polissacarídeo apresente atividade antimicrobiana. (CHUNG; CHEN, 2008; SAYARI et al., 2016; VÁZQUEZ et al., 2013)

Os mecanismos de ação propostos para os polissacarídeos aminados não são claros, mas presume-se que o carácter policatiônico desse tipo de polissacarídeo

interaja com a carga negativa das membranas bacterianas, causando vazamento de constituintes intracelulares, causando desequilíbrios osmóticos, resultando na inibição do crescimento do microrganismo. Outro mecanismo de ação é o poder para capturar os metais essenciais para o crescimento antimicrobiano, diminuindo a permeabilidade da membrana e inibindo o transporte de nutrientes da bactéria. (MARTINS et al., 2014; MOHAMED et al., 2014; PIENIZ et al., 2015).

Os derivados ALG-NH₂-48, BM-NH₂-48 e BG-NH₂-48 foram, então, avaliados quanto ao seu potencial antibacteriano através de ensaio de concentração inibitória mínima (MIC).

O valor obtido no presente experimento de MIC está entre os valores registrados de atividade de quitosana de 500 a 2000 µg.mL⁻¹, outros fatores que melhoram ou prejudicam a atividade antimicrobiana, como densidade, protonação, peso molecular, concentração e características hidrofílicas/hidrofóbico do polímero, capacidade quelante, pH, temperatura e tipo de membrana do microrganismo GOY et al., 2016; JAIN et al., 2014; MOHAMED et al., 2014; XING et al., 2015).

Na Figura 36 estão apresentadas as imagens das microplacas onde foram realizadas as avaliações. Foi possível observar que os produtos da *CuAAC click chemistry* ALG-NH₂, BG-NH₂ e BM-NH₂ (6) possuem atividade inibitória contra bactérias da espécie *E. coli* na concentração de 5000 µg.mL⁻¹, sendo essa atividade ausente no alginato e seus blocos homopoliméricos.

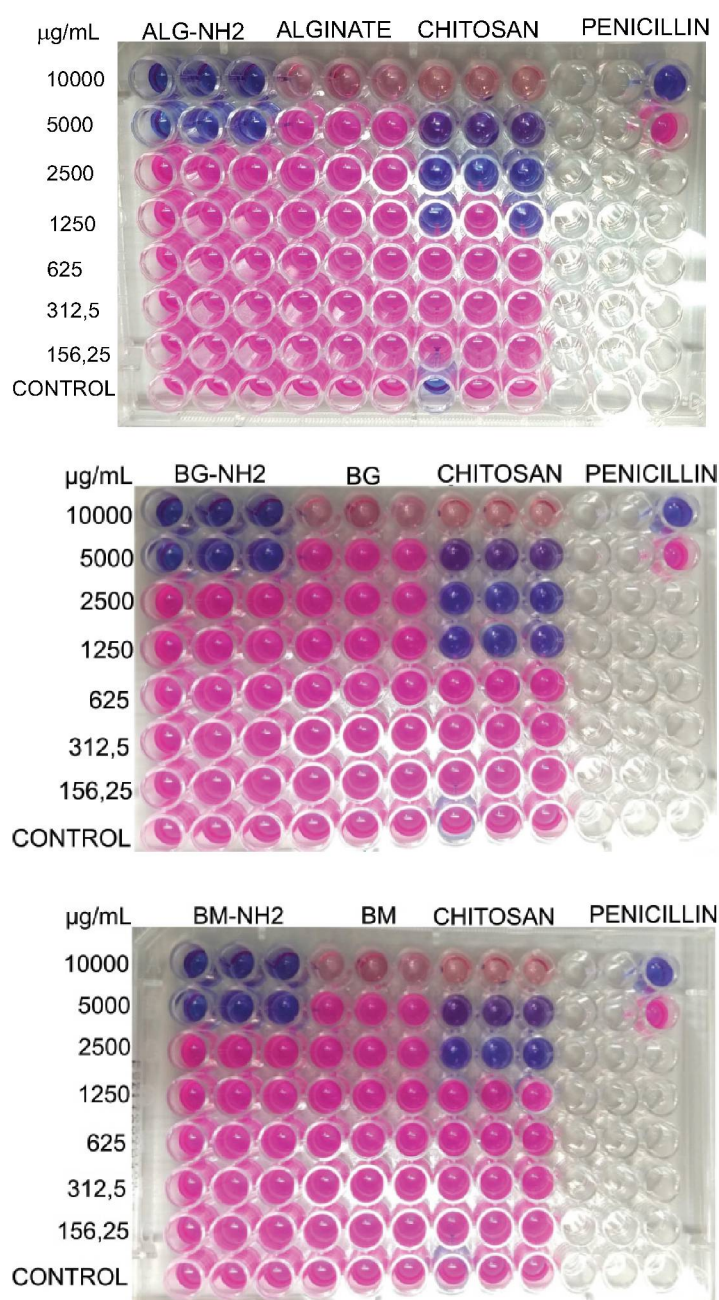
Entre os valores de inibição do crescimento bacteriano da quitosana que é um polissacarídeo aminado com atividade antimicrobiana estão concentrações superiores a 500 µg.mL⁻¹ para valores de MIC contra cepas de *E. coli*; valores que após a metilação ou outro tipo de modificação na estrutura da quitosana podem aumentar a atividade antimicrobiana em 20 vezes em comparação com a quitosana nativa contra cepas gram-positivas e gram-negativas. (MARTINS et al., 2014; MOHAMED et al., 2014)

A atividade antimicrobiana dos compostos funcionalizados com terminal amina depende da presença de grupos amina na forma protonada por ser o grupo funcional que interage contra a membrana microbiana. Desta forma há uma correlação positiva entre o número de grupos que podem ser protonados e a atividade antimicrobiana. A solução de quitosana possui um maior grau de protonação que os produtos de alginato

e seus derivados nas mesmas condições de concentração e tempo. (MOHD HANIM et al., 2015).

Dessa forma, a modificação química realizada e ciclo adição de uma terminal amina no presente trabalho demonstrou um aumento na atividade antimicrobiana do alginato e dos blocos homopoliméricos derivados de alginato, resultando em novos compostos com potencial aplicação como agentes antimicrobianos.

FIGURA 36 - RESULTADO DE MIC ALG-NH2-48, BM-NH2-48 E BG-NH2-48



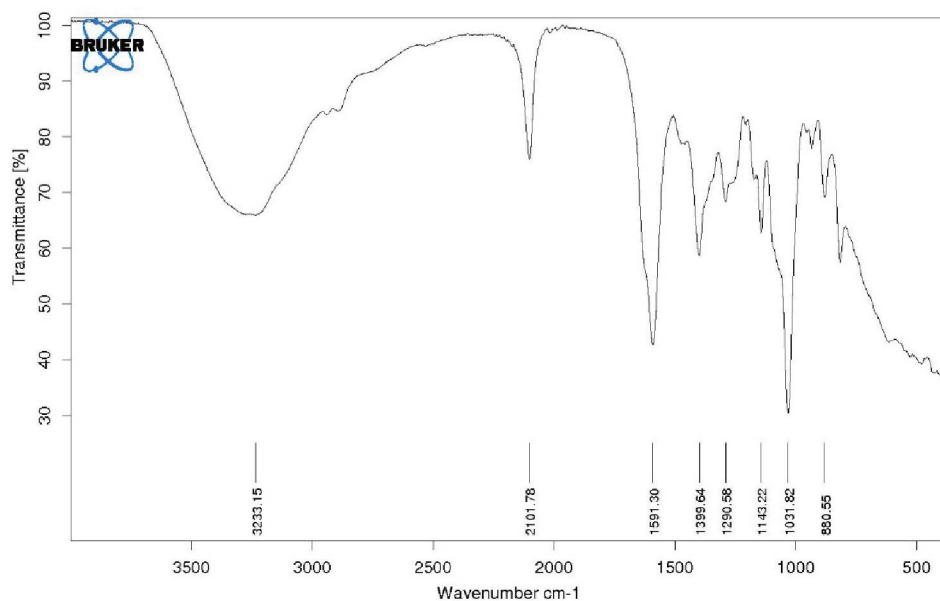
Fonte: O autor (2020)

6. CONCLUSÃO

Sendo os polissacarídeos uma importante fonte de moléculas bioativas e biotecnológicas, no presente trabalho foi possível explorar o potencial do alginato de sódio como precursor em reações de *click chemistry*. A partir de alginato comercial com um valor calculado M/G = 1,85, foram obtidos e caracterizados seus blocos homopoliméricos contendo majoritariamente ácido ManAp (15,4%) com um valor calculado de M/G = 6,53 e de ácido GulAp (13,6 %) com um valor calculado de M/G = <0,01. O polissacarídeo e seus blocos de menor massa foram submetidos a reações de amidação com 3-azidopropilamina previamente sintetizada, que mostrou-se ser uma eficiente rota de “pré-funcionalização” de polímeros para reações “click” do tipo cicloadição azida-acilo. Os produtos azida foram submetidos a condições de reação de *click chemistry* CuAAC, onde foi possível observar que um maior tempo de reação parece ser mais eficiente. Após 48 horas de reação os derivados do alginato e homopoliméricos aminados foram obtidos e caracterizados. Na avaliação de suas propriedades antibacterianas mediante MIC, os produtos ALG-NH₂, BG-NH₂ e BM-NH₂ apresentaram atividade inibitória contra *E. coli* na concentração de 5000 µg.mL⁻¹. Dessa forma, a rota sintética proposta mostrou-se eficaz para obtenção de intermediários versáteis “pré-funcionalizados” com grupo azida, para aplicação em diversas áreas. Ainda, foram obtidos derivados polissacarídicos aminados inéditos com atividade biológica superior aos polímeros de origem.

ANEXOS

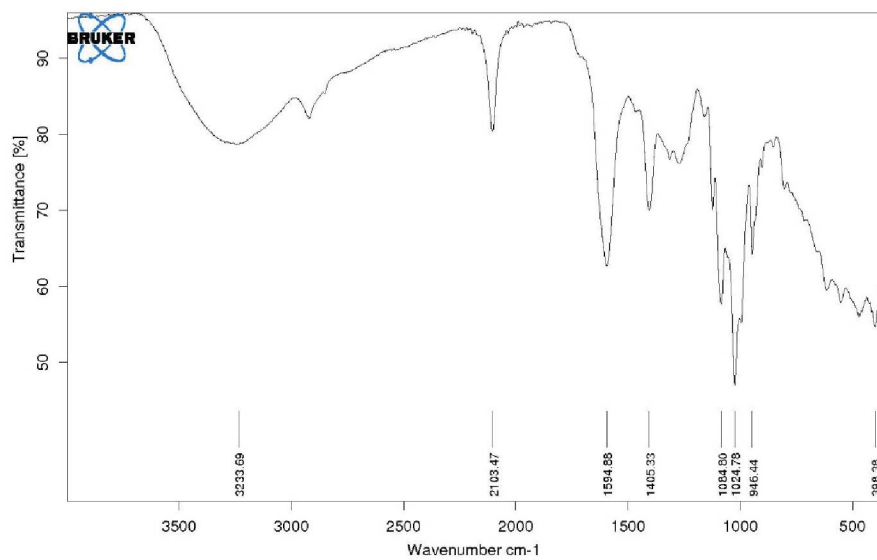
ANEXO 1 – ESPECTRO DE IV OBTIDO PARA 4-BM-N3.



C:\NEFFER\MgZnAl-DD-PEBD 10% 60 C 2 dias coleta 1.5 BMN3

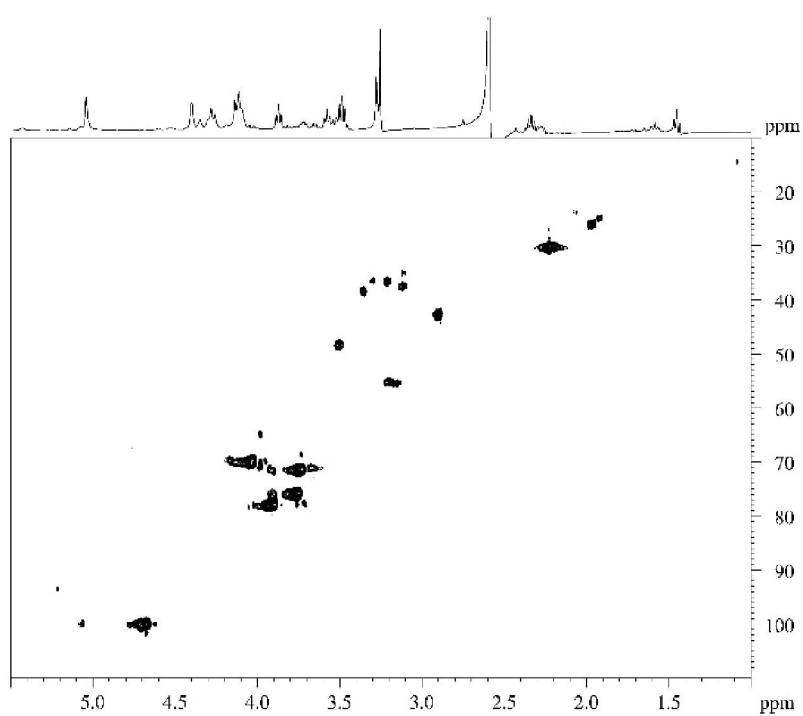
31/01/2020

ANEXO 2 – ESPECTRO DE IV OBTIDO PARA 4-BG-N3.

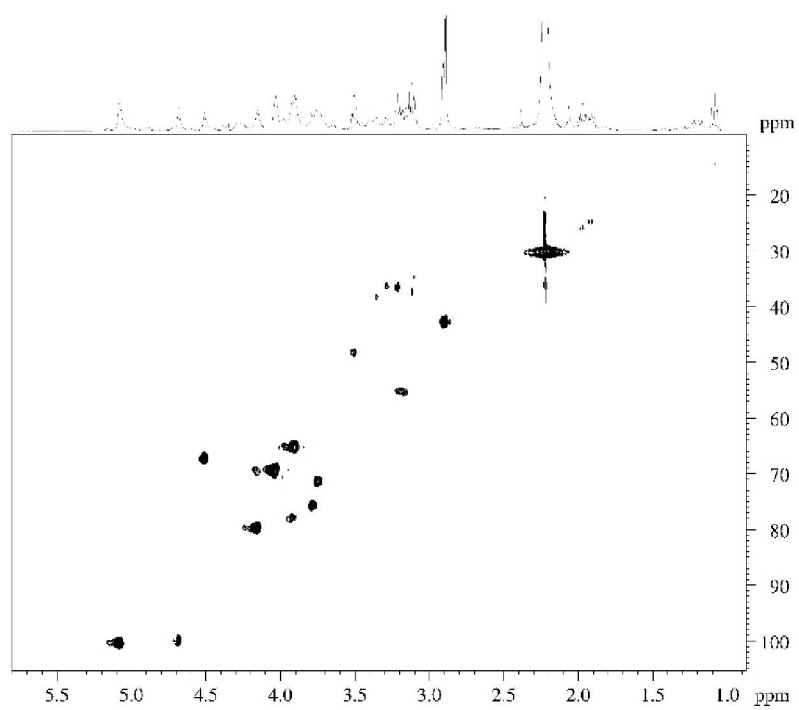


C:\NEFFER\MgZnAl-DD-PEBD 16% 60 C 2 dias coleta 1.3	BGN3	31/01/2020
-----------------------------------------------------	------	------------

ANEXO 3 – ESPECTRO DE HSQC OBTIDO PARA 4-BM-N3



ANEXO 4 – ESPECTRO DE HSQC OBTIDO PARA 4-BG-N3



Referências

- ALVES, Lauri Junior. **Oxidação e sulfatação de ulvanas de *Ulva fasciata***: atividade anticoagulante e propriedades macromoleculares. 2019. 105 p. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências : Bioquímica.
- ANDRÉIA GROSSI SANTOS DE LAIA, EZEQUIEL DE SOUZA COSTA JÚNIOR, H. DE S.; COSTA. A study of sodium alginate and calcium chloride interaction through films for intervertebral disc regeneration uses. **21º CBECIMAT - Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais**, v. 9, n. 13, p. 7341–7348, 2014.
- ARAD, S.; LEVY-ONTMAN, O. Red microalgal cell-wall polysaccharides: Biotechnological aspects. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 21, n. 3, p. 358–364, 2010. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2010.02.008>>. .
- DE ARAÚJO, C. A.; NOSEDA, M. D.; CIPRIANI, T. R.; et al. Selective sulfation of carrageenans and the influence of sulfate regiochemistry on anticoagulant properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 91, n. 2, p. 483–491, 2013.
- ARORA, D.; SHARMA, N.; SHARMA, V.; et al. An update on polysaccharide-based nanomaterials for antimicrobial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 6, p. 2603–2615, 2016.
- BALDWIN, A. D.; KIICK, K. L. Polysaccharide-modified synthetic polymeric biomaterials. **Biopolymers**, v. 94, n. 1, p. 128–140, 2010.
- BEDINI, E.; LAZZA, A.; PARRILLI, M.; IADONISI, A. A review of chemical methods for the selective sulfation and desulfation of polysaccharides. **Carbohydrate Polymers**, v. 174, p. 1224–1239, 2017. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.07.017>>. .
- BEMILLER, J. N. **Food Polysaccharides and Their Applications**. CRC Press, 1996.
- BEMILLER, J. N. Algins/Alginates. **Carbohydrate Chemistry for Food Scientists**, p. 293–301, 2018.
- BINDER, W. H.; SACHSENHOFER, R. “Click” chemistry in polymer and materials science. **Macromolecular Rapid Communications**, v. 28, n. 1, p. 15–54, 2007.
- BULPITT, P.; AESCHLIMANN, D. New strategy for chemical modification of hyaluronic acid: Preparation of functionalized derivatives and their use in the formation of novel biocompatible hydrogels. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 47, n. 2, p. 152–169, 1999.
- DE CARVALHO, M. M.; DE FREITAS, R. A.; DUCATTI, D. R. B.; et al. Modification of ulvans via periodate-chlorite oxidation: Chemical characterization and anticoagulant activity. **Carbohydrate Polymers**, 2018.
- CHEN, F.; HUANG, G. Preparation and immunological activity of polysaccharides and their derivatives. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 112, p. 211–216, 2018. Elsevier B.V. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.01.169>>. .

- CHHATBAR, M. U.; MEENA, R.; PRASAD, K.; CHEJARA, D. R.; SIDDHANTA, A. K. Microwave-induced facile synthesis of water-soluble fluorogenic alginic acid derivatives. **Carbohydrate Research**, v. 346, n. 5, p. 527–533, 2011. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.carres.2011.01.002>>. .
- CHING, S. H.; BANSAL, N.; BHANDARI, B. Alginate gel particles—A review of production techniques and physical properties. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 57, n. 6, p. 1133–1152, 2017.
- CHUNG, Y. C.; CHEN, C. Y. Antibacterial characteristics and activity of acid-soluble chitosan. **Bioresource Technology**, 2008.
- CONDE, J.; DIAS, J. T.; GRAZÃO, V.; et al. Revisiting 30 years of biofunctionalization and surface chemistry of inorganic nanoparticles for nanomedicine. **Frontiers in Chemistry**, v. 2, n. July, p. 1–27, 2014. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fchem.2014.00048/abstract>>. .
- CUMPSTEY, I. Chemical Modification of Polysaccharides. **ISRN Organic Chemistry**, v. 2013, p. 1–27, 2013. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/isrn/2013/417672/>>. .
- DAEMI, H.; BARIKANI, M. Synthesis and characterization of calcium alginate nanoparticles, sodium homopolymannuronate salt and its calcium nanoparticles. **Scientia Iranica**, v. 19, n. 6, p. 2023–2028, 2012. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.scient.2012.10.005>>. .
- DALHEIM, M.; VANACKER, J.; NAJMI, M. A.; et al. Efficient functionalization of alginate biomaterials. **Biomaterials**, v. 80, p. 146–156, 2016.
- DARR, A.; CALABRO, A. Synthesis and characterization of tyramine-based hyaluronan hydrogels. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 20, n. 1, p. 33–44, 2009.
- DONG, F.; ZHANG, J.; YU, C.; et al. Synthesis of amphiphilic aminated inulin via “click chemistry” and evaluation for its antibacterial activity. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 24, n. 18, p. 4590–4593, 2014. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2014.07.029>>. .
- DRAGET, K. I. Alginates. **Handbook of Hydrocolloids: Second Edition**, p. 807–828, 2009.
- DRAGET, K. I.; SMIDSRØD, O.; SKJÅK-BRÆK, G. Alginates from Algae. **Biopolymers Online**, p. 215–224, 2005. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/3527600035.bpol6008>>. .
- DRAGET, K. I.; TAYLOR, C. Chemical, physical and biological properties of alginates and their biomedical implications. **Food Hydrocolloids**, v. 25, n. 2, p. 251–256, 2011. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2009.10.007>>. .
- DUCATTI, D. R. B.; COLODI, F. G.; GONÇALVES, A. G.; DUARTE, M. E. R.; NOSEDA, M. D. Production of agaro- and- carraoigosaccharides by partial acid hydrolysis of galactans. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 21, n. 2, p. 296–304, 2011.
- DUTTA, S.; REN, Z.; BRINZER, T.; GARRETT-ROE, S. Two-dimensional ultrafast vibrational spectroscopy of azides in ionic liquids reveals solute-specific solvation. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 17, n. 40, p. 26575–26579, 2015. Royal

Society of Chemistry.

ENGELSEN, S. B.; NØRGAARD, L. Comparative vibrational spectroscopy for determination of quality parameters in amidated pectins as evaluated by chemometrics. **Carbohydrate Polymers**, 1996.

FAN, L.; JIANG, L.; XU, Y.; et al. Synthesis and anticoagulant activity of sodium alginate sulfates. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, n. 4, p. 1797–1803, 2011. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.10.038>>. .

FENORADOSOA, T. A.; ALI, G.; DELATTRE, C.; et al. Extraction and characterization of an alginate from the brown seaweed *Sargassum turbinarioides* Grunow. **Journal of Applied Phycology**, v. 22, n. 2, p. 131–137, 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10811-009-9432-y>>. .

FERNANDO, I. P. S.; KIM, D.; NAH, J. W.; JEON, Y. J. Advances in functionalizing fucoidans and alginates (bio)polymers by structural modifications: A review. **Chemical Engineering Journal**, v. 355, n. May 2018, p. 33–48, 2019. Elsevier. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cej.2018.08.115>>. .

FERREIRA, L. G.; DA SILVA, A. C. R.; NOSEDA, M. D.; et al. Chemical structure and snake antivenom properties of sulfated agarans obtained from *Laurencia dendroidea* (Ceramiales, Rhodophyta). **Carbohydrate Polymers**, v. 218, n. February, p. 136–144, 2019. Elsevier. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.04.066>>. .

FICHTALI, I.; LAABOUDI, W.; EL HADRAMI, E. M.; et al. Synthesis, characterization and antimicrobial activity of novel benzophenone derived 1,2,3-triazoles. **Journal of Materials and Environmental Science**, v. 7, n. 5, p. 1633–1641, 2016.

FILALI MOUHIM, R.; CORNET, J.-F.; FONTANE, T.; FOURNET, B.; DUBERTRET, G. Production, isolation and preliminary characterization of the exopolysaccharide of the cyanobacterium *Spirulina platensis*. **Biotechnology Letters**, v. 15, n. 6, p. 567–572, 1993. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/BF00138541>>. .

FRASES, S.; NIMRICHTER, L.; VIANA, N. B.; NAKOUZI, A.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* capsular polysaccharide and exopolysaccharide fractions manifest physical, chemical, and antigenic differences. **Eukaryotic Cell**, v. 7, n. 2, p. 319–327, 2008.

GAO, H.; KHERA, E.; LEE, J.-K.; WEN, F. Immobilization of Multi-biocatalysts in Alginate Beads for Cofactor Regeneration and Improved Reusability. **Journal of Visualized Experiments**, , n. 110, p. 1–9, 2016.

GOPINATH, V.; SARAVANAN, S.; AL-MALEKI, A. R.; RAMESH, M.; VADIVELU, J. A review of natural polysaccharides for drug delivery applications: Special focus on cellulose, starch and glycogen. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 107, n. July, p. 96–108, 2018. Elsevier. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.07.136>>. .

GOTTLIEB, H. E.; KOTLYAR, V.; NUDELMAN, A. NMR chemical shifts of common laboratory solvents as trace impurities. **Journal of Organic Chemistry**, v. 62, n. 21, p. 7512–7515, 1997.

GOY, R. C.; MORAIS, S. T. B.; ASSIS, O. B. G. Evaluation of the antimicrobial activity of chitosan and its quaternized derivative on *E. Coli* and *S. aureus* growth. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, 2016.

GUO, Z.; GAO, M.; SONG, M.; et al. Synthesis and evaluation of ^{99m}Tc -labeled dimeric folic acid for FR-targeting. **Molecules**, v. 21, n. 6, p. 1–13, 2016.

GUPTA, P. N.; PATTANI, A.; CURRAN, R. M.; et al. Development of liposome gel based formulations for intravaginal delivery of the recombinant HIV-1 envelope protein CN54gp140. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 46, n. 5, p. 315–322, 2012. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2012.02.003>> . .

HALLETT, A. J.; CHRISTIAN, P.; JONES, J. E.; POPE, S. J. A. Luminescent, water-soluble gold nanoparticles functionalised with 3MLCT emitting rhenium complexes. **Chemical Communications**, , n. 28, p. 4278–4280, 2009.

HANNA, J. R.; ALLAN, C.; LAWRENCE, C.; et al. Optimizing the readout of lanthanide-DOTA complexes for the detection of ligand-bound copper(I). **Molecules**, v. 22, n. 5, p. 802, 2017. Multidisciplinary Digital Publishing Institute. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/1420-3049/22/5/802>>. Acesso em: 8/1/2019.

HAUG, A.; LARSEN, B. A STUDY ON THE CONSTITUTION OF ALGINIC ACID BY PARTIAL ACID HYDROLYSIS. **Proceedings of the Fifth International Seaweed Symposium, Halifax, August 25–28, 1965**. p.271–277, 1966. Elsevier.

HAUG, A.; LARSEN, B.; SMIDSRØD, O.; et al. A STUDY ON THE CONSTITUTION OF ALGINIC ACID BY PARTIAL ACID HYDROLYSIS. **Proceedings of the Fifth International Seaweed Symposium, Halifax, August 25–28, 1965**, v. 20, p. 271–277, 1966. Elsevier.

HEIN, C. D.; LIU, X. M.; WANG, D. Click chemistry, a powerful tool for pharmaceutical sciences. **Pharmaceutical Research**, v. 25, n. 10, p. 2216–2230, 2008. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11095-008-9616-1>> . .

HEUKO, J. G. **SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE DERIVADO AMINO CARBOXILADO DA AGAROSE**, 2015.

HU, W.; LI, J.; HOU, H.; et al. Preparation and characterization of hydrophobic alginate derivative nanocapsules entrapping λ -cyhalothrin. **Asian Journal of Chemistry**, v. 25, n. 17, p. 9904–9908, 2013.

ILLANES, A. **Immobilized Biocatalysts**. Second Edi ed. Elsevier B.V., 2011.

INAGAKI, F.; MAEDA, K.; NAKAZAWA, K.; MUKAI, C. Construction of the Oxazolidinone Framework from Propargylamine and CO₂ in Air at Ambient Temperature: Catalytic Effect of a Gold Complex Featuring an L2/Z-Type Ligand. **European Journal of Organic Chemistry**, v. 2018, n. 23, p. 2972–2976, 2018.

JAIN, A.; DUVVURI, L. S.; FARAH, S.; et al. Antimicrobial Polymers. **Advanced Healthcare Materials**, v. 3, n. 12, p. 1969–1985, 2014.

JENSEN, H. M.; LARSEN, F. H.; ENGELSEN, S. B. Characterization of Alginates by Nuclear Magnetic Resonance (NMR) and Vibrational Spectroscopy (IR, NIR, Raman) in Combination with Chemometrics BT - Natural Products From Marine Algae: Methods and Protocols. In: D. B. Stengel; S. Connan (Orgs.); . p.347–363, 2015. New York, NY: Springer New York. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2684-8_22> . .

JOHNSON, R. K.; ZINK-SHARP, A.; GLASSER, W. G. Preparation and characterization of hydrophobic derivatives of TEMPO-oxidized nanocelluloses. **Cellulose**, v. 18, n. 6, p. 1599–1609, 2011.

- KHOTIMCHENKO, Y. S. The antitumor properties of nonstarch polysaccharides: Carrageenans, alginates, and pectins. **Russian Journal of Marine Biology**, v. 36, n. 6, p. 401–412, 2010.
- KIM, H. J.; BAE, I. S.; CHO, S. J.; et al. Synthesis and characteristics of NH₂-functionalized polymer films to align and immobilize DNA molecules. **Nanoscale Research Letters**, v. 7, n. 1, p. 1–17, 2012. Springer Open Ltd. Disponível em: <<http://www.nanoscalereslett.com/content/7/1/30>>. .
- KLINKER, K.; HOLM, R.; HELLER, P.; BARZ, M. Evaluating chemical ligation techniques for the synthesis of block copolypeptides, polypeptoids and block copolypept(o)ides: a comparative study. **Polymer Chemistry**, v. 6, n. 25, p. 4612–4623, 2015. Royal Society of Chemistry.
- KOLB, H. C.; FINN, M. G.; SHARPLESS, K. B. Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 40, n. 11, p. 2004–2021, 2001.
- KOUASSI, M. C.; THÉBAULT, P.; RIHOUEY, C.; et al. Carboxymethylpullulan Grafted with Aminoguaiacol: Synthesis, Characterization, and Assessment of Antibacterial and Antioxidant Properties. **Biomacromolecules**, v. 18, n. 10, p. 3238–3251, 2017.
- KRITCHENKOV, A. S.; SKORIK, Y. A. Click reactions in chitosan chemistry. **Russian Chemical Bulletin**, v. 66, n. 5, p. 769–781, 2017.
- KUMAR, D.; PANDEY, J.; RAJ, V.; KUMAR, P. A Review on the Modification of Polysaccharide Through Graft Copolymerization for Various Potential Applications. **The Open Medicinal Chemistry Journal**, v. 11, n. 1, p. 109–126, 2017. Disponível em: <www.benthamopen.com/TOMCJ/>. Acesso em: 23/5/2019.
- KUO, J. W.; SWARM, D. A.; PRESTWICH, G. D. Chemical Modification of Hyaluronic Acid by Carbodiimides. **Bioconjugate Chemistry**, v. 2, n. 4, p. 232–241, 1991.
- LABRE, F.; MATHIEU, S.; CHAUD, P.; et al. DMTMM-mediated amidation of alginate oligosaccharides aimed at modulating their interaction with proteins. **Carbohydrate Polymers**, v. 184, n. October 2017, p. 427–434, 2018. Elsevier. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.12.069>>. .
- LARSEN, B.; SALEM, D. M. S. A.; SALLAM, M. A. E.; MISHRIKEY, M. M.; BELTAGY, A. I. Characterization of the alginates from algae harvested at the Egyptian Red Sea coast. **Carbohydrate Research**, 2003.
- LEAL, D.; MATSUHIRO, B.; ROSSI, M.; CARUSO, F. FT-IR spectra of alginic acid block fractions in three species of brown seaweeds. **Carbohydrate Research**, v. 343, n. 2, p. 308–316, 2008.
- LEE, K. Y.; MOONEY, D. J. Alginate: properties and biomedical applications. **Progress in polymer science**, v. 37, n. 1, p. 106–126, 2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22125349>>. .
- LEE, K. Y.; MOONEY, D. J.; LEE, K. Y., & MOONEY, D. J.; LEE, K. Y.; MOONEY, D. J. Alginate: Properties and biomedical applications. **Progress in Polymer Science (Oxford)**, v. 37, n. 1, p. 106–126, 2012. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2011.06.003>>. .
- LEMECHKO, P.; RENARD, E.; GUEZENNEC, J.; SIMON-COLIN, C.; LANGLOIS, V.

- Synthesis of dextran-graft-PHBHV amphiphilic copolymer using click chemistry approach. **Reactive and Functional Polymers**, v. 72, n. 8, p. 487–494, 2012.
- LEOPHAIRATANA, P.; DE SILVA, C. C.; KOBERSTEIN, J. T. How good is CuAAC “click” chemistry for polymer coupling reactions? **Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry**, v. 56, n. 1, p. 75–84, 2018.
- LIANG, L.; ASTRUC, D. The copper(I)-catalyzed alkyne-azide cycloaddition (CuAAC) “click” reaction and its applications. An overview. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 255, n. 23–24, p. 2933–2945, 2011. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2011.06.028>>. .
- LIEBER, E.; RAO, C. N. R.; HOFFMAN, C. W. W.; CHAO, T. S. Infrared Spectra of Organic Azides. **Analytical Chemistry**, v. 29, n. 6, p. 916–918, 1957.
- LOPES, W. A.; FASCIO, M. ESQUEMA PARA INTERPRETAÇÃO DE ESPECTROS DE SUBSTÂNCIAS ORGÂNICAS NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO Wilson Araújo Lopes* e Miguel Fascio. **Quim. Nova**, v. 27, n. 4, p. 670–673, 2004.
- MAROUNEK, M.; VOLEK, Z.; SKŘIVANOVÁ, E.; et al. Comparative study of the hypocholesterolemic and hypolipidemic activity of alginate and amidated alginate in rats. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 105, p. 620–624, 2017.
- MARTINS, A. F.; FACCHI, S. P.; FOLLMANN, H. D. M.; et al. Antimicrobial activity of chitosan derivatives containing N-quaternized moieties in its backbone: A review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 11, p. 20800–20832, 2014.
- MCHUGH, D. J. **Seaweeds uses as Human Foods**. 2003.
- MENDES, G. S.; DUARTE, M. E. R.; COLODI, F. G.; et al. Structure and anti-metapneumovirus activity of sulfated galactans from the red seaweed *Cryptonemia seminervis*. **Carbohydrate Polymers**, v. 101, n. 1, p. 313–323, 2014. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.09.026>>. .
- MENG, X.; EDGAR, K. J. “Click” reactions in polysaccharide modification. **Progress in Polymer Science**, v. 53, p. 52–85, 2016. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2015.07.006>>. .
- MISURCOVÁ, L.; ORSAVOVÁ, J.; AMBROZOVÁ, J. V. **Algal Polysaccharides and Health**. 2015.
- MOHAMED, N. A.; MOHAMED, R. R.; SEOUDI, R. S. Synthesis and characterization of some novel antimicrobial thiosemicarbazone O-carboxymethyl chitosan derivatives. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2014.
- MOHD HANIM, S. A.; MALEK, N. A. N. N.; IBRAHIM, Z.; et al. Antibacterial Activity of Amine-Functionalized Zeolite NaY against *Staphylococcus aureus* ATCC6538 and *Escherichia coli* ATCC11229. **Applied Mechanics and Materials**, v. 761, n. November 2016, p. 402–406, 2015.
- MOHY ELDIN, M. S.; SOLIMAN, E. A.; HASHEM, A. I.; TAMER, T. M. Antimicrobial activity of novel aminated chitosan derivatives for biomedical applications. **Advances in Polymer Technology**, v. 31, n. 4, p. 414–428, 2012.
- MUCHIUTI, E. **Derivados semissintéticos de polissacarídeos de macroalgas marinhas: híbridos de alginato ou ulvana com oligossacarídeos de kappa-carragenana**, 2018. Universidade Federal do Paraná.

- NAKAJIMA, N.; IKADA, Y. Mechanism of Amide Formation by Carbodiimide for Bioconjugation in Aqueous Media. **Bioconjugate Chemistry**, v. 6, n. 1, p. 123–130, 1995.
- OMTVEDT, L. A.; DALHEIM, M.; NIELSEN, T. T.; et al. Efficient Grafting of Cyclodextrin to Alginate and Performance of the Hydrogel for Release of Model Drug. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–11, 2019.
- PAHIMANOLIS, N.; VESTERINEN, A. H.; RICH, J.; SEPPALA, J. Modification of dextran using click-chemistry approach in aqueous media. **Carbohydrate Polymers**, v. 82, n. 1, p. 78–82, 2010.
- PARK, H.; LEE, H. J.; AN, H.; LEE, K. Y. Alginate hydrogels modified with low molecular weight hyaluronate for cartilage regeneration. **Carbohydrate Polymers**, v. 162, p. 100–107, 2017.
- PAWAR, S. N.; EDGAR, K. J. Alginate esters via chemoselective carboxyl group modification. **Carbohydrate Polymers**, v. 98, n. 2, p. 1288–1296, 2013. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.08.014>>. .
- PETROVA, K. T.; POTEWAR, T. M.; CORREIA-DA-SILVA, P.; et al. Antimicrobial and cytotoxic activities of 1,2,3-triazole-sucrose derivatives. **Carbohydrate Research**, 2015.
- PIENIZ, S.; ANDREAZZA, R.; OKEKE, B. C.; CAMARGO, F. A. O.; BRANDELLI, A. Antimicrobial and antioxidant activities of Enterococcus species isolated from meat and dairy products. **Brazilian journal of biology = Revista brasleira de biologia**, v. 75, n. 4, p. 923–931, 2015.
- QI, H.; LIU, X.; ZHANG, J.; et al. Synthesis and antihyperlipidemic activity of acetylated derivative of ulvan from *Ulva pertusa*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 50, n. 1, p. 270–272, 2012. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2011.11.006>>. .
- QI, H.; ZHANG, Q.; ZHAO, T.; et al. Antioxidant activity of different sulfate content derivatives of polysaccharide extracted from *Ulva pertusa* (Chlorophyta) in vitro. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 37, n. 4, p. 195–199, 2005.
- RABELLO DUARTE, M. E.; JAMES GORIN, P. A.; DUARTE, J. H. Homogeneous guluronic and mannuronic acid blocks in the alginate of the brown seaweed *Laminaria brasiliensis*. **Phytochemistry**, v. 30, n. 5, p. 1707–1708, 1991.
- RAMAWAT, K. G.; MÉRILLON, J.-M. **Polysaccharides: bioactivity and biotechnology**. Springer, 2015.
- RINAUDO, M. Characterization and properties of some polysaccharides used as biomaterials. **Macromolecular Symposia**, v. 245–246, p. 549–557, 2006.
- ROE, S.; GUNARATNAM, M.; SPITERI, C.; et al. Synthesis and biological evaluation of hybrid acridine-HSP90 ligand conjugates as telomerase inhibitors. **Organic and Biomolecular Chemistry**, v. 13, n. 31, p. 8500–8504, 2015.
- RONGHUA, H.; YUMIN, D.; JIANHONG, Y. Preparation and in vitro anticoagulant activities of alginate sulfate and its quaterized derivatives. **Carbohydrate Polymers**, v. 52, n. 1, p. 19–24, 2003.
- SALEM, D. M. S. A.; SALLAM, M. A. E.; YOUSSEF, T. N. M. A. Synthesis of

compounds having antimicrobial activity from alginate. **Bioorganic Chemistry**, v. 87, n. December 2018, p. 103–111, 2019. Elsevier. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.03.013>>. .

SALOMONSEN, T.; JENSEN, H. M.; STENBÆK, D.; ENGELSEN, S. B. Chemometric prediction of alginate monomer composition: A comparative spectroscopic study using IR, Raman, NIR and NMR. **Carbohydrate Polymers**, v. 72, n. 4, p. 730–739, 2008.

DOS SANTOS-FIDENCIO, G. C.; GONÇALVES, A. G.; NOSEDA, M. D.; DUARTE, M. E. R.; DUCATTI, D. R. B. Effects of carboxyl group on the anticoagulant activity of oxidized carrageenans. **Carbohydrate Polymers**, v. 214, n. November 2018, p. 286–293, 2019. Elsevier. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.03.057>>. .

SAYARI, N.; SILA, A.; ABDELMALEK, B. E.; et al. Chitin and chitosan from the Norway lobster by-products: Antimicrobial and anti-proliferative activities. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2016.

SCHANTÉ, C. E.; ZUBER, G.; HERLIN, C.; VANDAMME, T. F. Chemical modifications of hyaluronic acid for the synthesis of derivatives for a broad range of biomedical applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 85, n. 3, p. 469–489, 2011.

SEHGAL, D.; VIJAY, I. K. A method for the high efficiency of water-soluble carbodiimide-mediated amidation. **Analytical Biochemistry**, v. 218, n. 1, p. 87–91, 1994.

ŞEN, M.; ATIK, H. The antioxidant properties of oligo sodium alginates prepared by radiation-induced degradation in aqueous and hydrogen peroxide solutions. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 81, n. 7, p. 816–822, 2012.

SHIN, M. S.; LEE, S.; LEE, K. Y.; LEE, H. G. Structural and Biological Characterization of Aminated-Derivatized Oat β -Glucan. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 14, p. 5554–5558, 2005.

SIMI, C. K.; ABRAHAM, T. E. Physico chemical properties of aminated tamarind xyloglucan. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 81, n. 2, p. 513–520, 2010. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2010.07.051>>. .

SKJÅK-BRÆK, G.; ZANETTI, F.; PAOLETTI, S. Effect of acetylation on some solution and gelling properties of alginates. **Carbohydrate Research**, 1989.

ŠOSTAR TURK, S.; SCHNEIDER, R. Printing properties of a high substituted guar gum and its mixture with alginate. **Dyes and Pigments**, v. 47, n. 3, p. 269–275, 2000.

STEPHEN, A. M.; PHILLIPS, G. O. **Food Polysaccharides and Their Applications**. CRC Press, 2016.

SUDARSHAN, N. R.; HOOVER, D. G.; KNORR, D. Antibacterial Action of Chitosan. **Food Biotechnology**, v. 6, n. 3, p. 257–272, 1992.

SZEKALSKA, M.; PUCIŁOWSKA, A.; SZYMAŃSKA, E.; CIOSEK, P.; WINNICKA, K. Alginate: Current Use and Future Perspectives in Pharmaceutical and Biomedical Applications. **International Journal of Polymer Science**, v. 2016, 2016.

TAKO, M.; YOZA, E.; TOHMA, S. Chemical characterization of acetyl Fucoidan and alginate from commercially cultured *Cladosiphon okamuranus*. **Botanica Marina**, v.

43, n. 4, p. 393–398, 2000.

TAN, W.; LI, Q.; DONG, F.; et al. Novel 1,2,3-triazolium-functionalized starch derivatives: Synthesis, characterization, and evaluation of antifungal property. **Carbohydrate Polymers**, v. 160, p. 163–171, 2017. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.12.060>>. .

TAN, W.; LI, Q.; WANG, H.; et al. Synthesis, characterization, and antibacterial property of novel starch derivatives with 1,2,3-triazole. **Carbohydrate Polymers**, v. 142, p. 1–7, 2016. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.01.007>>. .

TAUBNER, T.; MAROUNEK, M.; SYNITSYA, A. Preparation and characterization of amidated derivatives of alginic acid. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 103, p. 202–207, 2017.

TUL'CHINSKY, V. M.; ZURABYAN, S. E.; ASANKOZHAEV, K. A.; KOGAN, G. A.; KHORLIN, A. Y. Study of the infrared spectra of oligosaccharides in the region 1,000–40 cm⁻¹. **Carbohydrate Research**, v. 51, n. 1, p. 1–8, 1976. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0008621500840318>>. .

UENO, M.; ODA, T. **Biological activities of alginate**. 1^o ed. Elsevier Inc., 2014.

ULINIUC, A.; POPA, M.; DROCKENMULLER, E.; et al. Toward tunable amphiphilic copolymers via CuAAC click chemistry of oligocaprolactones onto starch backbone. **Carbohydrate Polymers**, v. 96, n. 1, p. 259–269, 2013. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.03.047>>. .

USMAN, ADIL; KHALID, S.; USMAN, ATIF; HUSSAIN, Z.; WANG, Y. Algal Polysaccharides, Novel Application, and Outlook. **Algae Based Polymers, Blends, and Composites: Chemistry, Biotechnology and Materials Science**. p.115–153, 2017. Disponível em: <<https://app.dimensions.ai/details/publication/pub.1052690246>>. .

VÁZQUEZ, J. A.; RODRÍGUEZ-AMADO, I.; MONTEMAYOR, M. I.; et al. Chondroitin sulfate, hyaluronic acid and chitin/chitosan production using marine waste sources: Characteristics, applications and eco-friendly processes: A review. **Marine Drugs**, v. 11, n. 3, p. 747–774, 2013.

VEIGA, A.; TOLEDO, M. DA G. T.; ROSSA, L. S.; 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, 2019. Elsevier B.V.

VENKATESAN, J.; BHATNAGAR, I.; MANIVASAGAN, P.; KANG, K. H.; KIM, S. K. Alginate composites for bone tissue engineering: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 72, p. 269–281, 2015. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.07.008>>. .

VENKATRAMAN, P. Chitosan: An Antimicrobial Polymer. **Journal of Undergraduate Materials Research**, v. 5, n. 0, p. 11–13, 2018.

WANG, J.; ZHANG, Q.; ZHANG, Z.; LI, Z. Antioxidant activity of sulfated polysaccharide fractions extracted from *Laminaria japonica*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 42, n. 2, p. 127–132, 2008.

XIAO, H.; FU, X.; CAO, C.; et al. Sulfated modification, characterization, antioxidant and hypoglycemic activities of polysaccharides from *Sargassum pallidum*.

International Journal of Biological Macromolecules, v. 121, p. 407–414, 2019. Elsevier B.V. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.09.197>>. .

XING, K.; ZHU, X.; PENG, X.; QIN, S. Chitosan antimicrobial and eliciting properties for pest control in agriculture: a review. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 35, n. 2, p. 569–588, 2015.

XU, G.; XIAO, Y.; CHENG, L.; et al. Synthesis and rheological investigation of self-healable deferoxamine grafted alginate hydrogel. **Journal of Polymer Science, Part B: Polymer Physics**, v. 55, n. 11, p. 856–865, 2017.

YANG, J. S.; REN, H. B.; XIE, Y. J. Synthesis of amidic alginate derivatives and their application in microencapsulation of λ -cyhalothrin. **Biomacromolecules**, v. 12, n. 8, p. 2982–2987, 2011.

YANG, J. S.; XIE, Y. J.; HE, W. Research progress on chemical modification of alginate: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, n. 1, p. 33–39, 2011. Elsevier Ltd. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S014486171000946X>>. Acesso em: 17/9/2018.

YEMM, E. W.; COCKING, E. C. The determination of amino acid with ninhydrin. **Analyst, London**, v. 80, p. 209–213, 1955.

YUAN, H.; ZHANG, W.; LI, X.; et al. Preparation and in vitro antioxidant activity of κ -carrageenan oligosaccharides and their oversulfated, acetylated, and phosphorylated derivatives. **Carbohydrate Research**, v. 340, n. 4, p. 685–692, 2005.

ZWIKKER, J. W.; BRANDSMA, L.; VERKUIJSSE, H. D. Simplified Procedures for 1-Amino-2-propyne and Some Homologues. **Synthesis**, , n. 15, p. 2427–2428, 2003.