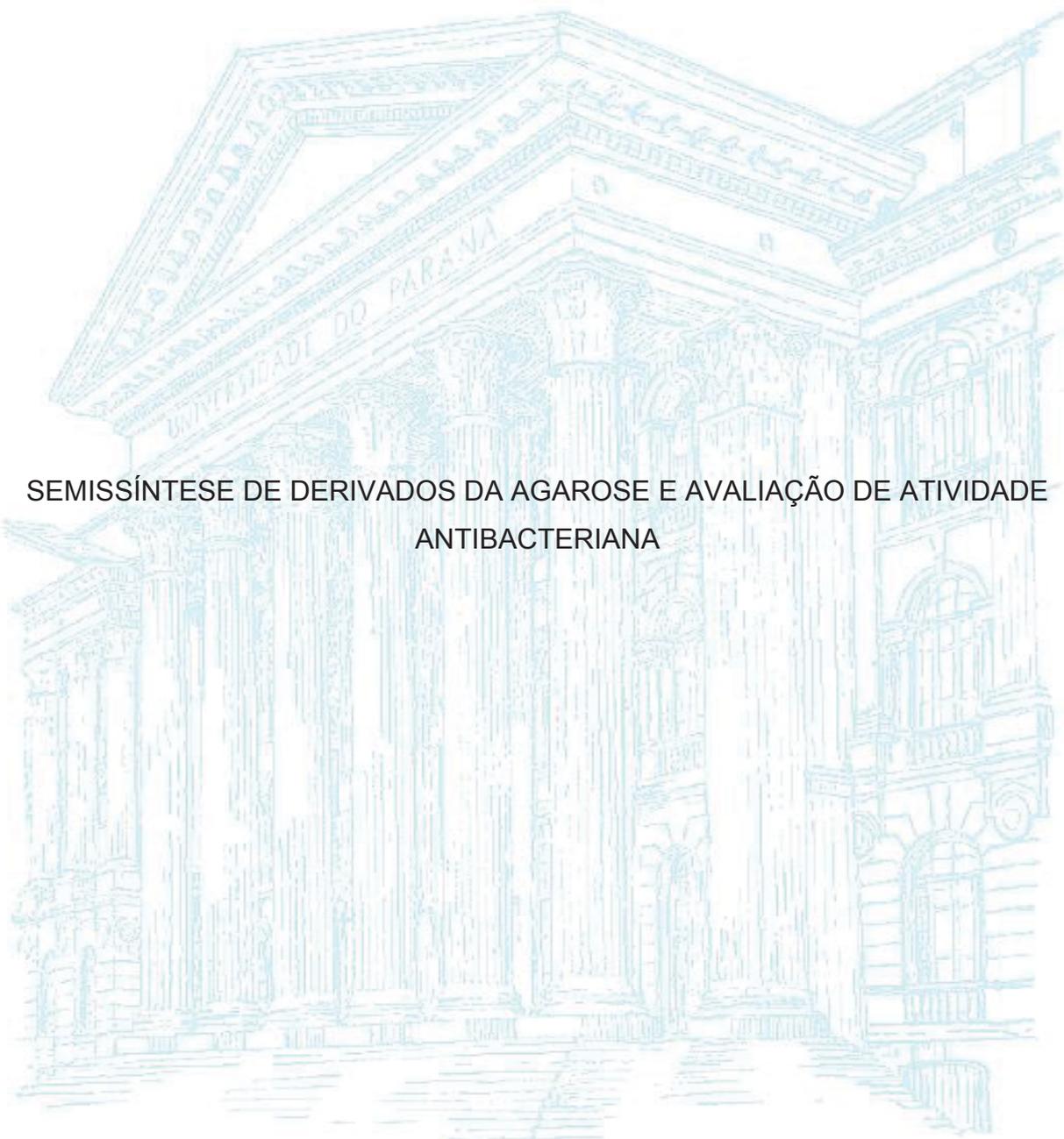


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JANAINA GOMES HEUKO



SEMISSÍNTESE DE DERIVADOS DA AGAROSE E AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE
ANTIBACTERIANA

CURITIBA

2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JANAINA GOMES HEUKO

SEMISSÍNTESE DE DERIVADOS DA AGAROSE E AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE
ANTIBACTERIANA

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciências (Bioquímica), Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciência-Bioquímica,

Orientador: Prof. Dr. Diogo R. Bazan Ducatti

Coorientadora: Profa. Dra. Maria Eugênia Duarte Nosedá

CURITIBA

2019

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas
Biblioteca de Ciências Biológicas
(Carla Fabiane Rasmussen – CRB/9-940)

Heuko, Janaina Gomes.

Semissíntese de derivados da agarose e avaliação de atividade antibacteriana. / Janaina Gomes Heuko. – Curitiba, 2019.
128 p. : il.

Orientador: Diogo Ricardo Bazan Ducatti

Coorientadora: Maria Eugênia Duarte Nosedá

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

1. Polissacarídeos. 2. Antibacterianos. I. Título. II. Ducatti, Diogo Ricardo Bazan. III. Nosedá, Maria Eugênia Duarte. IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências – Bioquímica.

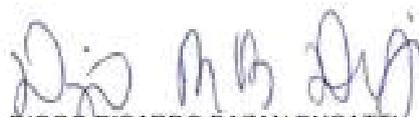
CDD (20. ed.) 547.782

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS (BIOQUÍMICA) da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **JANAINA GOMES HEUKO** intitulada: **SEMISSÍNTESE DE DERIVADOS DA AGAROSE E AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE ANTIBACTERIANA**, sob orientação do Prof. Dr. **DIOGO RICARDO BAZAN DUCATTI**, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

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

CURITIBA, 23 de Outubro de 2019.



DIOGO RICARDO BAZAN DUCATTI

Presidente da Banca Examinadora (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)



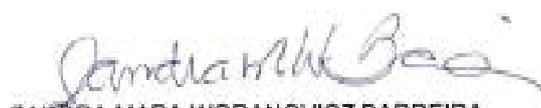
FRANCINE VALENGA

Avaliador Externo (PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ)



RODRIGO VASSOLER SERRATO

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)



SANDRA MARA WORANOVICZ BARREIRA

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer à toda minha família (meus pais, irmãos, tios, primos), em especial aos meus pais Neide e Waldemar e à minha irmã Joyce. Se não fosse por vocês certamente não teria concluído esta etapa. Vocês foram minha força, meu suporte. Obrigado por sempre acreditarem em mim e pelo amor incondicional.

Ao meu orientador, Diogo Ducatti pelos 6 anos de dedicação, ensinamentos, por estar sempre presente e disposto.

Aos professores: Maria Eugênia Duarte Nosedá, Alan Gonçalves e Miguel Nosedá, pelas sugestões, correções, colaborações e apoio financeiro.

Aos membros da banca, professores Rodrigo Vassoler, Sandra Barreira e Francine Valenga pela disposição/paciência em corrigirem este trabalho.

Aos técnicos e alunos responsáveis pelas análises de RMN, GC-MS, HPSEC, GLC-FID, DLS, dentre outras técnicas que foram utilizadas neste trabalho.

Aos colegas do laboratório 318. Aos membros mais recentes que tive a oportunidade e sorte de conhecer agora no fim, Bárbara e Manoella. Aos que por lá passaram e terminaram sua jornada, Jaqueline, Edson e à minha amiga-irmã Gislaine, que sempre esteve presente, mesmo quando estive longe, que me ajudou e motivou em inúmeros momentos. Sou eternamente grata por sua amizade!

À Jaqueline Carneiro pelas análises de FTIR e pela amizade de todos esses anos.

Aos colegas do laboratório 269, Juliana, Lais, Matheus, Ingrid e Carol, pelo companheirismo, pelas diversas conversas, apoio e momentos de descontração.

Aos colegas do E3 por toda ajuda e bons momentos.

Aos meus colegas da turma de mestrado, minha família na bioquímica, à Helyn por todos os almoços e conversas. Ao Glauco pela amizade, apoio e muitos momentos de diversão! e ao Willian, meu querido amigo, fico muito feliz por tê-lo conhecido, sua presença tornou todo este período mais feliz e mais leve.

Aos meus amigos externos ao departamento: Leticia, Vivian e Helena que certamente contribuíram neste período, com todo apoio, amizade e carinho.

À Lili por não me deixar desistir, por me guiar na jornada do autoconhecimento, por me ajudar a me tornar um ser humano melhor.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências-Bioquímica e toda a coordenação.

Às agências financiadoras, CAPES, CNPQ, Fundação Araucária, Pronex-carboidratos.

“Que nada nos limite, que nada nos defina, que nada nos sujeite.

Que a liberdade seja nossa própria substância”

Simone de Beauvoir

RESUMO

Polissacarídeos extraídos de algas vermelhas, tais como agaranas, são importantes biomoléculas que apresentam diversas aplicações consolidadas na academia e na indústria. A modificação química destes polímeros naturais tem atraído muita atenção devido às suas diversas propriedades e abundante estoque marinho. O objetivo deste trabalho foi a modificação da estrutura da agarose e a síntese de novos derivados com aplicações biológicas. Na primeira parte do trabalho foi realizada a síntese da C6-aminoagarose, utilizando uma rota composta de 3 etapas, em que houve a inserção seletiva dos grupamentos tosil, azido e amino na posição C6 da unidade de β -D-Galp do polissacarídeo. A reação de tosilação foi realizada em DMA, em meio básico e gerou o derivado tosil da agarose (ATS2) com grau de substituição (DS) de 0,94 por grupo tosil, seletivamente no C6 da unidade de β -D-Galp. O derivado ATS teve seus grupos tosil totalmente substituídos por grupo azida, através da reação com NaN_3 , gerando o derivado azido AN3. Este foi então totalmente reduzido através da reação de Staudinger, utilizando trifenilfosfina e água, gerando o derivado amino ANH. Este derivado foi finalmente despolimerizado por hidrólise ácida parcial gerando o derivado amino despolimerizado (ANHD), solúvel em água em pH 7, que foi estudado quanto a sua atividade antibacteriana frente às bactérias *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 e *Escherichia coli* ATCC 8738. A amostra ANHD apresentou atividade bacteriostática e bactericida contra todos os microrganismos testados, com destaque para a *Pseudomonas aeruginosa*, em que se obteve uma concentração inibitória mínima (CIM) de 310 $\mu\text{g/mL}$ e uma concentração bacteriostática mínima (CBM) de 2,5 mg/mL . Na segunda parte do trabalho foi realizada inserção dos grupos sulfato e carboxila na agarose, com objetivo de produzir polissacarídeos com potenciais aplicações biológicas. Os derivados sulfatados foram sintetizados em escala preparativa, em condições otimizadas, gerando produtos com alto grau de sulfatação. As reações de oxidação utilizando o sistema oxidante TEMPO-TCCA foram pela primeira vez relatadas para agarose e geraram os derivados seletivamente oxidados em C6 em diferentes graus de oxidação. Os 5 derivados da agarose produzidos nesta parte do trabalho podem ser estudados futuramente quanto ao seu potencial biológico, tal como quanto à sua atividade anticoagulante, devido à inserção destes grupos químicos relacionados à atividade anticoagulante da heparina.

Palavras-chave: Derivados da agarose. Modificação química. Atividade antibacteriana.

ABSTRACT

Polysaccharides extracted from red algae, such as agarans, are important biomolecules that have several consolidated applications in academia and industry. The chemical modification of these natural polymers has attracted a lot of attention due to their diverse properties and abundant marine stock. The aim of this work was the modification of the agarose structure and the synthesis of new derivatives with biological applications. In the first part of this work, the synthesis of C6-aminoagarose was performed, using a 3-step route, where were inserted tosyl, azido and amino groups at C6 of β -D-Galp unit in the agarose backbone. The tosylation reaction was performed in DMA and triethylamine, yielding the tosyl derivative of agarose (ATS2) with substitution degree (DS) of 0.94 tosyl group per agarose diad. The ATS derivative had its tosyl groups completely replaced by azide, by the reaction with NaN_3 , yielding the azide derivative AN3, which was then totally reduced by the Staudinger reaction using triphenylphosphine and water, producing the amino derivative ANH. This derivative was finally depolymerized by partial acid hydrolysis generating the water-soluble amino depolymerized derivative (ANHD), which was studied for its antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 and *Escherichia coli* ATCC 8738. The ANHD sample showed bacteriostatic and bactericidal activity against all tested microorganisms, especially *P. aeruginosa*, where were obtained a minimum inhibitory concentration (MIC) of 310 $\mu\text{g/mL}$ and a minimum bacteriostatic concentration (MBC) of 2.5 mg/mL. In the second part of this work, sulfate and carboxyl groups were inserted in agarose, aiming to produce polysaccharides with potential biological applications. Sulfated derivatives were synthesized on a preparative scale, under optimized conditions, generating products with a high degree of sulfation. Oxidation reactions using the TEMPO-TCCA oxidant system were first reported for agarose and generated selectively oxidized C6 derivatives with varying degrees of oxidation. The 5 agarose derivatives produced in this part of the work can be further studied for their biological potential, as well as for their anticoagulant activity, due to the insertion of these chemical groups related to heparin anticoagulant activity.

Key words: Agarose derivatives. Chemical Modification. Antibacterial activity.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1-	ESTRUTURA QUÍMICA BÁSICA DE CARRAGENANAS E AGARANAS.....	22
FIGURA 2-	UNIDADES MONOSSACARÍDICAS REPETITIVAS DE AGAROSE, A : (1→3)-β-D-GALACTOPIRANOSE E B : (1→4)-3,6-ANIDRO-α-L-GALACTOPIRANOSE.....	23
FIGURA 3-	ESQUEMA DE REAÇÃO DA AGAROSE-ETILENODIAMINA (AG-NH ₂) E POLIETILENOGLICOL-DIALDEÍDO (DF-PEG).....	25
FIGURA 4-	ESQUEMA DE REAÇÃO PARA PRODUÇÃO DO DERIVADO AZIDO DA QUITOSANA ATRAVÉS DE DERIVADOS HALOGENADOS.....	30
FIGURA 5-	SÍNTESE DO CONJUGADO CELULOSE-PORFIRINA.....	32
FIGURA 6-	MECANISMO DA REAÇÃO DE STAUDINGER PARA FORMAÇÃO DO DERIVADO AMINO DA AGAROSE.....	33
FIGURA 7-	ESQUEMA DE SÍNTESE DA C6-DEOXI-AMINOAGAROSE POR KONDAVEETI ET AL. (2014).....	34
FIGURA 8-	SEQUÊNCIA PENTASSACARÍDICA DA HEPARINA.....	37
FIGURA 9-	MECANISMO DE REAÇÃO DA OXIDAÇÃO DE UMA UNIDADE DE GALACTOSE A ÁCIDO GALACTURÔNICO UTILIZANDO OS REAGENTES TEMPO E TCCA.....	40
FIGURA 10-	SEMISSÍNTESE DO DERIVADO AMINO-CARBOXILADO DA AGAROSE.....	41
FIGURA 11-	ESTRUTURAS QUÍMICAS DA AGAROSE CARBOXILADA (A) E DO CLORETO DE 1-BUTIL-3-METILIMIDAZÓLIO (B)...	42
FIGURA 12-	ESTRUTURA QUÍMICA DA QUITOSANA.....	44
FIGURA 13-	OBTENÇÃO DOS DERIVADOS MODIFICADOS DA AGAROSE.....	47
FIGURA 14-	ROTA SINTÉTICA PARA SEMISSÍNTESE DA C6 AMINOAGAROSE.....	63
FIGURA 15-	MAPA DE CORRELAÇÃO ¹ H- ¹³ C HSQC EDITADO DA AGROSE (AGR).....	65
FIGURA 16-	ESPECTROS DE INFRAVERMELHO DA AGAROSE NATIVA (A) E TOSIL AGAROSE ATS1 (B).....	66

FIGURA 17-	ESPECTRO DE RMN DE ^1H DO DERIVADO TOSIL DA AGAROSE (ATS1).....	67
FIGURA 18-	MAPA DE CORRELAÇÃO ^1H - ^{13}C HSQC EDITADO DO DERIVADO TOSIL DA AGAROSE (ATS1).....	68
FIGURA 19-	ESPECTRO DE INFRAVERMELHO DA AGAROSE TOSILADA (ATS2).....	70
FIGURA 20-	MAPA DE CORRELAÇÃO ^1H - ^{13}C HSQC EDITADO DO DERIVADO TOSIL DA AGAROSE (ATS2).....	71
FIGURA 21-	ESPECTROS DE INFRAVERMELHO DA TOSIL AGAROSE ATS2 (A) E AZIDO AGAROSE AN3 (B).....	73
FIGURA 22-	ESPECTRO DE RMN DE ^1H DO DERIVADO TOSIL DA AGAROSE ATS (A) E DERIVADO AZIDO AN3 (B).....	74
FIGURA 23-	MAPA DE CORRELAÇÃO ^1H - ^{13}C HSQC EDITADO DO DERIVADO AZIDO DA AGAROSE (AN3).....	74
FIGURA 24-	ESPECTROS DE INFRAVERMELHO DAS AMOSTRAS AZIDO AGAROSE AN3 (A) E AMINO AGAROSE ANH (B).....	77
FIGURA 25-	ESQUEMA DE HIDRÓLISE ÁCIDA PARCIAL DO DERIVADO AMINO DA AGAROSE.....	78
FIGURA 26-	MAPA DE CORRELAÇÃO ^1H - ^{13}C HSQC EDITADO DO DERIVADO AMINO DA AGAROSE ANHD EM pH 7.....	81
FIGURA 27-	MAPA DE CORRELAÇÃO ^1H - ^{13}C HSQC EDITADO DO DERIVADO AMINO DA AGAROSE ANHD EM pH 4.....	81
FIGURA 28-	CIM e CBM DA AMINOAGAROSE PARA <i>PSEUDOMONAS AERUGIONOSA</i>	84
FIGURA 29-	ROTA PARA SEMISSÍNTESE DE DERIVADOS DA AGAROSE OXIDADOS E SULFATADO.....	86
FIGURA 30-	ESPECTRO DE INFRAVERMELHO DAS AMOSTRAS AGAROSE REDUZIDA AGR (A) E AGAROSE SULFATADA AS (B).....	89
FIGURA 31-	MAPA DE CORRELAÇÃO ^1H - ^{13}C HSQC DA AGAROSE SULFATADA (AS).....	91
FIGURA 32-	MAPA DE CORRELAÇÃO ^1H - ^1H COSY DA AGAROSE SULFATADA (AS).....	92

FIGURA 33-	CROMATOGRAMA DA AGAROSE SULFATADA OBTIDO POR HPSEC/MALLS ACOPLADO AO DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO (IR).....	93
FIGURA 34-	ESPECTRO DE INFRAVERMELHO DAS AMOSTRAS AGAROSE NATIVA (AGR) E AGAROSE OXIDADA (AO).....	97
FIGURA 35-	MAPA DE CORRELAÇÃO ^1H - ^{13}C HSQC EDITADO DA AGAROSE OXIDADA (AO).....	97
FIGURA 36-	CROMATOGRAMA DA AGAROSE OXIDADA (AO) OBTIDO POR HPSEC/MALLS ACOPLADO AO DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO (IR).....	98
FIGURA 37-	ESPECTRO DE INFRAVERMELHO DAS AMOSTRAS AGAROSE NATIVA (A) E AGAROSE PARCIALMENTE OXIDADA AOP (B).....	100
FIGURA 38-	MAPA DE CORRELAÇÃO ^1H - ^{13}C HSQC EDITADO DA AGAROSE PARCIALMENTE OXIDADA (AOP).....	101
FIGURA 39-	CROMATOGRAMA DA AGAROSE PARCIALMENTE OXIDADA (AOP) OBTIDO POR HPSEC/MALLS ACOPLADO AO DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO (IR).....	101
FIGURA 40 -	ESPECTRO DE INFRAVERMELHO DA AGAROSE PARCIALMENTE OXIDADA E SULFATADA (AOPS).....	103
FIGURA 41-	MAPA DE CORRELAÇÃO ^1H - ^{13}C HSQC EDITADO DA AGAROSE PARCIALMENTE OXIDADA E SULFATADA (AOPS)	104
FIGURA 42-	CROMATOGRAMA DA AGAROSE PARCIALMENTE OXIDADA E SULFATADA (AOPS) OBTIDO POR HPSEC/MALLS ACOPLADO AO DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO (IR).....	104
FIGURA 43-	ESPECTRO DE INFRAVERMELHO DA AGAROSE OXIDADA E SULFATADA (AOS)	108
FIGURA 44-	MAPA DE CORRELAÇÃO ^1H - ^{13}C HSQC DA AGAROSE OXIDADA E SULFATADA (AOS).....	108
FIGURA 45-	CROMATOGRAMA DA AGAROSE OXIDADA E SULFATADA (AOS) OBTIDO POR HPSEC/MALLS ACOPLADO AO DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO (IR).....	109

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DE ^1H E ^{13}C DAS DIADES DE AGAROSE NATIVA E C6 TOSILADA (ATS2).....	71
TABELA 2	DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DE ^1H E ^{13}C DAS DIADE DE AGAROSE NATIVA E DO DERIVADO C6 AZIDO (AN3)	75
TABELA 3	DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DE ^1H E ^{13}C DAS DÍADES DE AGAROSE NATIVA E DO DERIVADO C6 AMINO (ANHD).....	82
TABELA 4	CIM E CBM DA AMINOAGAROSE PARA OS MICRORGANISMOS <i>S. AUREUS</i> , <i>P.AERUGINOSA</i> E <i>E.COLI</i>	84
TABELA 5	REAÇÕES DE SULFATAÇÃO DA AGAROSE.....	88
TABELA 6	DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DE ^1H E ^{13}C DAS DIADES DE AGAROSE NATIVA E AGAROSE SULFATADA (AS).....	92
TABELA 7	REAÇÕES TESTADAS PARA OXIDAÇÃO DA AGAROSE.....	95
TABELA 8	DESLOCAMENTOS DE ^1H E ^{13}C DAS DIADES DE AGAROSE NATIVA E AGAROSE C-6 OXIDADA (AO).....	98
TABELA 9	REAÇÕES TESTADAS PARA SULFATAÇÃO DA AGAROSE OXIDADA.....	105
TABELA 10	DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DE ^1H E ^{13}C DAS DIADES DE AGAROSE OXIDADA (AO) E AGAROSE C-6 OXIDADA E SULFATADA (AOS).....	109

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

2M2B - 2-metil-2-buteno

ATS1 - agarose tosilada em água

ATS2 - agarose tosilada em solvente orgânico

AN3 - agarose azido

ANH - agarose amino

AO - agarose oxidada

AOP - agarose parcialmente oxidada

AOS - agarose oxidada e sulfatada

AOPS - agarose parcialmente oxidada e sulfatada

CIM - concentrações inibitórias mínimas

CBM - concentrações bactericidas mínimas

CuAAC - cicloadição azida-alcino catalisada por cobre

D₂O - óxido de deutério (água deuterada)

DMF - dimetil formamida

DMFa - dimetil formamida anidra

DMSO - dimetil sulfóxido

DMSOa - dimetil sulfóxido anidro

DMA - dimetil acetamida

DMAa - dimetil acetamida anidra

DMMB - azul de dimetil metileno

DMI - dimetil imidazol

DS - grau de substituição

HPSEC/MALLS - cromatografia de exclusão estérica de alta precisão acoplada a espalhamento de luz laser em multiângulos

PPh₃ - trifenilfosfina

rpm - rotações por minuto

RMN - ressonância magnética nuclear

RMN ¹H - ressonância magnética nuclear de hidrogênio um

RMN ¹³C - ressonância magnética nuclear de carbono treze

RMN 1D - ressonância magnética nuclear unidimensional

RMN 2D - ressonância magnética nuclear bidimensional

ppm - partes por milhão

TCCA - ácido tricloroisocianúrico

TEMPO - *N*-oxil-2,2,6,6-tetrametilpiperidina

TFA - ácido trifluoracético

δ - deslocamento químico

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 OBJETIVOS	19
2.1 OBJETIVO GERAL.....	19
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
3.1 ALGAS VERMELHAS.....	21
3.1.1 Galactanas de algas vermelhas.....	21
3.1.1.1 Agarose.....	22
3.2 MODIFICAÇÃO QUÍMICA DE POLISSACARÍDEOS.....	26
3.2.1 Semissíntese de tosil polissacarídeos.....	27
3.2.2 Semissíntese de azido polissacarídeos.....	29
3.2.3 Semissíntese de amino polissacarídeos.....	32
3.2.4 Semissíntese de polissacarídeos sulfatados.....	35
3.2.5 Semissíntese de polissacarídeos seletivamente oxidados utilizando TEMPO.....	38
3.3 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE AMINOPOLISSACARÍDEOS.....	43
3.3.1 Bactérias e antimicrobianos.....	43
3.3.2 Atividade antimicrobiana da quitosana.....	45
4 MATERIAIS E MÉTODOS	47
4.1 OBTENÇÃO DO POLISSACARÍDEO.....	47
4.2 MODIFICAÇÕES QUÍMICAS NA AGAROSE.....	47
4.2.1 Redução das pontas reductoras com NaBH ₄	48
4.2.2 Semissíntese do derivado tosil da agarose (ATS1).....	48
4.2.3 Semissíntese do derivado tosil da agarose (ATS2).....	48
4.2.4 Semissíntese do derivado azido da agarose (AN3).....	49
4.2.5 Semissíntese do derivado amino da agarose (ANH).....	49
4.2.6 Curva de hidrólise ácida parcial da agarose nativa e do derivado amino da agarose (ANH).....	50
4.2.7 Hidrólise ácida parcial do derivado amino da agarose (ANH).....	50
4.2.8 Semissíntese do derivado sulfatado da agarose (AS).....	50
4.2.9 Semissíntese do derivado C6 oxidado da agarose (AO).....	51

4.2.10 Semissíntese do derivado parcialmente oxidado em C6 da agarose (AOP).....	51
4.2.11 Semissíntese do derivado parcialmente oxidado em C6 e sulfatado (AOPS).....	52
4.2.12 Semissíntese do derivado oxidado em C6 e sulfatado (AOS).....	52
4.2.13 Preparo da resina catiônica para formação dos sais de trietilamônio e piridônio.....	53
4.3 Quantificação do grau de substituição dos derivados tosil, azido e amino por RMN de ¹ H.....	53
4.4 Determinação do grau de oxidação dos derivados oxidados da agarose por RMN de ¹ H- ¹³ C HSQC.....	53
4.5 MÉTODOS ANALÍTICOS.....	54
4.5.1 Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	54
4.5.2 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier e refletância total atenuada (ATR/FTIR).....	55
4.5.3 Cromatografia Gás-Líquido com detector de ionização em chama (GLC-FID).....	55
4.5.4 Cromatografia de exclusão estérica de alta precisão acoplada a espalhamento de luz laser em multiângulos (HPSEC-MALLS) e índice de refração(RI)	55
4.5.5 Espalhamento de luz dinâmico (DLS).....	56
4.5.6 Análise elementar de C, H, N e Cl	57
4.5.7 Método colorimétrico para identificação de grupo azido.....	57
4.5.8 Método colorimétrico para identificação de grupo amino (Teste da ninhidrina).....	57
4.5.9 Método colorimétrico para identificação de grupo sulfato (Teste do DMMB)	58
4.5.10 Método colorimétrico para determinação de açúcar total.....	58
4.5.11 Método colorimétrico para dosagem de ácido urônico.....	58
4.5.12 Método turbidimétrico para dosagem de sulfato	59
4.5.12.1 Determinação do grau de sulfatação (DS sulfatação)	59
4.5.13 Método colorimétrico para dosagem do teor de 3,6 anidrogactopirranose	60
4.5.14 Método colorimétrico para dosagem de açúcar redutor (DNS).....	60

4.6 ENSAIOS DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS.....	61
4.6.1 Ensaio de atividade antimicrobiana.....	61
4.6.1.1 Ensaio de microdiluição e determinação da concentração inibitória mínima (CIM)	61
4.6.1.2 Determinação da concentração bactericida mínima (CBM).....	62
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
5.1 PARTE I: SÍNTESE DE C6-AMINOAGAROSE E AVALIAÇÃO DE SUA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	63
5.1.1 Caracterização do polissacarídeo nativo.....	64
5.1.2 Semissíntese do derivado tosil da agarose (ATS1 e ATS2).....	65
5.1.3 Semissíntese do derivado azido da agarose (AN3).....	72
5.1.4 Semissíntese do derivado amino da agarose (ANH).....	76
5.1.4.1 Hidrólise ácida parcial do derivado amino da agarose (ANH)	78
5.1.5 Atividade antimicrobiana do derivado amino despolimerizado da agarose (ANHD).....	82
5.2 PARTE II-SÍNTESE DOS DERIVADOS OXIDADOS E SULFATADOS DA AGAROSE.....	86
5.2.1 Semissíntese do derivado sulfatado da agarose (AS).....	87
5.2.2 Semissíntese do derivado C6 oxidado da agarose (AO).....	94
5.2.3 Semissíntese do derivado parcialmente oxidado em C6 da agarose (AOP).	99
5.2.4 Semissíntese do derivado parcialmente oxidado em C6 e sulfatado da agarose (AOPS)	102
5.2.5 Semissíntese do derivado oxidado em C6 e sulfatado da agarose (AOS).	105
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	111
REFERÊNCIAS	112

1 INTRODUÇÃO

A agarose é um polissacarídeo extraído da parede celular de algas vermelhas, proveniente de frações menos iônicas do ágar. É um polímero neutro com uma estrutura dissacarídica repetitiva, constituída de (1→3)-β-D-galactopiranosose e (1→4)-3,6-anidro-α-L-galactopiranosose (ARAKI, 1966; RENN, 1984; ARMISEN; GALACTAS, 1987; PELÉGRIN; MURANO, 2005; FACCINI, 2007).

A agarose é um polissacarídeo de alto valor comercial e industrialmente importante. Ela já possui aplicações consolidadas dentro da área industrial, devido principalmente à suas propriedades físico-químicas interessantes, tais como o alto poder geleificante, formação de géis fortes e de alta transparência. Esse polissacarídeo tem apresentado um papel muito importante no campo da biotecnologia, sendo utilizado como gel de eletroforese, suporte para imobilização de enzimas e matriz cromatográfica e na área alimentícia, como estabilizantes, espessantes e geleificantes de alimentos (RENN, 1984; MEENA et al., 2007; ELCHINGER et al., 2011; WANG et al., 2012; KRAJEWSKI, 2016).

Existe uma crescente procura por novos materiais a partir de fontes renováveis e biodegradáveis, como polissacarídeos, uma vez que estes se mostram como soluções promissoras em termos ambientais que permitem suas aplicações na área biotecnológica, alimentícia, química e biomédica (TANKAM et al., 2007; SENNI et al., 2011; CHHATBAR et al., 2012).

Visando aumentar as aplicações da agarose na indústria, bem como dar novas aplicações a este polímero, nos últimos anos, a agarose também ganhou crescente destaque na área acadêmica, em que vem sendo estudada sobretudo para sua aplicação como biomaterial. Modificações e funcionalizações da agarose podem ampliar suas atividades dentro da área industrial e dar novas funções biológicas. Além disso, por possuir estrutura química mais homogênea, se facilitam estudos de estrutura-atividade pela inserção de diferentes grupos químicos no esqueleto polissacarídico (JIE et al., 2012; KONDAVEETI, PRASSAD, SIDDHANTA, 2013; FORGET et al. 2016).

Dentre as diferentes funcionalizações feitas em polissacarídeos, a sulfatação é a mais realizada. A sulfatação química visa propiciar principalmente a atividade anticoagulante, sendo o método mais popular para sintetizar análogos da heparina. A heparina é a droga anticoagulante de referência, no entanto ela possui origem animal

podendo apresentar risco de contaminação com vírus e príons, além de possuir estrutura química heterogênea, gerando diversidade estrutural, dificultando a seleção da dose e reprodutibilidade de resultados, e efeitos adversos severos, como osteoporose, trombocitopenia e complicações hemorrágicas (CIANCIA et al., 2010; MESTECHKINA; SHCHERBUKHIN, 2010; SENNI et al., 2011; YOUPING et al., 2012; YANG et al., 2013; MATSUHIRO et al., 2014; PEREIRA et al., 2015).

Além da sulfatação, a oxidação também se mostra interessante, uma vez que gera ácidos urônicos conferindo propriedades como maior capacidade geleificante, complexadora e antifloculante. Além disso, os derivados oxidados podem apresentar um efeito potencializador da atividade anticoagulante através de um efeito cooperativo com o sulfato o que está intimamente relacionado com o padrão e posição da sulfatação (NISHIMURA et al., 1986; PEREZ; MONTANARI; VIGNON, 2003; PONEDEL'KINA; KHAIBRAKHMANOVA; ODINOKOV, 2010; SU et al., 2013; PIERRE et al., 2017; CARVALHO et al., 2018; SANTOS-FIDÊNCIO et al. 2019).

Outra funcionalização de interesse é a aminação de polissacarídeos. Polissacarídeos contendo grupos amino, tais como a quitosana, apresentam diversas atividades, como propriedades mucoadesivas e hemostáticas e capacidades antimicrobiana em função da presença do grupo amino no esqueleto polissacarídico (SENEL; MCCLURE, 2006; FOX, EDGAR, 2012; WIECKIEWICZ et al., 2017; AHSAN et al., 2018).

Dessa forma, a modificação química da agarose é de grande importância, pois amplia suas aplicações dentro de áreas já consolidadas como na área biotecnológica, além de gerar derivados com novas aplicações e funcionalidades.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho foi a semissíntese de derivados da agarose, através da inserção dos grupamentos toсила, azido, amino, carboxila e sulfato e avaliação da atividade antibacteriana do derivado amino.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sintetizar o derivado C6-tosil agarose (ATS) através de reação de tosilção da agarose (AGR).
- Sintetizar o derivado C6-azido agarose (AN3) através da reação de substituição nucleofílica com azida de sódio, a partir do derivado tosil (ATS).
- Sintetizar o derivado C6-amino agarose (ANH), através da reação de Staundiger, a partir do derivado azido (AN3).
- Sintetizar o derivado C6-amino agarose despolimerizado (ANHD) através de hidrólise ácida parcial do derivado amino (ANH).
- Sintetizar o derivado per-O-sulfatado da agarose (AS) através de sulfatação da agarose nativa (AGR).
- Sintetizar o derivado oxidado da agarose (AO) através da oxidação seletiva, com N-oxil-2,2,6,6-tetrametilpiperidina (TEMPO) e ácido triclorohisocianúrico (TCCA), da agarose nativa (AGR).
- Sintetizar o derivado oxidado em C6 e per-O-sulfatado (AOS) através de sulfatação do derivado oxidado (AO).
- Sintetizar o derivado parcialmente oxidado da agarose (AOP) através da oxidação seletiva, com N-oxil-2,2,6,6-tetrametilpiperidina (TEMPO) e ácido triclorohisocianúrico (TCCA), da agarose nativa (AGR).
- Sintetizar o derivado parcialmente oxidado em C6 e per-O-sulfatado (AOPS) através de sulfatação do derivado oxidado (AOP).

- Caracterizar todos os produtos de síntese através de métodos químicos e espectroscópicos (Colorimetrias, RMN, FTIR, UV, HPSEC/MALLS).
- Avaliar a potencial atividade antibacteriana *in vitro* do produto (ANHD) contra as bactérias *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus*, ATCC 6538 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 através do método de microdiluição.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 ALGAS VERMELHAS

As algas são organismos fotoautotróficos e com estruturas reprodutivas unicelulares que possuem importantes funções no ambiente aquático. As três principais divisões de macroalgas marinhas são as Phaeophytas (algas marrons), Chlorophytas (algas verdes) e Rhodophytas (algas vermelhas). As algas vermelhas estão distribuídas principalmente no ambiente marinho, alcançando maior diversidade em regiões tropicais e compõem 5000-6000 espécies (BOLD; WYNNE, 1985; STEVENSON; BOTHWELL; LOWE, 1996, GRAHAM; WILCOX, 2000; RORRER; CHENEY, 2004, RAVEN et al., 2007).

A parede celular das algas vermelhas são constituídas de um componente rígido feito de microfibrilas no seu interior, constituída de celulose, enquanto exteriormente são formadas por uma matriz mucilaginosa amorfa, composta por polímeros de D-xilose, D-glucose, D-ácido glucurônico, galactose e manose (BOLD; WYNNE, 1985; GRAHAM; WILCOX, 2000).

3.1.1 Galactanas de algas vermelhas

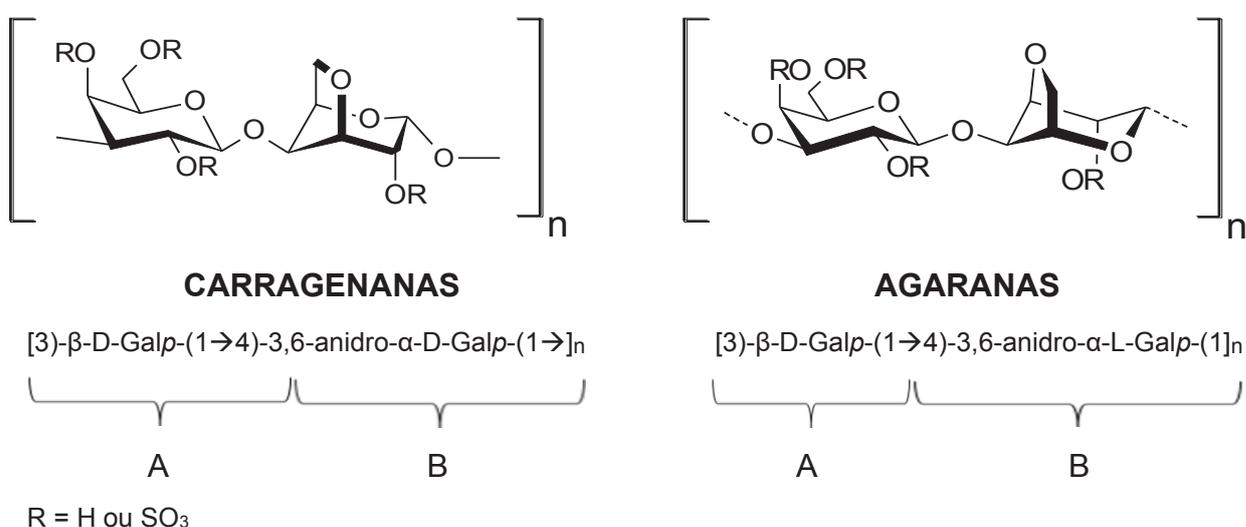
A maior parte dos polissacarídeos extraídos do componente amorfo da parede celular de algas vermelhas são galactanas. Estes polissacarídeos apresentam grande importância comercial por formarem colóides e géis em meios aquosos a concentrações muito baixas e, portanto, são denominados ficocolóides. A indústria de ficocolóides é um mercado crescente que movimenta anualmente milhões de dólares no mundo (FENICAL, 1975, FANI, 2008).

As galactanas de algas vermelhas apresentam uma estrutura linear composta por unidades de β -D-galactopiranosose ligadas glicosidicamente através dos carbonos 1 e 3 (unidade A) e α -galactopiranosose ligadas através dos carbonos 1 e 4 (unidade B), formando assim unidades dissacarídicas repetitivas do tipo $(AB)_n$ (Figura 1) (PAINTER, 1983; PERCIVAL, 2007).

A unidade A é sempre constituída por um estereoisômero da série D-, enquanto a unidade B se apresenta na configuração D- ou L-, podendo ainda ser encontrada na forma ciclizada, formando um anel 3,6 anidro. Assim, de acordo com a estereoquímica das unidades 4-O-ligadas, estas galactanas podem ser classificadas em agaranas

(possuem configuração L-) e carragenanas (possuem configuração D-) (USOV, 1992; PAINTER, 1983), conforme representado na Figura 1. Além destas duas classes, algumas ordens do filo Rhodophyta possuem algas que biossintetizam galactanas com estruturas híbridas às agaranas e carragenanas, podendo apresentar na mesma molécula a unidade B tanto na configuração D- quanto na L-, estas galactanas são denominadas de DL-híbridas (STORTZ; CEREZO, 2000).

FIGURA 1- ESTRUTURA QUÍMICA BÁSICA DE CARRAGENANAS E AGARANAS



FONTE: A autora (2019)

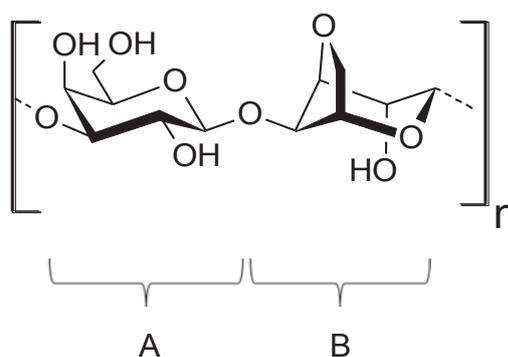
3.1.1.1 Agarose

O ágar é uma mistura de polissacarídeos encontrado nas algas vermelhas, especialmente em membros da família Gelidiaceae e Gracilariaceae, sendo o gênero *Gracilaria* a maior fonte deste polissacarídeo (ARMISEN; GALACTAS, 1987; PELÉGRIN; MURANO, 2005). Registros históricos apontam que o ágar é o ficolóide de utilização mais antiga, sendo que foi o primeiro a ser usado na indústria alimentícia na forma de géis. Esse biopolímero tem apresentado um papel muito importante no campo da biotecnologia desde que Koch, em 1882, demonstrou que o ágar é um meio sólido adequado para crescimento de microrganismos (FANI, 2008; WANG et al., 2012).

O ágar consiste em dois diferentes componentes: agarpectina e agarose. A agarpectina é um polissacarídeo ácido que pode conter os substituintes éster de sulfato, metila e ácido pirúvico. A agarose é proveniente de frações menos iônicas do

ágar, sendo um polissacarídeo neutro e inerte com uma estrutura linear repetitiva, constituída de β -D-galactopiranoose e 3,6-anidro- α -L-galactopiranoose (FIGURA 2) (ARAKI, 1966; RENN, 1984; FACCINI, 2007).

FIGURA 2- UNIDADES MONOSSACARÍDICAS REPETITIVAS DE AGAROSE, **A**: (1 \rightarrow 3)- β -D-GALACTOPIRANOSE E **B**: (1 \rightarrow 4)-3,6-ANIDRO- α -L-GALACTOPIRANOSE



FONTE: A autora (2019)

Precisamente, as algas sintetizam o ágar em forma sulfatada, produzindo a anidrogalactose na eliminação enzimática do sulfato em C6 e da hidroxila em C3 da unidade B (JONES; PEAT, 1942; REES, 1961). Assim, o conteúdo de sulfato decresce com a maturidade da planta e a formação do anidro-açúcar, que confere à agarose sua propriedade geleificante (USOV, 1992, 2011; RENN, 1997).

Knutsen et al. (1994) convencionaram um sistema de código de letras para identificar as unidades monossacarídicas e seus substituintes na estrutura de galactanas. Para a agarose, a letra G se refere a unidade de D-galactose (unidade A) e LA a unidade 3,6-anidro-L-galactose (unidade B). Assim, os carbonos e hidrogênios destas unidades são identificados pela letra da unidade (G ou LA) seguida do número (1 a 6). A presença dos substituintes O-sulfato, O-metil e 4,6-O-(1'-carboxietilideno) são identificados pelas letras S, M e P, respectivamente.

A agarose é um material de alto valor comercial que possui aplicações consolidadas dentro da área industrial, tais como na área biotecnológica como géis de eletroforese e meio de cultivo para crescimento de microrganismos, na área alimentícia como estabilizante e espessante de alimentos e na área farmacêutica na confecção de cápsulas e materiais para moldes dentários (RENN, 1984; MEENA et al., 2007; ELCHINGER et al., 2011, VIEIRA et al., 2011, WLADYSŁAW; KRAJEWSKI, 2016).

A agarose vem ganhando destaque na área acadêmica, em que diversas pesquisas vêm sendo realizadas visando melhorar e/ou criar aplicações para este polissacarídeo na indústria. Dentre as principais aplicações, a de maior destaque nos últimos anos é a utilização da agarose dentro da área biomédica, visando sua aplicação biológica. Neste contexto, muitos trabalhos utilizam a propriedade de formar hidrogéis da agarose para produção de biomaterias (JIE et al., 2012; KONDAVEETI, PRASSAD, SIDDHANTA, 2013; FORGET et al. 2013, GÓMEZ-MASCARAQUE et al., 2014, ZHANG et al. 2018; ZARRINTAJ et al., 2018; ARYA et al., 2019).

Hidrogéis são redes poliméricas tridimensionais formadas por muitas moléculas em água. Eles são caracterizados pela presença de ligações cruzadas formadas por interações fortes e fracas que geram enovelamentos e/ou rearranjos dos domínios hidrofóbicos ou hidrofílicos dos polímeros (KONDAVEETI et al., 2013; GÓMEZ-MASCARAQUE et al., 2014).

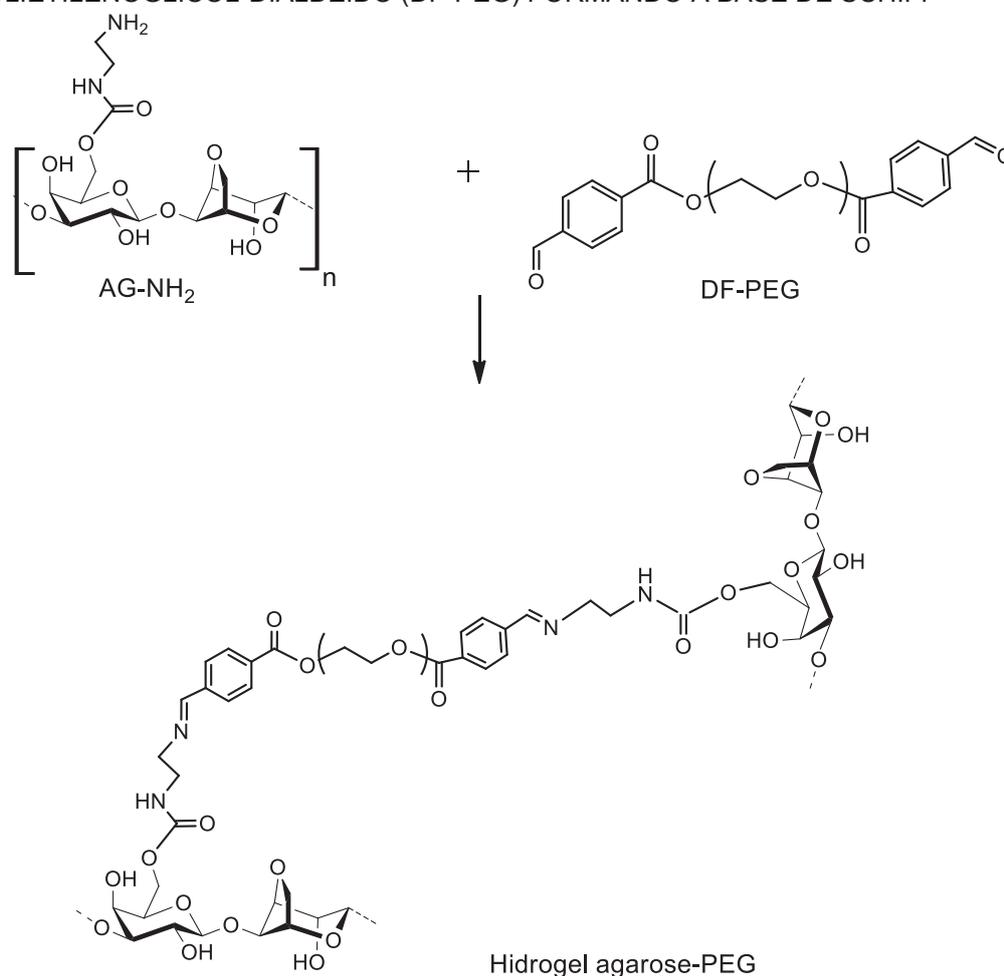
A estrutura química da agarose confere à esta molécula a capacidade de formar géis muito fortes mesmo em baixas concentrações, promovendo um ambiente úmido e aumentando a estabilidade do sistema (MARTIN et al., 2008; GÓMEZ-MASCARAQUE et al., 2014). Por estes motivos este polissacarídeo vem sendo utilizado para aplicações em engenharia de tecidos biológicos e em medicina regenerativa (KHANARIAN et al., 2012; YAMADA et al, 2012; IWAI et al., 2015; CIGAN et al., 2016; HU et al., 2016).

Na engenharia de tecidos são utilizados suportes poliméricos para a modulação do crescimento e diferenciação celular, mantendo ou melhorando as funções teciduais. Quando estas matrizes estão associadas também a liberação controlada de fármacos (*drug delivery*), surge o conceito da medicina regenerativa (YAMADA et al., 2012; SUN; TAN, 2013; AHSAN et al., 2018). Na literatura há relatos da utilização da agarose para *drug delivery* (MEHROTA et al., 2012), na cicatrização de feridas (ZHANG et al., 2018), regeneração de cartilagem (AWAD et al., 2004; DE ROSA et al., 2006) e regeneração de tecidos neuronais (MARTIN et al., 2008; LYNAM et al. 2015).

Zhang et al (2018) sintetizaram hidrogéis a base de agarose para adesão tecidual e potencial cicatrização de ferida. Neste estudo foi sintetizado um hidrogel de agarose com resposta ao pH, através da formação de base de Schiff, misturando-se agarose conjugada à etilenodiamina com solução de polietilenoglicol (funcionalizadas com dialdeído) (FIGURA 3). Estes hidrogéis conferiram notável adesividade aos

tecidos e capacidades auto-curativa ao hidrogel injetável, sem qualquer estímulo externo. No estudo, testes hemostáticos *in vivo* em fígado de coelho demonstraram que os hidrogéis foram capazes de estancar eficazmente o trauma grave. Em comparação com o tratamento com gaze convencional. A quantidade total de sangramento diminuiu acentuadamente ($0,19 \pm 0,03$ g), e o tempo de hemostasia foi menor que 10 s após o tratamento com hidrogéis. Segundo os autores, a capacidade curativa, a citocompatibilidade e a característica de adesão dos hidrogéis sensíveis ao pH fazem deles promissores candidatos como curativos para utilização a longo prazo em situações críticas.

FIGURA 3 – ESQUEMA DE REAÇÃO DA AGAROSE-ETILENODIAMINA (AG-NH₂) E POLIETILENOGLICOL-DIALDEÍDO (DF-PEG) FORMANDO A BASE DE SCHIFF



FONTE: A autora (2019)

3.2 MODIFICAÇÃO QUÍMICA DE POLISSACARÍDEOS

Recentemente há uma crescente procura por novos materiais a partir de fontes renováveis e biodegradáveis. Isso se deve ao fato destes biomateriais se apresentarem como soluções promissoras em termos ambientais, além de possuírem características químicas e físico-químicas interessantes, como a formação de géis e soluções viscosas (RENN, 1984, TANKAM et al., 2007; SIMKOVIC, 2008; ELCHINGER et al., 2011; SENNI et al., 2011; CHHATBAR et al., 2012). O desenvolvimento de métodos seletivos sem a necessidade de proteção de hidroxilas para modificação de carboidratos é altamente desejável uma vez que estas reações seletivas geralmente requerem vários passos sintéticos, envolvendo proteção e desproteção de hidroxilas devido à reatividade similar dos grupos hidroxila (CIMECIOGLU, 1997; JAGER; MINAARD, 2016).

A semissíntese de aminopolissacarídeos é um exemplo de modificação interessante, uma vez que os produtos gerados têm grande importância biológica e tecnológica, apresentando muitas aplicações nestas áreas, tais como suportes cromatográficos, *gene delivery*, catálise de reações (como de reações aldólicas) (MACLAUGHLIN et al., 1998; JAYAKUMAR et al., 2010; RICCI et al., 2010; SARANYA et al., 2011; GIOIA et al., 2013; RICCI et al., 2013 GONZALO et al., 2018). Polissacarídeos naturalmente aminados, tais como a quitosana, apresentam relevante atividade contra microrganismos em função da presença do grupo amino no esqueleto polissacarídico (RABEA et al., 2003; SILVA et al., 2006; GOY et al., 2009; FOX, EDGAR, 2012). Uma das vias que podem ser utilizadas para realização da aminação de polissacarídeos é por via da tosilacção. A primeira reação da via consiste na substituição da hidroxila por um grupamento tosila. Então o tosila polissacarídeo sofre substituição com o grupamento azido gerando o derivado azido que por fim será reduzido a amina, produzindo o aminopolissacarídeo (CHHATBAR; GODIYA; SIDDHANTA, 2012).

Outra modificação realizada há muitas décadas com o objetivo de expandir e dar novas propriedades biológicas para os polissacarídeos são as reações de sulfatação. Sabe-se que a sulfatação de polissacarídeos aumenta propriedades biológicas, tais como antioxidante, antitumoral e anticoagulante (MARUYAMA et al., 1998; MESTECKINA, SHCHERBUKHIN, 2010, ZHANG et al., 2010, MAAS et al., 2012, YANG et al., 2013; LIANG et al., 2014). Polissacarídeos naturalmente

sulfatados, como por exemplo os glicosaminoglicanos, apresentam diversas funções nos tecidos em que são originados, sendo capazes de ligar-se com especificidade a proteínas. A sulfatação química visa propiciar esta habilidade de ligação a proteínas aos polissacarídeos, o que está associado com suas propriedades biológicas (OPOKU et al., 2006; SENNI et al., 2011; PEREIRA et al., 2015, MATSUHIRO et al., 2014).

Além da sulfatação e da aminação, a oxidação também é um método interessante de ampliar as propriedades biológicas de polissacarídeos. A oxidação gera ácidos urônicos e confere à estas macromoléculas aniônicas surpreendentes propriedades biológicas e funcionais com alto potencial de aplicação em inúmeros campos industriais. A oxidação pode aumentar as propriedades físico-químicas de polissacarídeos e introduzir uma maior capacidade geleificante, complexadora e antifloculante à essas moléculas (PEREZ; MONTANARI; VIGNON, 2003; PONEDEL’KINA; KHAIBRAKHMANOVA; ODINOKOV, 2010, SU et al., 2013, PIERRE et al., 2017). A oxidação seletiva de hidroxilas primárias já foi realizada para diversos polissacarídeos, e utiliza o reagente *N*-oxil-2,2,6,6-tetrametilpiperidina (TEMPO) (EVIER et al., 1995; PEREZ et al., 2003; KATO et al., 2003; BRAGD et al., 2004).

3.2.1 Semissíntese de tosil polissacarídeos

A tosilação é uma reação muito utilizada em síntese orgânica e utiliza cloreto ou anidrido de *para*-toluenosulfonila na presença de base (DAS et al., 2004). O grupamento tosil é altamente reativo, e pode, por exemplo, ser substituído por halogênios, azida ou aminas (KURITA, 2001; GERICKE, et al., 2012).

Dessa forma, essa reação é bastante aplicada como estratégia de ativação de grupos hidroxilas em polissacarídeos. A busca, sobretudo por estratégias que alcancem regioseletividade para esta reação se mostram muito interessantes. Já foram realizadas reações de tosilação em vários polissacarídeos como celulose, quitina e amido (MORITA et al., 1994; KURITA et al., 2001; HEINZE; TALABA; HEINZE, 2000; GERICKE, et al., 2012) e, até nosso conhecimento, foram relatados quatro trabalhos de tosilação da agarose utilizando meios de reação homogêneos e heterogêneos (NILSSON; MOSBACH, 1980; BALLESTEROS; MONTERO; SINESTERRA, 1993; HEUKO, 2015; GERICKE; HEINZE, 2015).

Ballesteros, Montero e Sinisterra (1986) realizaram a tosilação da agarose em acetona e utilizando piridina como base. Neste trabalho o objetivo do uso do cloreto de tosila foi como agente ativante da agarose, que foi utilizada para imobilização de ligantes e proteínas, pela ligação covalente destas moléculas por deslocamento nucleofílico dos grupos tosila. Eles realizaram o acoplamento da agarose tosilada com a lisina e com a nuclease de *Staphylococcus aureus*. Os autores alcançaram, em condições otimizadas, 89 μmol de tosila por grama de gel seco de agarose, e conseguiram realizar o acoplamento aos ligantes desejados.

Anteriormente Nilsson e Mosbach (1980) também fizeram o acoplamento da agarose ativada por cloreto de tosila ao inibidor de tripsina de soja. Neste trabalho a reação de tosilação foi realizada em dioxano, utilizando piridina como base. Estes autores em condições otimizadas, alcançaram 1,15 mmol de tosila por grama de gel seco de agarose.

Em trabalho anterior (HEUKO, 2015) foi realizada a otimização da tosilação da agarose em meio aquoso heterogêneo, utilizando como base NaOH. A reação heterogênea foi realizada com base em reações de tosilação regioselectiva, bem-sucedidas em ciclodextrina (PETTER et al., 1990; Li et al., 2011). No trabalho realizado no nosso laboratório (HEUKO, 2015) o derivado tosila da agarose foi sintetizado com alta recuperação (97%) em meio aquoso básico e apresentou alto grau de substituição (DS:0,91, correspondentes a 2,97 mmol de tosila por grama de agarose). No entanto, a tosilação, apesar de preferencial no carbono 6 da unidade de β -D-galactopiranosose (DS :0,57 em G6), também apresentou a substituição no carbono 2 da unidade de 3,6-anidro- α -L-galactopiranosose (LA2).

Gericke e Heinze (2015) também realizaram a tosilação da agarose. Os autores otimizaram as condições de tosilação desta vez em solventes orgânicos, em meio homogêneo. Neste trabalho, vários solventes foram estudados para esta reação, como a dimetil acetamida (DMA), dimetil imidazol (DMI) e dimetil formamida (DMF). Apesar da excelente solubilidade da agarose em dimetil sulfóxido (DMSO) este solvente não foi testado por reagir com o cloreto de tosila e dificultar a tosilação (HEINZE, LIEBERT, KOSCHELLA, 2006), o que também foi observado em trabalho no nosso laboratório (HEUKO, 2015). No trabalho de Gericke e Heinze (2015) também foi observado que a presença de cloreto de lítio (LiCl) se mostrou eficiente para aumentar a solubilidade do polissacarídeo nos solventes DMA e DMI. Os autores observaram que a presença de LiCl, aumentava o grau de substituição (alcançando

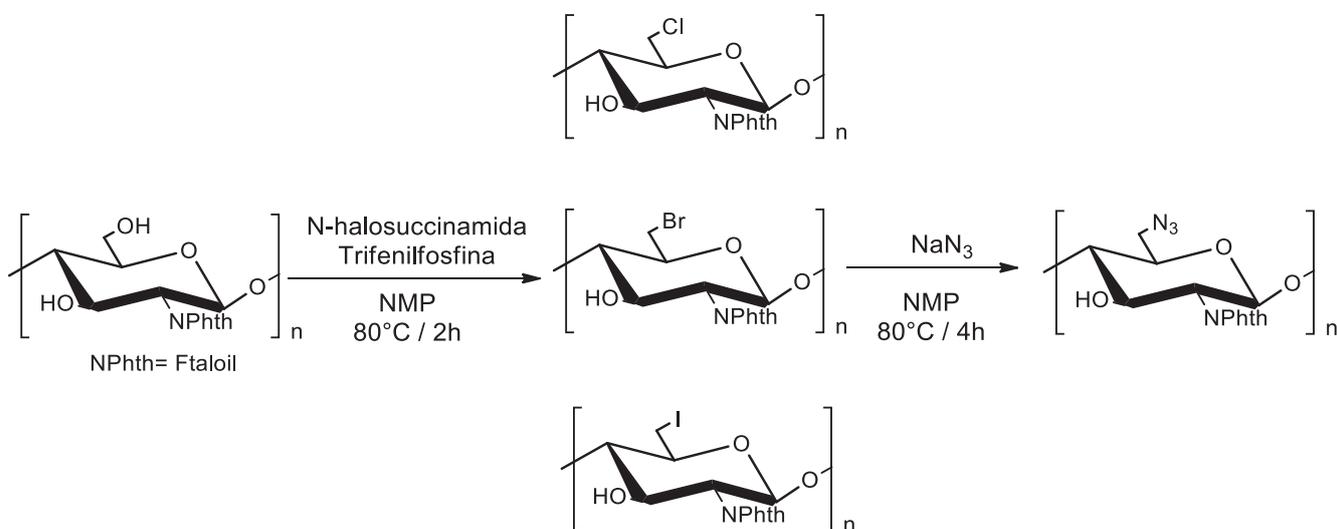
DS de 1,81), no entanto propiciava a entrada de grupos tosila em G6 e LA2, enquanto na ausência de LiCl a reação se mostrava regioseletividade para G6 atingindo um DS de até 0,72. Dessa forma os autores realizaram a tosilação regioseletiva da agarose alcançando um bom DS.

3.2.2 Semissíntese de azido polissacarídeos

Derivados azidos são importantes em síntese orgânica e apresentam estabilidade extraordinária frente a H₂O, O₂ e a maior parte das condições em síntese orgânica (ROSTOVTSEV; GREEN; FOKIN; SHARPLESS, 2002). Diversos trabalhos relataram a síntese de derivados azido de polissacarídeos tais como, amilose, pululan e quitosana (CIMECIOGLU, 1997, ZAMPANO, BERTOLDO, CIARDELLI, 2010, SATOH et al., 2006, FOX, EDGARD, 2012). O derivado azido pode ser sintetizado a partir de dois diferentes derivados, tosilados ou halogenados.

Na substituição da hidroxila por um halogênio espera-se gerar precursores mais eficientes em termos de reatividade e solubilidade em solventes orgânicos. Muitos dos métodos reportados envolvem a reação com *N*-halosuccinamidas e trifenilfosfina (PPh₃), obtendo-se alta seletividade a boa reatividade. No trabalho de Satoh et al (2006) o derivado azido foi produzido a partir de derivados halogenados da quitosana (FIGURA 4), que foram sintetizados usando cloro-, bromo- e iodo-succinamidas. Os autores estudaram a reação de substituição da azida de sódio com o derivado bromo, cloro e iodo em DMSO e DMF. Os parâmetros de reação testados foram as temperaturas de 40, 80 e 120°C e a adição de 5 e 10 equivalentes de azida de sódio. Neste trabalho, foi observado que o grau de substituição por grupo azido aumentava conforme aumentava a temperatura e os equivalentes de azida de sódio adicionados, no entanto a temperatura de 120°C degradava o polissacarídeo. Assim a condição ideal para esta reação foi a temperatura de 80°C e a adição de 10 equivalentes de azida de sódio.

FIGURA 4- ESQUEMA DE REAÇÃO PARA PRODUÇÃO DO DERIVADO AZIDO DA QUITOSANA ATRAVÉS DE DERIVADOS HALOGENADOS



FONTE: Adaptado de Satoh et al (2006)

A produção do derivado tosilado, para síntese do derivado azido também se mostra interessante, uma vez que grupamento tosil é um excelente grupamento de saída em reações de substituições nucleofílicas (GERICKE, et al., 2012). Para a agarose foram relatados dois trabalhos que produziram o derivado azido partindo do derivado tosilado (GERICKE, HEINZE, 2015, HEUKO, 2015). No trabalho de Gericke e Heinze (2015) e Heuko (2015) a agarose foi convertida ao derivado azido através da reação de substituição nucleofílica com a azida de sódio do derivado tosilado. Gericke e Heinze relataram a síntese do produto azido com DS de até 0,78. No entanto os autores não descreveram detalhes da síntese nem demonstraram a caracterização do produto sintetizado.

No nosso trabalho (HEUKO, 2015) a reação para produção do derivado azido foi estudada variando-se os solventes (DMSO e água) e tempo de reação (24 e 48h). A reação realizada em meio aquoso não apresentou formação de produto, o que provavelmente ocorreu devido a concorrência da água com a azida para substituição do grupo tosila. A reação em DMSO em 24h e 48h apresentaram resultados similares de formação de produto, sendo que em 48h houve menor rendimento. Assim, foi sintetizado o derivado azido da agarose em DMSO anidro à 80 °C sob fluxo de nitrogênio. A reação se mostrou seletiva para o Carbono 6 tosilado da unidade de β -D-galactopiranosose, permanecendo no produto ainda o grupo tosila ligado ao C2 do

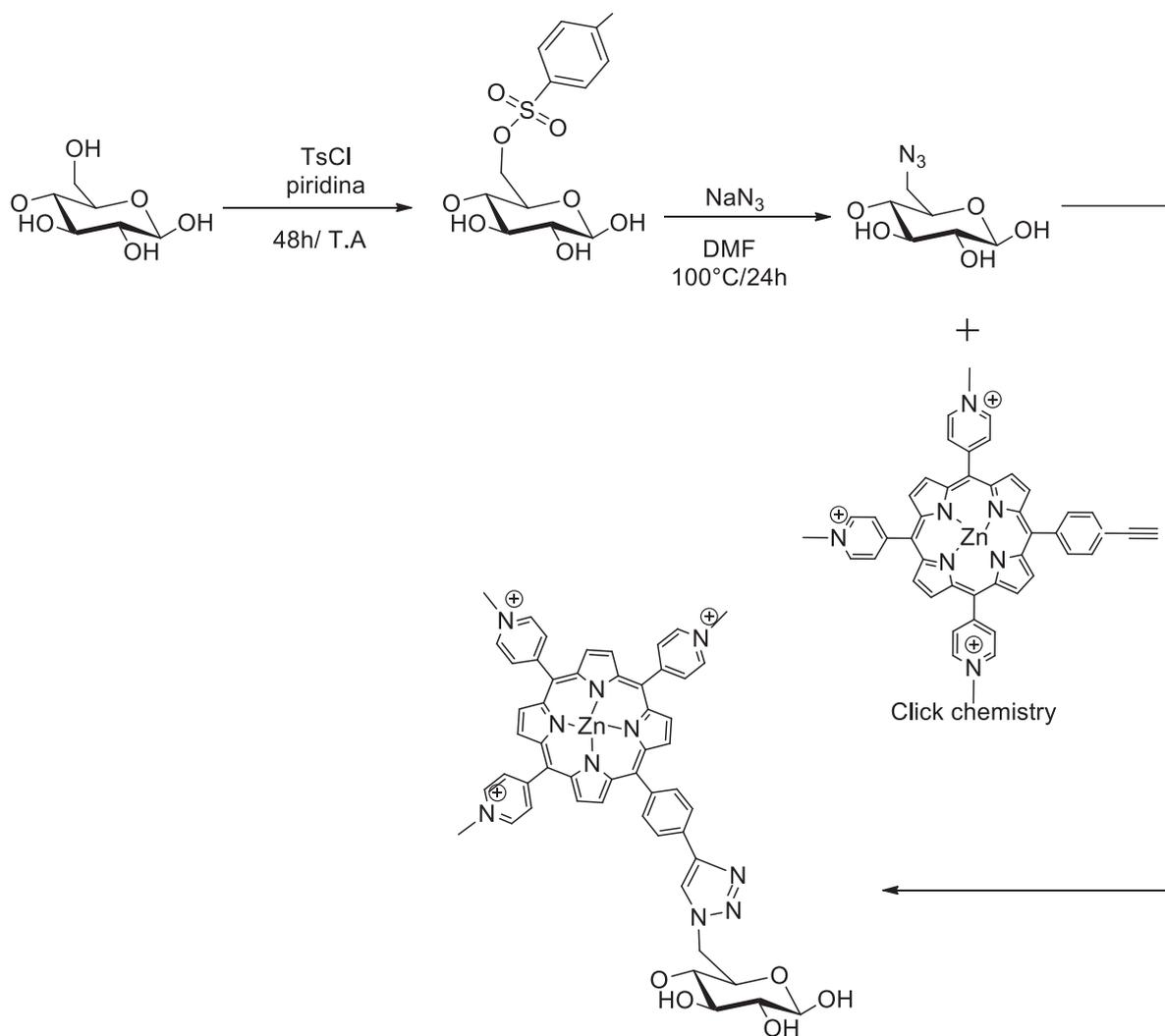
anel de 3,6-anidro- α -L-galactopiranosose (o que também foi relatado no trabalho de Gericke e Heinze, 2015). Este derivado foi caracterizado por ferramentas colorimétricas, RMN de ^1H e ^{13}C 1D e 2D e espectroscopia de infravermelho.

Uma das principais aplicações de azido polissacarídeos, é a utilização deste derivado para realização da *click chemistry*. A *click chemistry* por definição trata-se de reações que exigem condições simples e geram altos rendimentos, pouco subprodutos e que podem ser removidos por métodos simples (KOLB; FINN; SHARPLESS, 2001). A cicloadição azida-alcino catalisada por cobre é geralmente utilizada por ser uma reação extremamente quimioseletiva e pode ser utilizada para modificar biomoléculas, tais como polissacarídeos, através da funcionalização destes com o grupo azido e a ligação à outras moléculas funcionalizadas com terminal alcino (LIEBERT et al., 2006; LUTZ; ZARAFSHANI, 2008, MENG; EDGAR, 2015).

Os polissacarídeos obtidos a partir da *click chemistry* podem ter inúmeras aplicações, tais como dendrímeros, formadores de géis, liberadores controlados de drogas e na descoberta de novas drogas, sendo esta provavelmente a área da biociência em que o conceito *click* é mais amplamente aplicado (LUTZ; ZARAFSHANI, 2008, ELCHINGER et al., 2011). Vários trabalhos nos últimos anos relataram a utilização da *click chemistry* na modificação química de diferentes polissacarídeos, tais como dextranas e β -D-Glucanas como a celulose (LIEBERT et al., 2006; HASEGAWA et al., 2006; PAHIMANOLIS et al., 2010; NEGISHI et al., 2011, FEESE et al. 2011).

No trabalho de Feese et al. (2011) foi realizada a síntese do derivado azido da celulose a partir do derivado tosilado e este foi ligado à uma porfirina por *click chemistry* (FIGURA 5), formando um conjugado que foi estudado quanto à sua atividade fotodinâmica. O derivado conjugado mostrou excelente eficácia na inativação fotodinâmica do *Mycobacterium smegmatis* e *Staphylococcus aureus*, e uma baixa atividade contra *Escherichia coli*.

FIGURA 5 – SÍNTESE DO CONJUGADO CELULOSE-PORFIRINA



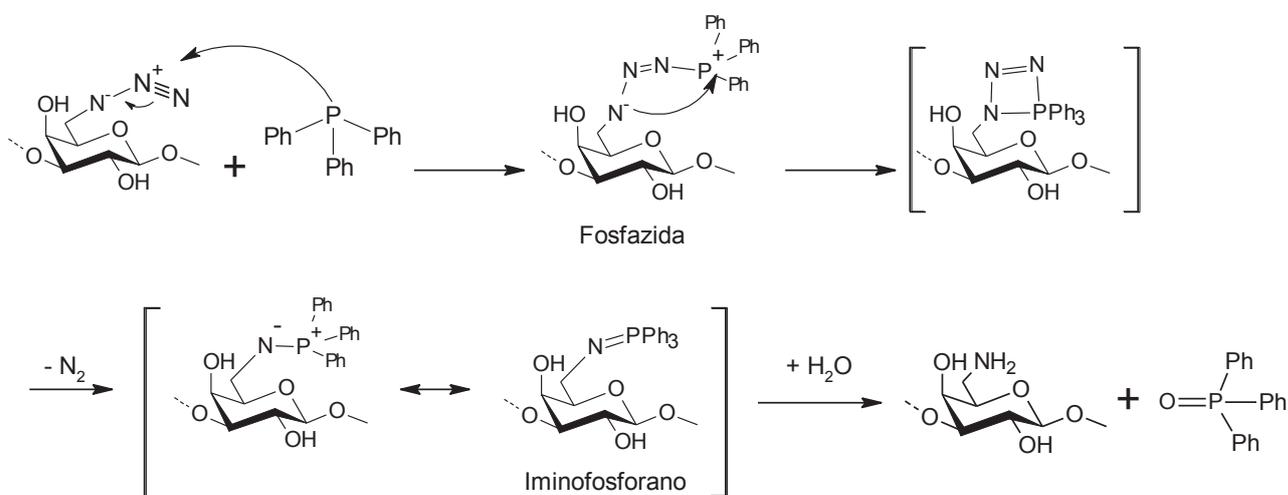
FONTE: Adaptado de Feese et al. (2011)

3.2.3 Semissíntese de amino polissacarídeos

Existem vários métodos de inserção de grupo amino no esqueleto de polissacarídeos, tais como a aminação a partir de aldeídos, via aminação redutiva, a substituição do grupo tosil por aminas e a redução do grupo azido à amino (TESHIROGI et al., 1979; LIU e BAUMMAN, 2002, HEUKO, 2015; YAICH et al., 2015). A conversão do grupo azido à amino pode ocorrer utilizando diferentes agentes redutores como o LiAlH_4 e a trifetilfosfina (LIU e BAUMMAN, 2002, FOX; EDGARD, 2012; HEUKO, 2015).

A rota utilizada para converter grupo azido em amino que envolve o tratamento com trifenilfosfina e água, se dá por uma reação denominada reação de Staudinger. Devido à suas condições amenas e alta seletividade, esta reação se mostra útil na síntese de polissacarídeos aminados (CIMECIOGLU et al., 1997, ROSTOVTSEV et al., 2002; FOX; EDGARD, 2012; HEUKO, 2015). No mecanismo proposto desta reação (FIGURA 6), a adição da trifenilfosfina no meio reacional acarreta a formação de um intermediário fosfazida. Este intermediário ao perder uma molécula de gás nitrogênio, forma um iminofosforano que é então hidrolisado pela água e produz o derivado amino e óxido de trifenilfosfina (FIGURA 4). Amino polissacarídeos derivados da amilose, celulose e agarose já foram produzidos com sucesso a partir dos respectivos derivados azidos utilizando a reação de Staudinger (CIMECIOGLU et al., 1997; FOX; EDGARD, 2012; HEUKO, 2015).

FIGURA 6 - MECANISMO DA REAÇÃO DE STAUDINGER PARA FORMAÇÃO DO DERIVADO AMINO DA AGAROSE



FONTE: Adaptado de Lin et al. (2005)

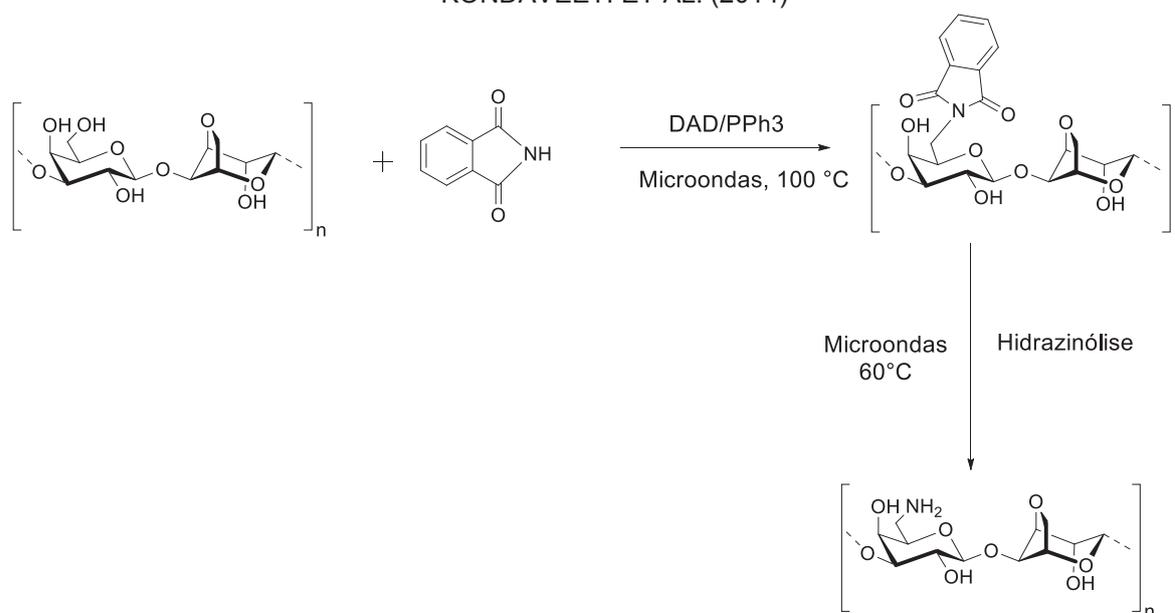
No trabalho de Fox e Edgard (2012) foi realizada a síntese da O-Acetil 6-Amino-6-deoxi-celulose. O derivado azido (produzido a partir de um derivado bromo) foi seletivamente reduzido com trifenilfosfina e água ao derivado amino, através de uma reação homogênea conduzida à temperatura ambiente. O derivado amino formado, no entanto, apresentou difícil purificação, uma vez que mesmo após diálise,

observava-se a presença de trifetilfosfina e óxido de trifetilfosfina (subproduto da reação) na amostra, sendo necessária uma purificação adicional com Sohxlet.

No nosso laboratório foi realizada a semissíntese da amino-agarose, também utilizando a redução de Staundiger do derivado azido (HEUKO, 2015). Neste trabalho também foi observado a formação deste subproduto e foi utilizada a purificação com Sohxlet. O produto sintetizado apresentou solubilidade muito baixa na maioria dos solventes testados. Dificuldades em solubilização de polissacarídeos amino-funcionalizados têm sido descritos e atribuídos a ligações de hidrogênio intermoleculares envolvendo os grupos amino (CIMECIOGLU et al., 1994; FOX e EDGAR, 2012; GERICKE e HEINZE, 2015).

A síntese do derivado C6-deoxi-amino agarose também foi realizada por Kondaveeti et al. (2014). Neste estudo este derivado foi sintetizado através da reação com a ftalimida, trifetilfosfina e azodicarboxilato de isopropila (DIAD), sob irradiação de microondas a 100 °C, formando a agarose-ftalimida, que em seguida sofreu hidrazinólise, com hidrato de hidrazina em reator de microondas a 60 °C, produzindo a 6-aminoagarose (FIGURA 7). Uma vez obtido este produto, este foi utilizado para produção de compostos fluorogênicos.

FIGURA 7 – ESQUEMA DE SÍNTESE DA C6-DEOXI-AMINOAGAROSE POR KONDAVEETI ET AL. (2014)



FONTE: Adaptado de Kondaveeti et al. (2014)

Amino polissacarídeos possuem propriedades mucoadesivas, hemostáticas e bacteriostáticas, promovem a abertura de junções intermediárias entre a célula epitelial, melhorando o transporte paracelular de drogas pela membrana biológica. Essas propriedades têm sido atribuídas à presença de grupamentos amino catiônico no esqueleto deste polissacarídeo, que pode interagir com moléculas aniônicas encontradas no muco e na superfície celular (SATO et al., 2006; FOX; EDGAR, 2012; ALI; AHMED, 2018). A carga positiva do polímero permite sua interação com ácidos nucleicos, negativamente carregados, formando um complexo polieletrólito que protege da degradação por nucleases. Além disso, a carga positiva também permite sua interação com as membranas celulares negativamente carregadas, levando a um aumento na interação celular, por isto este polissacarídeo apresenta papel importante em *gene delivery* (MACLAUGHLIN et al., 1998; JAYAKUMAR et al., 2010; SARANYA et al., 2011).

Além das aplicações biológicas, aminopolissacarídeos tem importante papel na área química, em que são usados por suas atividades catalíticas em reações importantes tais como reações aldólicas, similares à catalisada por aldolases (RICCI et al., 2010; GIOIA et al., 2013; RICCI et al., 2013 GONZALO et al., 2018).

3.2.4 Semissíntese de polissacarídeos sulfatados

Não existe um método universal para sulfatação descrito na literatura. A natureza química, o tipo de configuração das ligações glicosídicas, massa molar e outros fatores estruturais influenciam na eficiência da sulfatação. Mesmo na mesma classe de polissacarídeos, os resultados dependerão de vários parâmetros de reação, tais como: agente sulfatante, solvente, tempo e temperatura e a razão molar dos reagentes (MARUYAMA et al., 1998; MESTECHKINA, SHCHERBUKHIN, 2010).

Os primeiros agentes sulfatantes utilizados para polissacarídeos foram o cloreto de sulfurila, ácido sulfúrico e derivados como ácido clorosulfônico, ácido 1-piperidinossulfônico e ácido sulfâmico. Todos eles causaram despolimerização significativa por quebra das ligações glicosídicas dos polissacarídeos (BEDINI et al., 2017).

O ácido clorosulfônico é bastante utilizado como agente sulfatante de polissacarídeos. Para neutralizar seus efeitos na despolimerização do polissacarídeo, a piridina tem sido empregada como solvente nessas condições de reação. No entanto, ainda há relatos de degradação, bem como da dificuldade em eliminar a piridina do meio reacional por formação de ligação covalente desta com os terminais redutores dos polissacarídeos (PAPY-GARCIA et al. 2005; ARAÚJO et al., 2015).

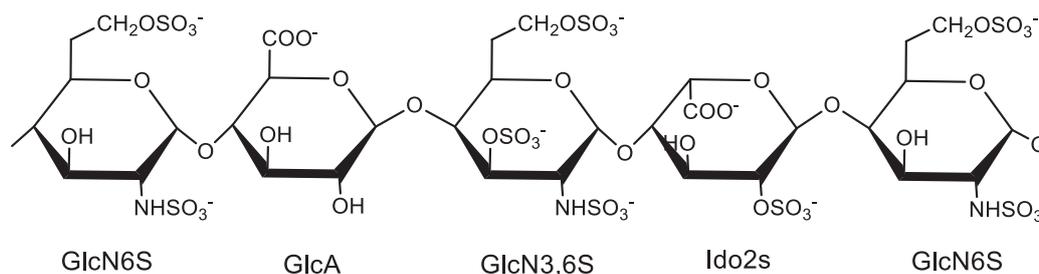
O uso de complexos de trióxido de enxofre com aminas (piridina, trietilamina, trimetilamino, *N,N*-diisopropiletilamina) ou amida (DMF) em solventes apróticos polares, como piridina, DMF, DMSO e DMAc, foi introduzido devido à estabilidade em altas temperaturas, natureza sólida à temperatura ambiente, facilidade de aquisição e manuseio e caráter ácido mais suave desses reagentes. Apesar de se mostrarem mais adequados para sulfatação de grupos alcoólicos em carboidratos, há relatos que estes promovem a despolimerização por normalmente apresentarem caráter ácido quando dissolvidos em solventes orgânicos (AL-HORANI; DESAI, 2010; ARAÚJO et al., 2015, BEDINI et al., 2017). O uso de 2-metil-2-buteno nas reações de sulfatação foi reportado para evitar a degradação de polissacarídeos promovida por ácidos (PAPY-GARCIA et al., 2005).

Reações de sulfatação são realizadas em polissacarídeos com o objetivo de expandir e dar novas propriedades biológicas para estas biomoléculas. Polissacarídeos contendo grupos sulfatos apresentam diversas atividades biológicas tais como anticoagulantes, anti-hiperlipidêmicas, antioxidantes, antivirais, antitumorais e imunomodulatórias (TALARICO et al., 2004; ZHOU et al., 2006; TISHER et al., 2006; ROCHA et al. 2007; STILES et al., 2008; GRASSAUER et al., 2008; LEIBBRANDT et al., 2010, ARAÚJO et al., 2013; BARDDAL et al., 2015).

A sulfatação de polissacarídeos é o método mais utilizado para sintetizar análogos da heparina, droga anticoagulante de referência. Isto se deve por esta droga ser um carboidrato, glicosaminoglicano heterogêneo, composto por uma sequência pentassacarídica específica constituída por unidades alternadas de $\rightarrow 4$ -ácido urônico-(1 \rightarrow 4)- α -D-glucosamina-(1 \rightarrow . O ácido urônico presente pode ser α -L-idurônico (IdoA), podendo estar sulfatado em C-2 (IdoA2S), ou β -D-glucurônico (GlcA). A α -D-glucosamina (GlcN) pode ser N-sulfatada (GlcNS), com ou sem sulfatação na posição 6 (6-O-GlcNS6S). Além disso GlcNS e GlcNS6S podem ser 3-O-sulfatadas (GlcNS3S e GlcNS3,6S). (RABENSTEIN, 2002; CASU; NAGGI; TORRI, 2015) (FIGURA 8).

O mecanismo de ação da heparina se dá pela interação com a antitrombina inativando enzimas da coagulação, tais como os fatores da coagulação X e mais significativamente a trombina. Esta interação aumenta em mais de 1000 vezes a atividade intrínseca da antitrombina (PETITOU; CASU; LINDAHL, 2003; MARUYAMA et al., 1998; MESTECHKINA; SHCHERBUKHIN, 2010)

FIGURA 8- SEQUÊNCIA PENTASSACARÍDICA DA HEPARINA



FONTE: A autora (2019)

Polissacarídeos sulfatados estudados, tanto de origem natural como semi-sintética, apresentam diferentes mecanismos de atividade anticoagulante, o que está intimamente relacionado à sua estrutura química (MESTECHKINA; SHCHERBUKHIN, 2010; FERNANDÈZ et al., 2013). Muitos destes biopolímeros sulfatados possuem estrutura heterogênea ramificada, o que dificulta sua introdução na prática clínica pois dificulta a padronização de preparações, interferindo potencialmente na reprodutibilidade dos resultados. Portanto, parece mais vantajoso produzir derivados sulfatados de polissacarídeos neutros e ácidos com uma composição constante e uma estrutura uniforme (MESTECHKINA; SHCHERBUKHIN, 2010).

Assim, polissacarídeos de estrutura mais homogênea, tais como a agarose, são fontes interessantes para potencial aplicação como anticoagulante, e facilitam o estudo de estrutura-atividade. A molécula neutra da agarose já foi sulfatada com o objetivo de investigar novas propriedades biológicas, tais como atividade antioxidante, anticoagulante e antitrombogênica (YOUPIING et al., 2012; LIANG et al., 2014; MATSUIRO et al., 2014).

No trabalho de Youping et al. (2012) foi realizada a sulfatação da agarose, objetivando dar uma atividade antitrombogênica a este polissacarídeo. A síntese da agarose sulfatada foi realizada com ácido clorosulfônico-piridina, tendo formaldeído

como agente dispersante. Três fatores, incluindo a razão de ácido clorosulfônico e agarose (2:1, 3:1, 4:1 (mL/g), tempo de reação (3 h, 4 h, 5 h) e temperatura (45 °C, 65 °C, 85 °C) afetaram o grau de substituição (DS) por grupo sulfato. No estudo foram caracterizadas duas frações, uma com DS de 0,17 e outra com DS de 0,43. Ambas apresentaram atividade antitrombogênica maior que a agarose nativa, ocorrendo melhora desta atividade com o aumento do DS das amostras.

Matsuhiro et al. (2014) também sulfataram a agarose, mas utilizaram o complexo trióxido de enxofre-piridina (SO₃-piridina) como agente sulfatante. Eles observaram sulfatação em G6, LA2 e G2 da agarose, e obtiveram uma molécula com 35,5 % de grupos sulfato (DS de aproximadamente 2). Os autores observaram, através do teste de tempo de tromboplastina parcial ativada que a agarose sulfatada apresentou boa atividade anticoagulante, em baixas concentrações, similares às apresentadas pela heparina.

3.2.5 Semissíntese de polissacarídeos seletivamente oxidados utilizando TEMPO

Uma das reações de grande interesse sintético é a oxidação de álcoois em compostos carbonílicos. Em geral estas reações podem ser realizadas em solventes orgânicos fornecendo aldeídos e cetonas ou em água, em que substratos que contêm hidroxilas são oxidados a ácido carboxílicos (CIRIMINNA; PAGLIARO, 2010).

A maioria dos oxidantes conhecidos são quimicamente não específicos e, portanto, capazes oxidar grupos OH primários e secundários de polissacarídeos. (PONEDEL'KINA; KHAIBRAKHMANOVA; ODINOKOV, 2010). A primeira oxidação seletiva de polissacarídeos foi descrita por Evier et al. (1995), utilizando quantidades catalíticas do reagente *N*-oxil-2,2,6,6-tetrametilpiperidina (TEMPO) e hipoclorito/brometo como co-oxidante, alcançando a oxidação seletiva de grupos OH primários na presença dos secundários (PONEDEL'KINA; KHAIBRAKHMANOVA; ODINOKOV, 2010).

A utilização do reagente de oxidação TEMPO tem sido apontada como um método seletivo, eficiente e bem controlado para oxidar hidroxilas primárias de polissacarídeos (EVIER et al., 1995; PEREZ et al., 2003; KATO et al., 2003; BRAGD et al., 2004). Sabe-se que o pH do meio reacional produz grande influência na seletividade da reação. Foi observado por Bailey et al (2007) que, sob condições

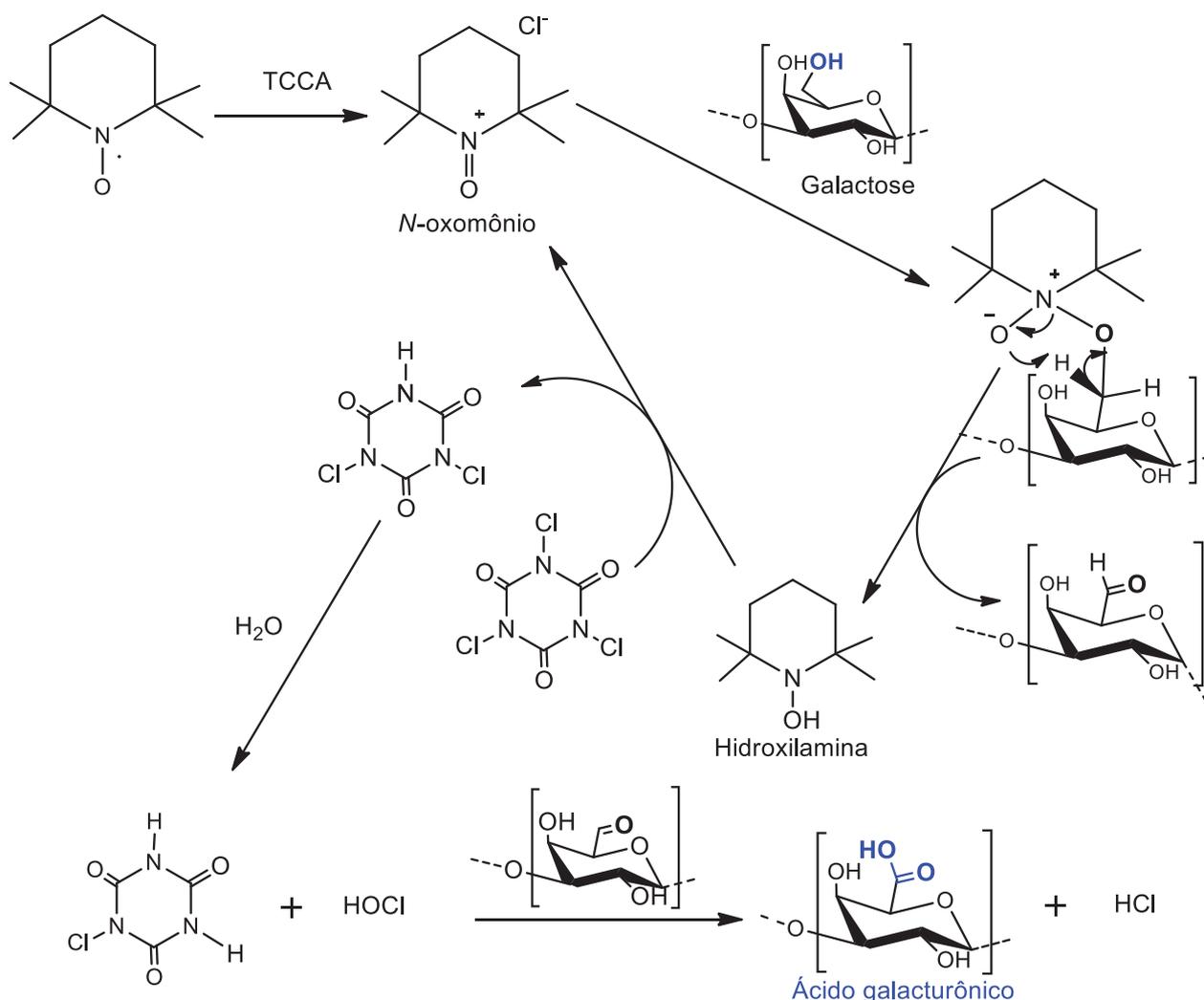
alcalinas, os álcoois secundários são muito mais lentamente oxidados que os álcoois primários, enquanto sob condições ácidas e / ou neutras ocorre o fenômeno oposto.

Este reagente faz parte da classe de compostos nitroxil ou radical nitróxido, que pode ser regenerado durante a reação na presença de um co-oxidante. Por isso, o reagente TEMPO pode ser adicionado em quantidades catalíticas no meio reacional, o que é interessante, sobretudo por se tratar de um reagente químico caro (ANGELIN et al., 2006; CIRIMINNA; PAGLIARO, 2010).

Diferentes co-oxidantes têm sido utilizados em reações de oxidação seletiva de diversos álcoois primários e secundários para regeneração do reagente TEMPO, tais como, os ácidos trihaloisocianúricos, O_2-Cu , hipoclorito de sódio ($NaClO$), clorito de sódio, ($NaClO_2$), bromito de sódio, ($NaBrO$), N-clorosuccinimida, $Cu(NO_3)_2$, $H_2O_2-HBr-MeReO_3$, IO_5 , peróxido em presença de prata, $K_3[Fe^{3+}(CN)_6]$, $PhICl_2$ (PONEDEL’KINA; KHAIBRAKHMANOVA; ODINOKOV, SANTOS, 2015)

Dentro da classe dos ácidos trihaloisocianúricos, o reagente TCCA (ácido triclorohisocianúrico) é um oxidante brando, simples e seguro, de baixo custo e em condições alcalinas pode ser utilizado em reações de oxidação (TILSTAM; WEINMANN, 2002). O TCCA atua reciclando o TEMPO adicionado na reação. O mecanismo deste processo (FIGURA 9) consiste na reação de uma quantidade catalítica de TCCA com o reagente TEMPO para formar íon *N*-oxoamônio. Este intermediário então oxida o álcool ao composto carbonila correspondente gerando a hidroxilamina. Esta, por sua vez, é oxidada pelo TCCA gerando novamente o derivado oxoamônio. Por fim, a hidrólise lenta do TCCA ou seus derivados forma ácido hipocloroso capaz de oxidar o aldeído a ácido carboxílico (LUCA et al., 2003).

FIGURA 9 – MECANISMO DE REAÇÃO DA OXIDAÇÃO DE UMA UNIDADE DE GALACTOSE A ÁCIDO GALACTURÔNICO UTILIZANDO OS REAGENTES TEMPO E TCCA

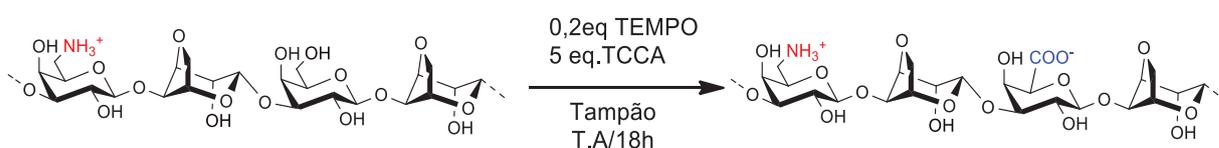


FONTE: A autora (2019)

Esse método é caracterizado por condições de reação brandas, ausência de metais de transição, subprodutos não tóxicos e fácil purificação, tornando-o ideal tanto para o laboratório quanto para grande escala (LUCA et al., 2003). O sistema TEMPO/TCCA já foi utilizado para oxidação seletiva de polissacarídeos dentro do nosso grupo de pesquisa. Santos-Fidêncio et al. (2019) realizaram a oxidação de carragenanas e a avaliação da atividade anticoagulante dos derivados oxidados e parcialmente oxidados. Neste trabalho, o sistema TEMPO/TCCA se mostrou efetivo para a oxidação deste polissacarídeo. A reação foi realizada substituindo-se a clássica titulação com NaOH (para manter o pH alcalino) por um sistema tampão HCO³⁻/CO³⁻², 1 M de pH 9,6.

Em trabalho anterior (HEUKO, 2015) também foi realizada a oxidação do derivado amino da agarose. Utilizando como base o trabalho de Santos (2015), partindo do derivado parcialmente aminado em C6 foi realizada a oxidação das hidroxilas em C6 livres, utilizando o sistema TEMPO/TCCA em sistema tampão $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_3^{2-}$, 1 M de pH 9,6, por 18 horas, com o objetivo de produzir uma molécula anfotérica e multifuncionalizada (FIGURA 10).

FIGURA 10– SEMISSÍNTESE DO DERIVADO AMINO-CARBOXILADO DA AGAROSE



FONTE: A autora (2019)

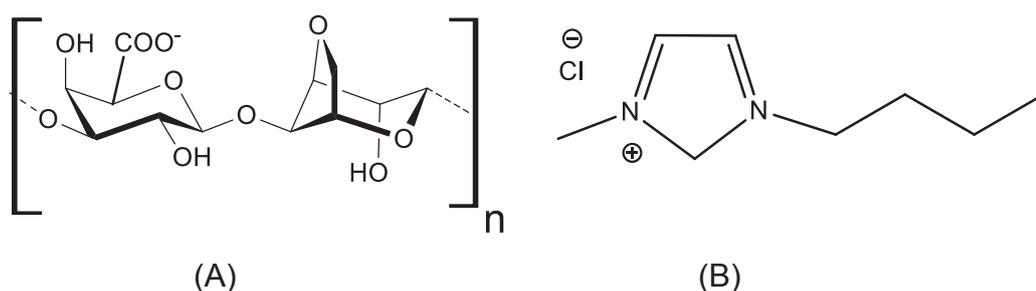
Para a agarose nativa, até nosso conhecimento, foram descritos dois estudos de oxidação, produzindo a unidade de ácido galacturônico, realizados por Su et al. (2013) e Forget et al. (2013). Todos estudos utilizaram um sistema TEMPO com NaBr e NaClO, mantendo o pH em 10 – 11 e com adição de solução de NaOH.

No estudo de Su et al. (2013) foi realizada a oxidação da hidroxila primária do carbono 6 da agarose e a ligação da dopamina nesta agarose carboxilada, como ferramenta para aumentar sua bioatividade. A oxidação foi realizada com o reagente de oxidação TEMPO, NaBr e NaClO em pH 10,5. O pH alcalino foi mantido através da adição de solução de NaOH 1 M e a reação foi realizada a temperatura ambiente por 2 h. A máxima oxidação alcançada foi de 30 % e foi observada uma despolimerização significativa do polissacarídeo (que ao fim apresentou a massa de 4 kDa). Tanto a agarose somente carboxilada, quanto a ligada à dopamina neste estudo não mostraram citotoxicidade e aumentaram a adesão celular.

Forget et al. (2013), realizaram a oxidação da agarose também utilizando o sistema TEMPO/NaBr e NaClO, em pH 10,8, mantido pela adição de NaOH 0,1 M. A reação se procedeu em banho de gelo (0°C) e foram sintetizadas moléculas com os graus de oxidação: 28%, 60% e 93%. A agarose carboxilada sintetizada neste trabalho, mais tarde deu origem a um novo estudo que tinha o objetivo da produção de fibras de agarose carboxilada com propriedades antibacterianas (FORGET et al., 2016).

No trabalho de Forget et al. (2016) as fibras a base de agarose carboxilada foram produzidas através de *electrospinning* com uma solução do líquido iônico cloreto de 1-butil-3-metilimidazólio, que apresentava atividade antimicrobiana (FIGURA 11). Foram testadas atividades contra os microrganismos *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), os quais obtiveram relevante inibição, sendo os melhores resultados contra *P. aeruginosa*. Para confirmar que a ação antimicrobiana era devido à presença do cloreto de 1-butil-3-metilimidazólio, foram realizados testes somente com a agarose carboxilada (como um controle) e não foi observada inibição bacteriana, demonstrando que a agarose carboxilada sozinha não possuía atividade antibacteriana.

FIGURA 11 - ESTRUTURAS QUÍMICAS DA AGAROSE CARBOXILADA (A) E DO CLORETO DE 1-BUTIL-3-METILIMIDAZÓLIO (B)



FONTE: A autora (2019)

Mais recentemente Arya et al. (2019) também utilizaram o derivado da reação de oxidação desenvolvida e descrita por Forget et al (2013) para aplicação em engenharia de tecidos, como um hidrogel para regeneração de tecido cartilaginoso. Neste trabalho, a agarose carboxilada foi ligada à uma sequência peptídica GGGGRGDSP de ligação à célula e foram avaliadas a rigidez e a diferenciação condrogênica dos hidrogéis.

Assim, além das modificações realizadas a fim de aumentar suas aplicabilidades na área da indústria a agarose também vem sendo estudada para aplicações na área biológica. Suas características físico-químicas propiciam a este polissacarídeo uma versatilidade de aplicações.

Derivados oxidados podem apresentar um efeito potencializador da atividade anticoagulante em comparação com o polímero nativo, indicando a importância deste grupo, que possivelmente atua aumentando a atividade por um efeito cooperativo com o sulfato (AGARWAL; DANISHEFSKY, 1986; NISHIMURA *et al.*, 1986; CARVALHO *et al.*, 2018). No entanto, a presença da carboxila e o efeito anticoagulante de polissacarídeos sulfatados está intimamente relacionado com o padrão e posição de sulfatação nem sempre apresentando esse efeito potencializador da atividade anticoagulante (SANTOS-FIDÊNCIO *et al.* 2019), demonstrando a importância de estudos que relacionam estrutura química e atividade biológica.

3.3 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE AMINOPOLISSACARÍDEOS

3.3.1 Bactérias e antimicrobianos

Microrganismos foram os primeiros organismos a colonizar a terra há cerca de 3,5 milhões de anos. São seres vivos que apresentam estruturas simples, capazes de desenvolver comportamentos bastante complexos. Estão presentes nos mais diversos habitats, apresentando-se nos ambientes aquosos, tanto na forma planctônica (em suspensão e dispersos no meio aquoso) como na forma sésil (aderidos a superfícies sólidas sob a forma de biofilmes) (COSTERTON *et al.*, 1995; DJERIBI, 2012; MIAZDAL, 2014).

Dentro da classe dos microrganismos encontram-se as bactérias, arqueas, fungos e protozoários. As bactérias são organismos procariotos, unicelulares que se reproduzem por divisão assexuada. A parede celular bacteriana é complexa, podendo apresentar uma camada espessa de peptidoglicano, nas bactérias gram positivas, e uma parede celular com uma camada fina de peptidoglicano e uma membrana externa sobreposta nas bactérias gram negativas. Dentre as bactérias mais patogênicas, encontram-se as bactérias gram negativas *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* e a bactéria gram positiva *Staphylococcus aureus* (MURRAY *et al.*, 2006; ANANIAS, YANO, 2008; DEMAIN, SANCHEZ, 2009; MIZDAL, 2014).

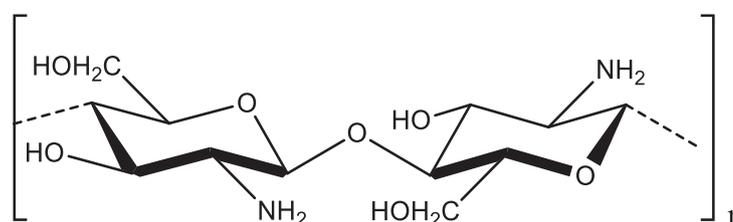
Para sobreviver em um ambiente específico, as bactérias devem responder a vários estresses. Na atualidade, a resistência bacteriana adquirida é descrita em praticamente todas as espécies de bactérias. A resistência bacteriana envolve mecanismos genéticos e bioquímicos variados e permite que as bactérias sobrevivam

à condições tóxicas. Como uma condição de estresse, as bactérias podem ser expostas a produtos antimicrobianos que podem atuar como uma pressão seletiva para o desenvolvimento de resistência. O surgimento progressivo de bactérias patogênicas resistentes aos antimicrobianos tornou-se uma preocupação de caráter global (TAVARES, 2000; SIMÕES, BENNETT e ROSA 2009; CANTAS et al., 2013; ALVES, 2014).

A descoberta e a introdução de agentes antimicrobianos na clínica médica são considerados um dos maiores avanços da medicina no século 20 que revolucionou o tratamento de infecções bacterianas (CANTAS et al., 2013). Hoje, devido ao mecanismo de resistência microbiana, existe uma busca contínua por agentes antibacterianos. Agentes antibacterianos são agentes químicos que inibem o crescimento do microrganismo (bacteriostáticos) e/ou que causam sua morte (bactericidas) (NGO, OKOGUN e FOLK, 2013; ALVES, 2014). A pesquisa por novas substâncias com ação antibacteriana tem aumentado em diferentes setores da indústria, como na área farmacêutica, de alimentos e de cosméticos.

A busca de substâncias com atividades antibacterianas tem direcionado a atenção sobre os produtos naturais, especialmente os de origem microbiana e de espécies vegetais (AYRES et al., 2008; ALVES, 2014). Na classe dos polissacarídeos, a quitosana é um aminopolissacarídeo formado por unidades de (1→4)-β-D-glucosaminopiranosose (FIGURA 12), que se distingue dos demais, dentre suas inúmeras características, por apresentarem atividades relevantes contra diversos tipos de bactérias e fungos (RABEA et al., 2003; SILVA et al., 2006; GOY et al., 2009).

FIGURA 12 – ESTRUTURA QUÍMICA DA QUITOSANA



FONTE: A autora (2019)

3.3.2 Atividade antimicrobiana da quitosana

A atividade antimicrobiana de aminopolissacarídeos, como a quitosana, é explicada principalmente por seus grupos amino e sua natureza catiônica. Acredita-se que os grupos amino destes polissacarídeos, em contato com fluidos biológicos, são protonados e se ligam a grupos aniônicos da membrana celular de microrganismos, através de interação eletrostática resultando na aglutinação das células microbianas, inibindo seu crescimento, ou na lise celular (RABEA et al., 2003; GOY et al., 2009).

Recentemente, estudos mostram que o mecanismo da atividade antimicrobiana da quitosana também está relacionada às características da membrana do microrganismo e às características físico-químicas do polissacarídeo. A quitosana carregada também pode interagir com nutrientes essenciais, interferindo no crescimento microbiano. No entanto, sabe-se que outros fatores estão também relacionados com este mecanismo de inibição como: propriedades físico-químicas do polímero, sua massa molar e as características da membrana do microrganismo (JIA et al., 2001; SILVA et al. 2006; GOY et al. 2016).

Assim, bactérias gram positivas e negativas possuem diferentes interações com o polissacarídeo e os efeitos da quitosana são distintos nos dois tipos de bactérias. Feng-Zhu e Zheng (2003) demonstraram que a atividade antimicrobiana contra bactérias gram-negativas é maior quanto menor a massa molar da quitosana, enquanto para bactérias gram-positivas ocorre o inverso, a atividade antimicrobiana aumenta com maior a massa molar do polímero. No caso das gram-positivas, a hipótese é que quitosana de alta massa molar forma películas ao redor da célula que acabam por inibir a absorção de nutrientes, enquanto que quitosana de baixa massa molar penetra mais facilmente em bactérias gram-negativas, causando distúrbios no metabolismo desses microrganismos (FHENG-ZHU; ZHENG, 2003; SILVA et al., 2006).

Devido às estas propriedades antimicrobianas, a quitosana se mostra como um biomaterial promissor nas áreas médica e odontológica. Este polissacarídeo vem sendo utilizado em odontologia, como por exemplo creme dental (com efeito antimicrobiano sobre biofilme dental), no tratamento das cáries, periodontites e aftas (VERKAİK et al., 2011; PIGNATELLO et al., 2009; JOTHI et al., 2009; KEEGAN et al., 2012).

A aderência de bactérias orais na superfície do dente leva à formação da placa bacteriana. Acredita-se que a adesão entre as bactérias e a superfície dentária seja decorrente de interações eletrostáticas e hidrofóbicas. Grupos amina positivamente carregados de derivados de quitosana podem atuar ativamente contra essas interações e prevenir a formação de placa bacteriana (SENEL; MCCLURE, 2006; WIECKIEWICZ et al., 2017; AHSAN et al., 2018).

Apesar da quitosana ser uma molécula versátil que apresenta muitas aplicações, sua atividade antimicrobiana têm sido limitada devido a sua baixa solubilidade em pHs acima de 6,5 e problemas como baixa resistência mecânica e perda de integridade estrutural, o que restringe seus usos para aplicações como suportes em engenharia de tecidos, por exemplo (LIM, HUDSON, 2004; VERLEE, MINCKE e STEVENS, 2017; WEI et al., 2019). Assim, muitos trabalhos visam modificar a quitosana a fim de aumentar sua solubilidade e aplicações. Além disso, na tentativa de mimetizar e aumentar as propriedades biomédicas da quitosana, muitos pesquisadores têm modificado polissacarídeos neutros para incorporar grupamentos amino (FOX; EDGAR, 2012).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

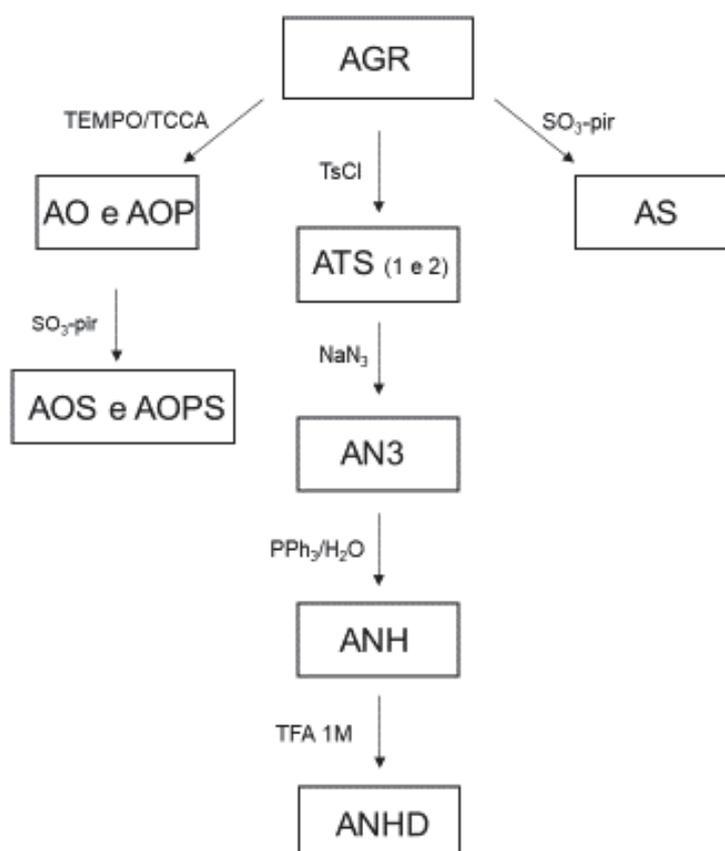
4.1 OBTENÇÃO DO POLISSACARÍDEO

O polissacarídeo utilizado durante o trabalho é uma agarose comercial obtida da empresa Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA).

4.2 MODIFICAÇÕES QUÍMICAS NA AGAROSE

Partindo-se da agarose comercial reduzida (AGR) foram sintetizados os derivados modificados seguindo o fluxograma apresentado na figura 13.

FIGURA 13 –OBTENÇÃO DOS DERIVADOS MODIFICADOS DA AGAROSE.



FONTE: A autora (2019)

4.2.1 Redução das unidades terminais redutoras com NaBH₄

5,0 g de agarose (16 mmol, onde 1 mol de agarose equivale a 306 g e corresponde diade repetitiva da unidade dissacarídica) foram dissolvidos em 250 mL de água destilada a 90 °C. Então, a solução foi resfriada e em banho de gelo, foram adicionados 20 mmol de NaBH₄, com auxílio de bastão de vidro para agitação. A solução gelificada foi deixada *overnight* a temperatura ambiente. Após o fim da reação o pH foi reduzido de 10,0 para 4,5, com ácido acético glacial. A agarose reduzida foi então dispersa em água e submetida à diálise contra água deionizada para eliminação do excesso de NaBH₄. Após diálise a solução foi concentrada e liofilizada, obtendo-se 3,67 g de agarose reduzida (AGR).

4.2.2 Semissíntese do derivado tosil da agarose (ATS1)

4,0 g (13 mmol) de agarose reduzida foram solubilizados em 400 mL de água a 90 °C, sob agitação. A solução foi resfriada a 30 °C e em seguida foram adicionados, gota a gota 5,88 g (147 mmol) de NaOH dissolvidos em 19,6 mL de água e 24,8 g 130 mmol) de cloreto de tosila (TsCl) dissolvidos em 73,6 mL de acetonitrila. A mistura heterogênea resultante foi agitada a 30 °C por 4 horas e etanol (1,2 L, 3 vezes volume) foi adicionado ao meio reacional. O precipitado foi recolhido por filtração, lavado com etanol, dialisado contra água deionizada em membrana de 12-14 KDa, concentrado em rotaevaporador, congelado e liofilizado, gerando 3,67 g do derivado tosil da agarose (ATS1).

4.2.3 Semissíntese do derivado tosil da agarose (ATS2)

2,9 g (9,5 mmol) de agarose reduzida foram solubilizadas em 145 mL de dimetil acetamida anidra (DMAa) a 100°C, por 30 minutos. A solução foi resfriada a 30°C e em seguida foram adicionados, gota a gota, 10,6 mL (76 mmol) de trietilamina e então 7,7g (47,5 mmol) de cloreto de tosila (TsCl). A mistura resultante foi agitada a 30°C por 2 horas e etanol (435 mL, 3 vezes volume) foi adicionado ao meio reacional. O precipitado foi recolhido por filtração, lavado com etanol, dialisado contra água deionizada, concentrado em rotaevaporador, congelado e liofilizado, gerando 8,6 g de

produto. Para eliminar o tosil remanescente foi realizada ainda purificação adicional, através da diálise contra etanol, em membrana de 12-14 KDa. Foram realizadas 4 diálises sequenciais, utilizando 300 mL de etanol cada. A solução precipitada, retida em membrana, foi rotaevaporada para eliminação do etanol e o produto foi por fim liofilizado gerando 4,7 g do derivado tosil da agarose (ATS2).

4.2.4 Semissíntese do derivado azido da agarose (AN3)

3,0 g (6,5 mmol) do derivado tosil ATS2 foram solubilizados em 180 mL de DMSO anidro, a 80 °C, sob agitação. Em seguida, foram adicionados 3,69 g (45,5 mmol) de NaN₃ ao meio reacional. A reação foi agitada em atmosfera de argônio, a 80 °C por 24 horas, e então etanol (540 mL, 3 vezes volume) foi adicionado ao meio reacional. A mistura heterogênea foi centrifugada a 5000 rpm por 20 minutos. O material sólido recolhido foi dialisado contra água deionizada, em membrana de 12-14 KDa, concentrado em rotaevaporador, congelado e liofilizado gerando 1,40 g do derivado azido da agarose (AN3).

4.2.5 Semissíntese do derivado amino da agarose (ANH)

800 mg (2,3 mmol) do derivado azido da agarose AN3 foram solubilizados em 48 mL de DMF a 80°C, sob agitação. A solução foi resfriada a 30°C, e então, foram adicionados 0,8 mL de água deionizada, gota a gota, e 1,81 g (6,9 mmol) de trifetilfosfina (PPh₃). A reação procedeu-se sob agitação magnética, a 30°C por 24 horas. O produto foi dialisado contra etanol, em membrana de 12-14 KDa, através de 4 diálises sequenciais, utilizando 300 mL de etanol cada. A solução precipitada, retida em membrana, foi rotaevaporada para eliminação do etanol e o produto foi liofilizado gerando 1,04 g do derivado. Para eliminar a trifetilfosfina e óxido de trifetilfosfina remanescente foi realizada ainda purificação adicional. O material sólido obtido após liofilização foi extraído em aparelho de Soxhlet com etanol (300 mL) por 24 horas. O material sólido foi seco em capela a temperatura ambiente, e então liofilizado gerando por fim 570 mg do derivado amino (ANH).

4.2.6 Curva de hidrólise ácida parcial da agarose reduzida (AGR) e do derivado amino da agarose (ANH)

50 mg do derivado amino da agarose (ANH) e da agarose reduzida (AGR) foram suspensos em 4,5 mL de água à 90°C, sob agitação. À solução resfriada à 65°C foram então adicionados 0,5 mL de ácido trifluoroacético (TFA) 1 mol/L e a solução foi deixada sob agitação magnética. Alíquotas de 0,2 mL do meio (aproximadamente 0,2 mg do polissacarídeo) foram retiradas, em triplicata, nos tempos: 15, 30, 45 e 60 minutos e adicionadas em tubos de ensaio. Foram adicionados 1,3 mL de água deionizada aos tubos (perfazendo um volume total de 1,5 mL de solução) e foi determinada a concentração de açúcar redutor em cada tempo, utilizando a metodologia do DNS, descrita no item 4.5.14.

4.2.7 Hidrólise ácida parcial do derivado amino da agarose (ANH)

365 mg do derivado amino da agarose ANH foram suspensos em 32,85 mL de água à 90°C, sob agitação. À solução resfriada à 65°C foram então adicionados 3,65 mL de ácido trifluoroacético (TFA) 1 mol/L. A hidrólise se procedeu por 20 minutos, à 65°C, sob agitação magnética. Após este tempo, foram adicionados 128 mg de NaBH₄ e a solução foi agitada por mais 15 minutos. A solução foi então neutralizada com ácido acético glacial e dialisada em membrana de 1Kda, contra água deionizada, para eliminar o excesso de NaBH₄. Em seguida o produto foi novamente dialisado em membrana de 12-14 KDa. O produto de diálise foi por fim concentrado e liofilizado gerando 127 mg do derivado amino da agarose despolimerizada (ANHD).

4.2.8 Semissíntese do derivado sulfatado da agarose (AS)

200 mg (0,65 mmol) de agarose foram solubilizados em 40 mL de DMF anidro, a 100 °C. A solução foi resfriada a 30°C e em seguida foram adicionados 4 mL (12,4 mmol) de 2M2B e então 2 g (13 mmol) de complexo trióxido de enxofre-piridina (SO₃-Py). A mistura resultante foi agitada a 30 °C por 24 horas. Após este tempo, a reação foi interrompida resfriando-se a mistura em banho de gelo e neutralizadas com 20 mL de solução de bicarbonato de sódio 1,0 mol/L. Etanol (180 mL, 3 vezes volume) foi então adicionado ao meio reacional. O precipitado foi centrifugado a 5000 rpm por 20

minutos. Após centrifugação, o precipitado foi dialisado, primeiramente contra NaCl 1 mol/L e posteriormente contra água deionizada, e o produto de diálise foi congelado e liofilizado, para obtenção de 181 mg do derivado parcialmente oxidado e sulfatado da agarose (AS).

4.2.9 Semissíntese do derivado C6 oxidado da agarose (AO)

1 g (3,3 mmol) de agarose foram solubilizados em 150 mL de água destilada aquecida a 90°C, sob agitação. A solução resultante foi resfriada aos poucos e então foram adicionados mais 350 mL de solução tampão de NaHCO₃/Na₂CO₃, de pH 9,5. Em banho de gelo foram adicionados 101,9 mg (0,65 mmol) de TEMPO e 3,72 g (16 mmol) de TCCA. A solução foi agitada inicialmente em banho de gelo e então foi deixada a temperatura ambiente por 6 horas. Em seguida foram adicionados 2,8 mL de etanol e 1,23 g de NaBH₄. A solução resultante foi agitada por 30 minutos e neutralizada com ácido acético até pH 7. A mistura foi dialisada contra água deionizada, concentrada em rotaevaporador, congelada e liofilizada, gerando 672 mg do derivado oxidado da agarose AO.

4.2.10 Semissíntese do derivado parcialmente oxidado em C6 da agarose (AOP)

500 mg (0,65 mmol) de agarose foram solubilizados em 100 mL de água destilada aquecida a 90°C, sob agitação. A solução resultante foi resfriada aos poucos e então foram adicionados mais 150 mL de solução tampão de NaHCO₃/Na₂CO₃, de pH 9,5. Em banho de gelo foram adicionados 51 mg (0,33 mmol) de TEMPO e 1,89 g (8 mmol) de TCCA. A solução foi agitada inicialmente em banho de gelo e então foi deixada a temperatura ambiente por 3 horas. Em seguida foram adicionados 1,42 mL de etanol e 308 mg de NaBH₄. A solução resultante foi agitada por 30 minutos e neutralizada com ácido acético até pH 7. A mistura foi dialisada contra água deionizada, concentrada em rotaevaporador, congelada e liofilizada, gerando 378 mg do derivado parcialmente oxidado da agarose (AOP).

4.2.11 Semissíntese do derivado parcialmente oxidado em C6 e sulfatado (AOPS)

300 mg da amostra AOP foram solubilizados em 60 mL de água destilada, seguida da adição de 3 g de resina catiônica Amberlite IR-120 (Synthe) na forma H⁺ (1 mg de carboidrato/10 mg de resina), sob agitação magnética a 20 °C, por 45 minutos (pH entre 1 e 2). A solução em seguida foi filtrada e o filtrado foi neutralizado com trietilamina até pH 7 e liofilizado para obtenção de 276 mg amostra na forma de sal de trietilamônio. Para reação de sulfatação 200 mg (0,65 mmol) de agarose parcialmente oxidada na forma de sal foram solubilizados em 40 mL de DMF anidro, a 100 °C. A solução foi resfriada a 30 °C e em seguida foram adicionados 4 mL (12,4 mmol) de 2M2B e então 2 g (13 mmol) de complexo trióxido de enxofre-piridina (SO₃-Py). A mistura resultante foi agitada a 30 °C por 24 horas. Após este tempo, a reação foi interrompida resfriando-se a mistura em banho de gelo e neutralizada com 20 mL de solução de bicarbonato de sódio 1,0 mol/L. Etanol (180 mL, 3 vezes volume) foi então adicionado ao meio reacional. O precipitado foi centrifugado a 5000 rpm por 20 minutos. Após centrifugação, o precipitado foi dialisado, primeiramente contra NaCl 1 mol/L e posteriormente contra água deionizada, e o produto de diálise foi congelado e liofilizado, para obtenção de 81 mg do derivado parcialmente oxidado e sulfatado da agarose (AOPS).

4.2.12 Semissíntese do derivado oxidado em C6 e sulfatado (AOS)

100 mg da amostra AO foram solubilizados em 20 mL de água destilada, seguida da adição de 1 g de resina catiônica Amberlite IR-120 (Synthe) na forma H⁺ (1 mg de carboidrato/10 mg de resina), sob agitação magnética a 20 °C, por 45 minutos (pH entre 1 e 2). A solução em seguida foi filtrada e o filtrado foi neutralizado com trietilamina até pH 7 e liofilizado para obtenção de 90 mg da amostra na forma de sal de trietilamônio. Para reação de sulfatação, 70 mg (0,2 mmol) de agarose oxidada na forma de sal foram solubilizados em 14 mL de DMF anidro, a 100 °C. A solução foi resfriada a 30 °C e em seguida foram adicionados 1,4 mL (4,3 mmol) de trietilamina e então 702 mg (4,6 mmol) de complexo trióxido de enxofre-piridina (SO₃-piridina). A mistura resultante foi agitada a 30 °C por 24 horas. Após este tempo, a reação foi interrompida resfriando-se a mistura em banho de gelo e neutralizada com 7 mL de solução de bicarbonato de sódio 1,0 mol/L. Etanol (63 mL, 3 vezes volume)

foi então adicionado ao meio reacional. O precipitado foi centrifugado a 5000 rpm por 20 minutos. Após centrifugação, o precipitado foi dialisado, primeiramente contra NaCl 1 mol/L e posteriormente contra água deionizada, e o produto de diálise foi congelado e liofilizado, para obtenção de 46 mg do derivado oxidado e sulfatado da agarose (AOS).

4.2.13 Preparo da resina catiônica para formação dos sais de trietilamônio e piridônio

Para a formação do sal de trietilamônio e piridônio das amostras, inicialmente foi preparada a resina na forma de H⁺. Para isto, 1 g de resina catiônica Amberlite IR-120 (Synhte) foram adicionadas à uma solução de 20 mL de HCl 1 mol/L e agitada durante 2 horas. Então a resina foi lavada com água destilada até pH da água deionizada e seca em estufa a 40 °C.

4.3 Quantificação do grau de substituição dos derivados tosil, azido e amino por RMN de ¹H

O grau de substituição por grupos tosil (DS_{tosil}), grupos azido (DS_{azido}) e grupos amino (DS_{amino}) por RMN de ¹H. Os espectros foram adquiridos com ângulo de pulso de 30°; tempo de aquisição de 8,160 s; tempo de relaxamento de 2,0s e número de *scans* de 256 (Tojo & Prado, 2003). Os dados foram analisados no software Bruker Topspin e as DSs foram calculados de acordo com as Equações 1, 2 e 3:

$$DS_{\text{tosyl}} = (A_{\text{Ph}}/4) / LA1 \quad (1)$$

$$DS_{\text{azido}} = G5_{\text{az}}/LA1 \quad (2)$$

$$DS_{\text{amino}} = (G6_{\text{amino}}/2) / LA1 \quad (3)$$

Em que:

A_{Ph} representam as áreas integradas de picos aromáticos correspondentes aos grupos tosil em 7.89–8.02 e 7.51–7.65 ppm.

G_{5az} representa a área integrada do H5 das unidades da Galp em 3,80 ppm.

O $G6_{\text{amino}}$ representa a área integrada do H6 das unidades da Gal ρ em 3,36 ppm.

LA1 representa a área integrada do pico anomérico correspondente às unidades 3,6-anidro- α -L-Gal ρ em 5,20 ppm.

4.4 Determinação do grau de oxidação dos derivados oxidados da agarose por RMN de ^1H - ^{13}C HSQC

$$\text{Grau de oxidação} = \frac{100 \times \text{GU5}}{(\text{G5} + \text{GU5})} \quad (4)$$

Em que:

G5= Área integrada da correlação relativa ao $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ correspondentes ao C5/H5 do anel de β -D-Galactopiranosose em 77,4/3,72 ppm.

GU5 = Área integrada da correlação relativa ao $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ correspondentes ao C5/H5 da unidade de β -D-Galactopiranosidurônico em 77,7/4,16 ppm.

4.5 MÉTODOS ANALÍTICOS

4.5.1 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de ressonância magnética nuclear 1D e 2D foram obtidos com o espectrômetro BRUKER Avance DRX 400 operando na frequência base de 400 MHz para os núcleos de ^1H e 100 MHz para os núcleos de ^{13}C . Previamente às análises, cada amostra foi solubilizada em água deuterada (D_2O), congelada e liofilizada. As amostras foram solubilizadas nos solventes $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ e D_2O e colocadas em tubos de 5 mm de diâmetro para análise à temperatura de 70 °C. Os deslocamentos químicos foram medidos utilizando acetona como padrão interno ($\delta = 2,21$ ppm para ^1H e $\delta = 32,69$ ppm para ^{13}C) em amostras solubilizadas em D_2O , e utilizando $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ como padrão interno ($\delta = 2,63$ ppm para ^1H e $\delta = 42,01$ ppm para ^{13}C) em amostras solubilizadas neste solvente (VAN DE VELDE; ROLLEMA, 2008). Os espectros foram analisados com o auxílio dos programas TOPSPIN.

4.5.2 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier e reflectância total atenuada (ATR/FTIR)

As análises de infravermelho foram realizadas no Departamento de Farmácia da UFPR no espectrômetro Bruker Optics, modelo Alpha, incorporado a transformada de Fourier, com acessório de reflectância total atenuada. Para as análises foram pesadas aproximadamente 3 mg das amostras e em seguida estas foram liofilizadas e lidas no aparelho. Os espectros foram analisados utilizando o programa OPUS 6.5.

4.5.3 Cromatografia Gás-Líquido com detector de ionização em chama (GLC-FID)

A composição monossacarídica foi determinada pela hidrólise reductiva do polissacarídeo, utilizando uma quantidade extra do complexo redutor borane 4-metilmorfolina, a fim de evitar a destruição da unidade de 3,6-anidrogactose. Os monossacarídeos foram derivatizados em acetatos de alditol por acetilação (Stevenson & Furneaux, 1991; Falshaw & Furneaux, 1994; Jol, Neiss, Penninkhof, Rudolph e De Ruiten, 1999). As amostras foram analisadas com um cromatógrafo GLC-FID (Trace GC Ultra, Thermo Electronic Corporation) equipado com uma coluna capilar DB-225 (30 m × 0,25 mm). O equipamento foi programado para funcionar a 100 °C por 1 min, depois de 100 a 230 °C a 60 °C/min, usando hélio como gás de arraste a uma vazão de 1 mL/min. Os cromatogramas foram analisados e integrados em software Saturn Workstation 5.1. Fatores de correção de 0,84 para 6-O-metil-gactose; 0,72 para 3,6-anidro-gactose; 0,64 para 2-O-metil-3,6-anidro-gactose e 0,89 para gactose foram aplicados (Sweet, Shapiro & Albersheim, 1975; Stevenson & Furneaux, 1991).

4.5.4 Cromatografia de exclusão estérica de alta precisão acoplada a espalhamento de luz laser em multiângulos (HPSEC-MALLS) e índice de refração (RI)

Para as análises de homogeneidade e de determinação da massa molar ponderal média (M_w) das amostras foram preparadas soluções de 1 mg/mL em nitrato de sódio (NaNO_3 0,1 mol/L) e filtradas em membrana filtrante de poliéster-sulfato (PES) de 0,22 μm . Para as análises foi utilizado o cromatógrafo líquido modelo WATERS com quatro colunas de gel filtração, com limites de exclusão de 7×10^6 , 4×10^5 , 8×10^4 e

5×10^3 g/mol acoplado aos detectores IR/MALLS. A fase móvel utilizada foi uma solução de NaNO_2 0,1 mol/L contendo NaN_3 100 ppm/L, com fluxo controlado de 0,6 mL/min, pressão de ~800 psi a 25 °C. Para o cálculo de massa molar (M_w) estimada da amostra foi utilizada uma curva padrão de dextrana. A curva padrão foi realizada plotando-se os logs das massas molares (que foram de $9 \cdot 10^3$ a $2000 \cdot 10^3$), pelo tempo de retenção (min), apresentando R^2 de 0,9879 (linearidade)

4.5.5 Espalhamento de luz dinâmico (DLS)

As massas molares médias (M_w) foram determinadas por espalhamento de luz dinâmico (DLS) usando o equipamento NanoDLS Brookhaven. As análises foram realizadas no departamento de química da UFPR. Os experimentos foram realizados a 50 °C para amostras em água e 75 °C para amostras em DMSO e foi utilizado a média de espalhamento de luz no tempo de análise. Para determinar a massa molar média (M_w), foi utilizada a seguinte equação:

$$\frac{Kc}{I_R} = \frac{1}{M_w} \quad (5)$$

Onde I_R (q , c) é a dispersão de Rayleigh (cm^{-1}) no vetor de espalhamento (q) e concentração (c). K é uma constante óptica, dada pela luz polarizada incidente, de acordo com a Equação 6:

$$K = \frac{4\pi^2 n^2 \left(\frac{dn}{dc}\right)^2}{NA\lambda^4} \quad (6)$$

Em que n é o índice de refração do solvente, sendo 1,4785 para o DMSO e 1,3335 para a água; λ é o comprimento de onda de vácuo da luz incidente (632.8 nm) e dn/dc é o índice de refração diferencial para os polissacarídeos. O dn/dc utilizado foi de 0,153 mL/g para derivados de agarose em água a 50 °C e 0,080 mL/g para derivados de agarose em DMSO a 75 °C (Podesva, Procháska & Medin, 1995).

4.5.6 Análise elementar de C, H, N e Cl

As análises elementares dos derivados polissacarídicos foram realizadas na Central Analítica da Universidade de São Paulo (USP). Para as análises foi utilizado um analisador Perkin Elmer CHN 2400 para os elementos C, H e N. O teor de cloro foi determinado pelo método de Schöniger, com combustão das amostras orgânicas e titulação com AgNO_3 . Os valores de grau de substituição (DS) foram calculados a partir da composição elementar de acordo com Gericke e Heinze (2015).

4.5.7 Método colorimétrico para identificação de grupo azido

Foi realizado teste colorimétrico para determinação qualitativa de grupamento azido na agarose (HEUKO, 2015), através da adaptação do método descrito por Gagini *et al.* (2004). A primeira etapa deste método consiste na redução do grupo azido a amino. Em um *vial*, cerca de 1 mg do polissacarídeo foi dissolvido em 1 mL de DMSO, e então, foram adicionadas 2 gotas de trifetilfosfina (PPh_3) (5% p/v em THF) e 2 gotas de água. A solução resultante foi deixada em estufa a 100 °C por 1 hora. Em seguida foram adicionadas 2 gotas de solução de ninhidrina (5% p/v em etanol) e a solução foi deixada novamente em estufa a 100 °C por 15 minutos. O aparecimento de uma coloração azulada na solução representa a presença de grupo azido na amostra.

4.5.8 Método colorimétrico para identificação de grupo amino (Teste da ninhidrina)

Foi realizado teste colorimétrico da ninhidrina, para determinação qualitativa de grupo amino na agarose (HEUKO, 2015), através da adaptação do método descrito para detecção de aminoácidos (YEMM e COCKING, 1955). À uma alíquota de 100 μL de solução do polissacarídeo (20 mg/mL) em tubo de ensaio, foram adicionados 2 mL de solução de ninhidrina (0,1% p/v) em tampão fosfato (0,01 mol/L, pH 7,0). Para controle negativo foi utilizado 100 μL de solução de azido agarose em DMSO (20 mg/mL) e para controle positivo foi utilizado 100 μL de solução de glucosamina em DMSO (20 mg/mL). As soluções foram mantidas em banho-maria fervente por 5 minutos. As reações positivas demonstraram o aparecimento de coloração azul/violeta.

4.5.9 Método colorimétrico para identificação de grupo sulfato (Teste do DMMB)

A presença de grupos sulfato foi determinado pela técnica do DMMB (Azul de dimetil metileno), através da adaptação do método descrito por Farndale et al. (1986) e Enobakhare, Bader, Lee (1996). Para teste qualitativo, as amostras e controles negativo (agarose nativa) e positivo (*kappa* carragena) foram preparadas na concentração de 1 mg/mL, destas, retirava-se 10 µL e então adicionava-se 200µL de solução de DMMB. A mudança da coloração de azul para rosa indicava presença de grupo sulfato na amostra.

4.5.10 Método colorimétrico para determinação de açúcar total

A determinação de açúcar total foi realizada pelo método colorimétrico do fenol-ácido sulfúrico, descrito por Dubois et al. (1956). Às amostras em diferentes concentrações e solventes, foram adicionados 0,5 mL de fenol 5% e 2,5 mL de ácido sulfúrico concentrado. O método possui sensibilidade de 10-100 µg de açúcar.

4.5.11 Método colorimétrico para dosagem de ácido urônico

A dosagem do teor de ácido urônico foi realizada pelo método descrito por Filisetti-Cozzi e Carpita (1991). As amostras foram preparadas para solução final de 400 µL. A cada tubo, foram adicionados 40 µL de ácido sulfâmico-sulfamato de potássio 4 mol/L em pH 1,6. Esta solução é feita por meio da dissolução de 19,42 g de ácido sulfâmico em 50 mL de água destilada, acertando o pH com solução saturada de hidróxido de potássio, e em seguida 2,4 mL de H₂SO₄ em grau analítico (96,4%) contendo tetraborato de sódio 75 mM. As amostras foram agitadas vigorosamente em vortex, e os tubos foram então aquecidos em banho-maria, a temperatura de 100 °C por 20 min. Após resfriados em banho de gelo, foi adicionado 80 µL de *m*-hidroxibifenil (0,15 % p/v) em solução de NaOH 0,5%. Após agitadas as amostras foram lidas em espectrofotômetro a 525 nm. A quantificação foi realizada com o auxílio de uma curva padrão de ácido galacturônico. A sensibilidade do método é de 0,97-38,8 µg de ácido urônico em 400 µL de amostra.

4.5.12 Método turbidimétrico para dosagem de sulfato

Os teores de sulfato foram determinados pelo método turbidimétrico descrito por Dodgson e Prince, 1962. Para a dosagem foi preparada solução de cloreto de bário-gelatina. Para isto, a gelatina foi dissolvida em água destilada aquecida (60–70°C), na concentração de 5 mg/mL. Esta solução foi mantida em refrigerador por 12 h. Em seguida foi adicionado cloreto de bário (BaCl_2) (1 mg para cada mg de polissacarídeo) à solução de gelatina sob agitação lenta, esta solução foi então mantida sob refrigeração por 2h. Os polissacarídeos (1 mg/ml) foram hidrolisados com HCl 1 mol/L por 5 horas em estufa a 110 °C. Em tubos de ensaio, foram adicionados de 0,1 mL a 0,2 mL do hidrolisado, 3,8 ml de TCA 3% e 1,0 ml de solução de cloreto de bário-gelatina recém preparada. Os tubos foram levemente agitados e após 15 min foi determinada a absorvância em espectrofotômetro a 360 nm. Para a calibração do aparelho foi utilizado uma solução branco, onde 0,2 mL da amostra foi substituído por 0,2 mL da solução de HCl 1 M. O teor de sulfato foi determinado em relação a uma curva padrão de sulfato de sódio nas concentrações 30, 60, 90, 120, 150 e 180 $\mu\text{g/mL}$. Todas as amostras e diferentes concentrações do padrão foram realizadas em triplicata.

4.5.12.1 Determinação do grau de sulfatação (DS sulfatação)

O grau de substituição (DS) dos polissacarídeos após a sulfatação química foi calculado a partir da Equação 7 (WHISTLER; SPENCER, 1964):

$$\text{DS de sulfatação} = (306,37 \times S) / [3200 - (102 \times S)] \quad (7)$$

Em que:

306,27 = representa 1 mol da unidade dissacarídica repetitiva da agarose

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

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

S = representa o teor de enxofre dado em porcentagem, que é calculado a partir da dosagem do sulfato fornecido pelo método de Dodgson e Prince, 1962.

4.5.13 Método colorimétrico para dosagem do teor de 3,6 anidrogactopirranose

A determinação do teor de 3,6-anidrogactose foi realizada utilizando-se o método do resorcinol (YAPHE, 1960; YAPHE; ARSENAULT, 1965). O teor de 3,6-anidrogactose das amostras foi determinado em relação a uma curva padrão de frutose contendo 5, 10, 20, 30 e 40 µg de frutose. O reativo do resorcinol foi preparado pela adição de: 9 ml de solução de resorcinol (15 mg de resorcinol em 10 ml de água), 100 ml de ácido clorídrico fumegante e 1 ml de acetal (1 ml de dimetoxietano em 24 ml de água), conforme ordem descrita. Alíquotas de 600 µl das amostras, de água destilada (usada como branco) e de solução de frutose (usada como padrão) foram acrescidas de 3 ml do reativo de resorcinol recém preparado, em tubos de ensaio. Os tubos foram então vedados com bola de gude e aquecidos a 80°C em banho por 10 minutos. Após resfriamento em banho de gelo foi realizada leitura da absorvância das soluções à 555 nm em tempo máximo de 15 minutos. Todas as amostras e as diferentes concentrações do padrão foram realizadas em triplicata.

4.5.14 Método colorimétrico para dosagem de açúcar redutor (DNS)

A determinação de açúcar redutor foi realizada pelo método do dinitro salicilato (DNS) (MILLER, 1959). A determinação foi feita em relação a uma curva padrão de galactose contendo 0,2; 0,4; 0,8; 1,6 e 2,0 mg de galactose. As soluções contendo a amostra e o padrão de galactose em diferentes volumes e concentrações eram completadas para um volume final de 1,5 mL de solução com água destilada, em tubos de ensaio. O branco consistia somente de 1,5 mL de água destilada. A estas soluções foram adicionados 1 mL do reativo de DNS (50 mg/mL em NaOH 2M) em cada tubo e estes foram aquecidos em banho-maria fervente por 5 minutos. Após resfriados, foram adicionados mais 7,5 mL de água destilada (totalizando 10 mL ao fim) e as absorvâncias das soluções foram lidas em espectrofotômetro a 540 nm. Os ensaios foram realizados em triplicata.

4.6 ENSAIOS DE ATIVIDADE BIOLÓGICA

4.6.1 Ensaio de atividade antimicrobiana

O ensaio de atividade antimicrobiana foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Veiga et al. (2019). Para os testes, foram utilizadas as seguintes estirpes de microrganismos: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 e *Escherichia coli* ATCC 25922 NEWPROV. As cepas foram ativadas e após ativação as culturas bacterianas foram inoculadas em placas contendo ágar triptona de soja (TSA) e incubadas à 33-35 °C por 18-22 h. Após incubação colônias isoladas foram transferidas com auxílio de alça bacteriológica de 1 µL para tubos contendo solução salina 0,9%. As soluções foram agitadas e padronizadas para 0,5 McFarland (10^8 UFC/mL), utilizando turbidímetro MacFarland.

4.6.1.1 Ensaio de microdiluição e determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

O ensaio foi realizado em microplacas estéreis de 96 poços de fundo em “U”. Primeiramente, foram adicionados 100 µL de caldo Mueller Hinton a cada poço usando uma micropipeta multicanal. Então, a cada poço foi adicionado um volume de 100 µL das várias amostras, preparadas na concentração de 10 mg/mL, diluídas em solução tampão fosfato de pH 7. Posteriormente realizaram-se as diluições seriadas, em que uma alíquota de 100 µL do conteúdo de cada poço foi transferida para o próximo poço em seqüência (do poço A ao H) e, após a mistura, o mesmo volume foi transferido para o seguinte poço, com o procedimento sendo repetido para obter diluições seriadas de (1:2), (1:4), (1:8), (1:16), (1:32), (1:64), (1:128) e (1:256), descartando-se 100 µL do poço H e obtendo-se ao fim todos os poços com 100 µL de solução. As concentrações decrescentes de amostras foram: 5 mg/mL; 2,5 mg/mL; 1,25 mg/mL; 0,625 mg/mL; 0,312 mg/mL; 0,156 mg/mL; 0,078 mg/mL; e 0,039 mg/mL. O diluente, solução tampão fosfato de pH 7, foi empregado como controle negativo, enquanto o antibiótico cloranfenicol, na concentração de 250 µg/mL foi utilizado como controle positivo. Os testes foram realizados em triplicata. Foram então adicionados aos poços 10µL dos inóculos microbianos na concentração de 0,5 McFarland (10^8

UFC/mL) diluídos em solução salina estéril (0,9%). O Branco foi feito com 100 µL da amostra e 100 µL caldo Muller Hinton, sem a presença da solução de microrganismos. As microplacas foram incubadas a 35°C por 24 h. Após este período, 20 µL de uma solução aquosa do indicador TTC (cloreto de trifeniltetrazólio), a 0,5%, foram adicionados a cada poço e as microplacas foram então incubadas por mais 2 horas a 35°C. A presença de uma cor rosa-avermelhada foi interpretada como evidência negativa do efeito inibitório para o microrganismo (indica crescimento bacteriano), enquanto uma solução incolor foi considerada evidência positiva da ação inibitória da amostra. A concentração inibitória mínima (CIM) foi definida como a menor concentração da amostra, em mg/mL, capaz de suprimir o crescimento microbiano (ou seja, a menor concentração que aparece incolor na placa).

4.6.1.2 Determinação da concentração bactericida mínima (CBM)

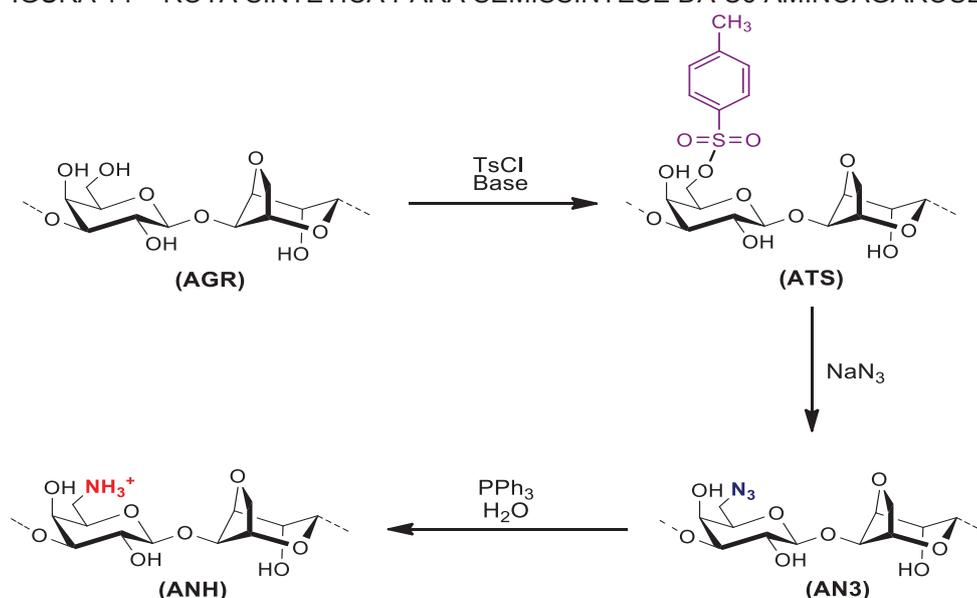
Para determinar a concentração bactericida mínima (CBM), foram retirados, com auxílio de micropipeta, 10 µL de solução contendo todas as concentrações em que os poços se mostraram incolores (que indicaram ausência de crescimento microbiano no intervalo do ensaio). Cada alíquota das diferentes concentrações inibitórias foram então passadas para uma placa de ágar Muller Hinton. A solução foi distribuída pela placa com auxílio de alça de Drigalski e as placas foram incubadas à 33-35°C por 24 h. A placa com a menor concentração em mg/mL em que não houve crescimento bacteriano após 24 h foi considerada a concentração bactericida mínima (CBM).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 PARTE I: SÍNTESE DE C6-AMINOAGAROSE E AVALIAÇÃO DE SUA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

Nesta primeira parte do trabalho foi realizada uma estratégia de aminação seletiva das hidroxilas primárias da unidade de β -D-Galp (G6) utilizando a rota sintética desenvolvida em trabalho anterior (HEUKO, 2015), com algumas modificações. Primeiramente foi realizada a tosilção das hidroxilas primárias (gerando o derivado ATS), seguida de substituição nucleofílica do grupo tosil por grupamento azido (gerando o derivado AN3) e posterior redução do grupo azido a amino (gerando o derivado ANH) (FIGURA 14). Este derivado amino ANH foi por fim despolimerizado por hidrólise ácida parcial, gerando o derivado amino despolimerizado ANHD, que foi estudado quanto à sua atividade antibacteriana frente aos microrganismos *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) e *Escherichia coli* (ATCC 25922). Todos os derivados da agarose foram caracterizados por diferentes métodos químicos, colorimétricos e espectroscópicos. A seguir serão apresentados os resultados referentes à semissíntese e caracterização dos derivados da agarose produzidos na parte 1 do trabalho, bem como da atividade antibacteriana do derivado ANHD.

FIGURA 14 – ROTA SINTÉTICA PARA SEMISSÍNTESE DA C6 AMINOAGAROSE



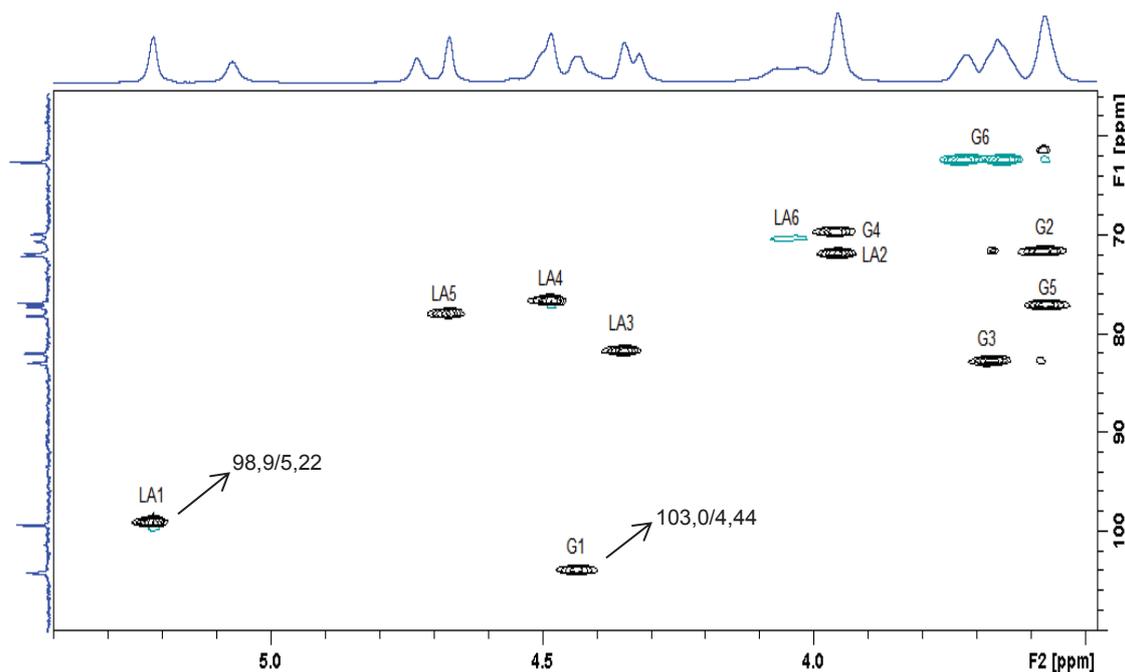
NOTA: (AGR) Agarose reduzida (ATS) Derivado tosil da agarose; (AN3) Derivado azido da agarose; (ANH) Derivado amino da agarose. As estruturas representam as díades sintetizadas e não refletem a exata composição da amostra. FONTE: A autora (2019)

5.1.1 Caracterização agarose AGR

Todas as modificações químicas foram realizadas na agarose comercial obtida da empresa Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Este polissacarídeo neutro apresenta uma estrutura dissacarídica repetitiva constituída de unidades de (1→3) β-D-galactopiranosose (G) e (1→4) 3,6-anidro-α-L-galactopiranosose (LA), com hidroxilas livres nas posições de G6, G4 e G2 e LA2.

Este polissacarídeo foi previamente caracterizado por espectroscopia de infravermelho e Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ¹H e HSQC. No mapa de correlação ¹H/¹³C HSQC (FIGURA 15) é possível observar duas correlações principais na região anomérica em 103,0/4,44 e 98,9/5,22 ppm, as quais foram atribuídas às unidades C1/H1 de β-D-Galp e 3,6-anidro-α-L-Galp, respectivamente. Além disso, todas as correlações observadas no espectro foram consistentes com as anteriormente relatadas para a agarose (HEUKO, 2015; GERICKE e HEINZE, 2015). A massa molecular médio (Mw) da amostra AGR determinado foi de 110.000 g/mol, encontrando-se de acordo com a massa molar encontrado na literatura para agarose (NELSON e COX, 2006; KONDAVEETI, METHA e SIDDHANTA, 2013; KONDAVEETI, CHEJARA e SIDDHANTA, 2013).

Foi realizada ainda análise de composição monossacarídica por cromatografia gás-líquido acoplada ao detector de ionização em chama (GLC-FID) do polissacarídeo. A composição monossacarídica mostrou principalmente a presença de galactose (50,0 %) e 3,6-anidro-galactose (49,3 %) como constituintes majoritários, juntamente com quantidades menores de 6-O-metil-galactose (0,05 %) e 2-O-metil-3,6-anidro-galactose (0,6 %). Assim, esses dados sugeriram que a amostra AGR era uma fonte altamente pura de agarose, adequada para a preparação de polissacarídeos modificados.

FIGURA 15 – MAPA DE CORRELAÇÃO ^1H - ^{13}C HSQC EDITADO DA AGAROSE (AGR)

NOTA: Solvente: $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ (70°C); $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ como padrão interno ($\delta = 2,63\text{ppm}$ para ^1H e $42,01\text{ppm}$ para ^{13}C), Van de Velde; Rollema (2008).

G refere-se à unidade β -D-Galp e LA a unidade 3,6-anidro- α -L-Galp.

FONTE: A autora (2019)

5.1.2 Semissíntese do derivado tosil da agarose (ATS1 e ATS2)

Para iniciar a primeira reação da rota sintética fez-se a redução das pontas redutoras da agarose com NaBH_4 , uma vez que se utilizaria meio básico, para assim evitar a β eliminação catalisada por base e consequente degradação do polissacarídeo (ASPINALL, 1982). A redução foi feita na escala de 5 g e foi realizada conforme descrito por Heuko (2015). Esta amostra reduzida foi utilizada para semissíntese de todos os derivados da agarose relatados neste trabalho.

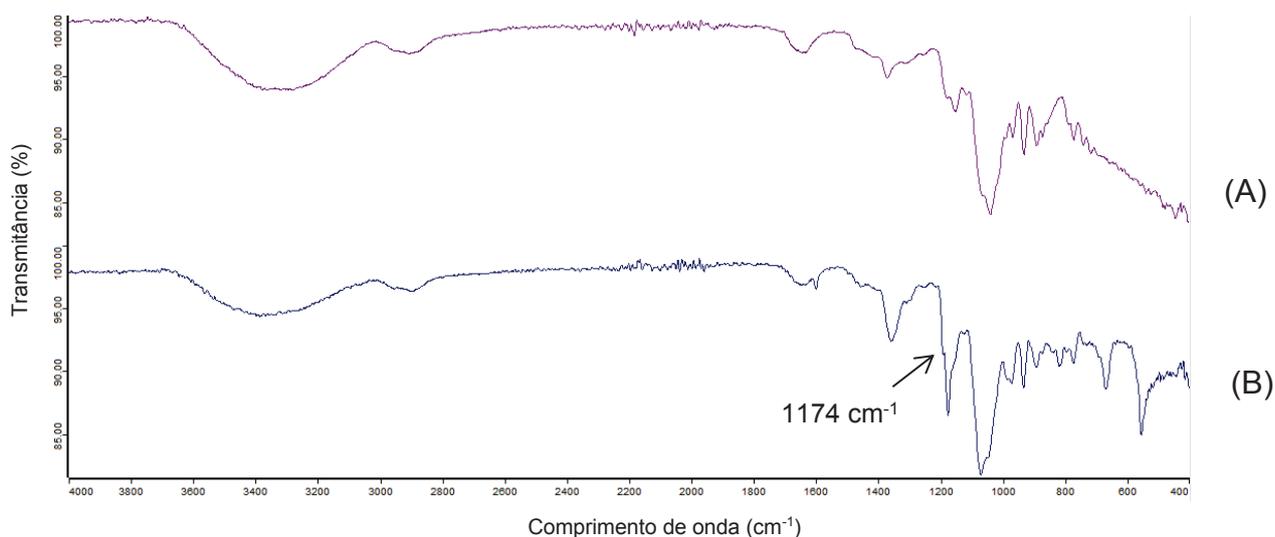
Primeiramente, foi realizada a síntese do derivado tosil da agarose em meio aquoso, utilizando condições otimizadas em trabalho anterior (HEUKO, 2015). A reação partiu de 4 g de agarose e foi conduzida em água, com adição de NaOH como base, gerando 3,67 g do produto (ATS1), com recuperação de 91 % em massa. A confirmação da tosilação e caracterização da amostra foi realizada por espectroscopia de infravermelho e RMN de ^{13}C e ^1H , 1D e 2D.

Na espectroscopia de infravermelho (FIGURA 16) foi observada a presença de uma nova banda em 1174 cm^{-1} , característica do estiramento simétrico da ligação

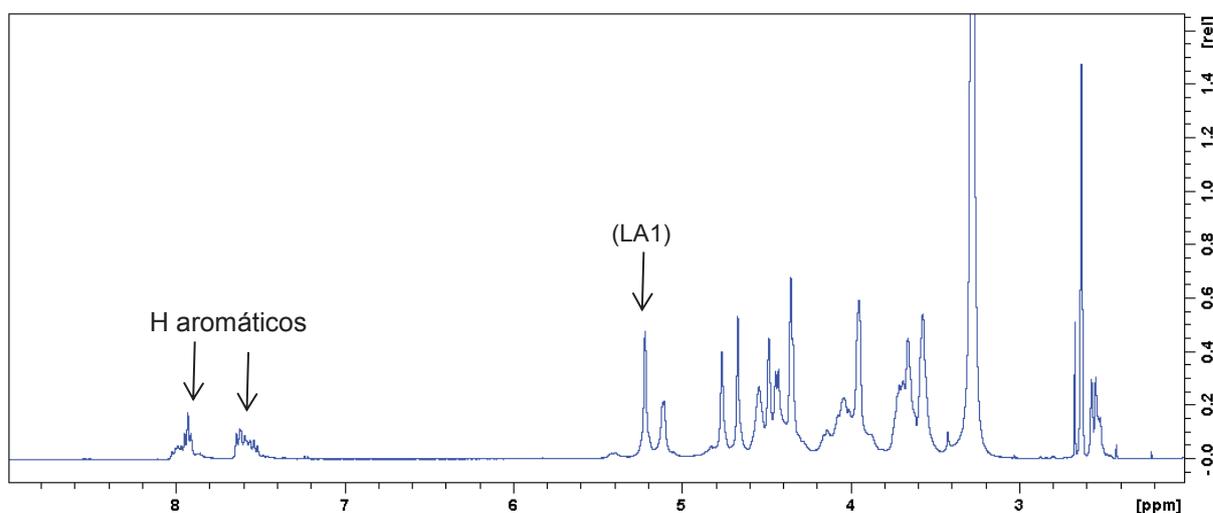
O=S=O (MORITA et al., 1994; HEINZE et al., 2000; GERICKE et al., 2012) confirmando a entrada do grupo tosila no polissacarídeo.

No espectro de RMN de ^1H (FIGURA 17) foram observados picos na região aromática entre 7.89–8.02 e 7.51–7.65 ppm com correspondência aos hidrogênios do anel aromático do grupo tosila. O cálculo do grau de substituição (DS), que representa a relação de tosila por unidade dissacarídica de agarose, foi feito através da integração dos picos gerados pelo hidrogênio do anel aromático do grupo tosila (em 7,89 e 8,02 ppm e 7,51 e 7,65 ppm) e a integração do pico correspondente ao hidrogênio H1 da unidade de 3,6-anidro- α -L-galactopiranosose (em 5,20 ppm) (FIGURA 16), conforme descrito no item 4.3. O DS calculado para esta amostra foi de 0,41.

FIGURA 16 – ESPECTROS DE INFRAVERMELHO DA AGAROSE NATIVA (A) E TOSIL AGAROSE ATS1 (B)



NOTA: Região entre 4000 e 500 cm⁻¹
FONTE: A autora (2019)

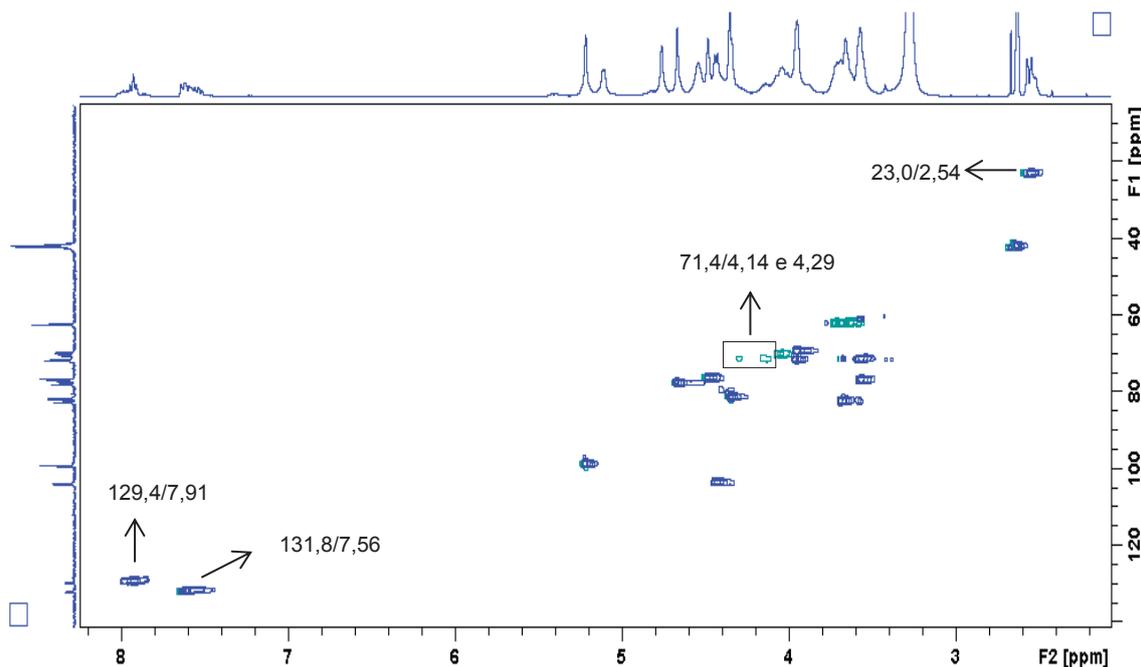
FIGURA 17 –ESPECTRO DE RMN DE ^1H DO DERIVADO TOSIL DA AGAROSE (ATS1)

NOTA: Solvente: $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ (70 °C); $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ como padrão interno ($\delta = 2,63$ ppm para ^1H), Van de Velde; Rollema (2008)

FONTE: A autora (2019)

O RMN de ^1H - ^{13}C HSQC da amostra ATS1 (FIGURA 18) mostrou correlações $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ em 2,54/23,0 ppm e em 7,91/129,4 e 7,56/131,8 ppm correspondentes a metila e ao anel aromático do grupo tosila, respectivamente. Foi observado o deslocamento da correlação C6/H6 do anel de β -D-Galp de 62,2/3,65 e 3,70 ppm para 71,4/4,14 e 4,29 ppm, indicando a entrada do grupo tosila nesta posição (HEUKO, 2015). O espectro indicou que não houve tosilação no C4 do anel de β -D-Galp, não sendo observado o deslocamento da correlação C4/H4, o que também foi observado em trabalhos anteriores de tosilação da agarose (GERICKE e HEINZE, 2015, HEUKO, 2015), nem dos C2/H2 dos anéis de β -D-Galp e 3,6 anidrogalactopiranosose que poderiam ser observados pelo deslocamento das correlações anoméricas (C e H vizinhos à C2).

FIGURA 18- MAPA DE CORRELAÇÃO ^1H - ^{13}C HSQC EDITADO DO DERIVADO TOSIL DA AGAROSE (ATS1)



NOTA: Solvente: $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ (70°C); $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ como padrão interno ($\delta = 2,63\text{ppm}$ para ^1H e $42,01\text{ppm}$ para ^{13}C), Van de Velde; Rollema (2008).

FONTE: A autora (2019)

Em trabalho anterior (HEUKO, 2015) a reação de tosilção foi conduzida pelo tempo de 2 h, obtendo-se um produto com DS de 0,25. A fim de aumentar o DS a amostra foi retosilada (por mais 2h) e dessa forma obteve-se um produto com DS de 0,91. Após retosilação o produto apresentou entrada do grupo tosila na posição 6 do anel de β -D-Galp e na posição 2 do anel de 3,6 anidro Galp. Apesar de ter sido observado no trabalho anterior (HEUKO, 2015) que as reações posteriores à tosilção (substituição nucleofílica com a azida de sódio, redução do grupo azido à amino e oxidação das hidroxilas remanescentes em C6) foram regiosseletivas para o carbono 6 do anel de β -D-Galp, a presença de uma quantidade de tosila remanescente, proveniente da entrada no C2 do anel de 3,6 anidro Galp após a retosilação, foi observada até o final da rota sintética, no derivado amino carboxilado formado.

No presente trabalho, a fim de obter-se um produto com maior DS e realizar uma reação mais regiosseletiva, a reação de tosilção foi conduzida por 4 h. Ao fim obteve-se um produto com grau de substituição por grupo tosila de 0,41 com tosilção somente em C6 do anel de β -D-Galp, mostrando que esta reação foi mais seletiva, no entanto o DS encontrado foi abaixo do esperado.

Diante disso, com o objetivo de inserir o grupo tosila com maior DS, sem no entanto perder a regiosseletividade optou-se por não realizar a retosilação e testar uma nova reação de tosilação, utilizando condições descritas por Gericke e Heinze (2015). No trabalho destes autores foram estudadas diferentes condições de tosilação da agarose em solventes orgânicos, ao invés de água. Os autores observaram que os solventes DMA (dimetil acetamida) e DMI (dimetil imidazol) se mostraram eficientes para esta reação, solubilizando bem o polissacarídeo. No estudo foi observado também que a presença de cloreto de lítio (LiCl) melhorava a solubilidade da agarose nos solventes testados e impedia a geleificação do polissacarídeo, sendo útil para solubilização e na obtenção de um alto DS por grupo tosila. No entanto, observou-se que a presença de LiCl propiciava a entrada do grupo tosila nas posições 2 do anel de β -D-Galp e 3,6 anidro Galp, enquanto na sua ausência, a reação se mostrou regiosseletiva para o carbono 6 do anel de β -D-galactopiranosose, alcançando um DS de até 0,72.

Dessa forma, visando produzir um derivado tosilado da agarose com alto DS, seletivamente tosilado em C6, no presente trabalho, foi realizada a reação na ausência de LiCl e no solvente dimetilacetamida anidra (DMAa), com adição de trietilamina como base e a temperatura de 30°C.

A reação foi feita partindo-se de 2,9 g de agarose, obtendo-se ao fim 4,7 g de produto (ATS2), com recuperação em massa de 100 %. A confirmação da tosilação e caracterização da amostra foi realizada por espectroscopia de infravermelho e de RMN de ^{13}C e ^1H , 1D e 2D. Na espectroscopia de infravermelho (FIGURA 19) é possível confirmar a entrada do grupo tosila no polissacarídeo pela presença da banda em 1174 cm^{-1} , característica do estiramento simétrico da ligação $\text{O}=\text{S}=\text{O}$ (MORITA *et al.*, 1994; HEINZE *et al.*, 2000; GERICKE *et al.*, 2012).

O RMN de ^1H - ^{13}C HSQC do derivado tosilado ATS2 (FIGURA 20) mostra correlações em 2,56/23,1 correspondentes aos ^1H e ^{13}C da metila e em 7,92/129,5 e 7,62/132 ppm, correspondentes aos ^1H e ^{13}C do anel aromático do grupo tosila. Foi observado o desaparecimento do sinal de C6 de 62,2/3,65 e 3,70 ppm e o aparecimento da nova correlação em 71,6/4,14 e 4,31 ppm, indicando a entrada do grupo tosila em todos os C6 do anel de β -D-Galp. É possível observar também o deslocamento de C5, deste mesmo anel, que desaparece na correlação de 76,9/3,57 ppm e aparece em 73,6/3,91, devido a modificação em C6. O espectro indicou que a tosilação foi regiosseletiva para posição 6 do anel de β -D-Galp, não havendo indícios

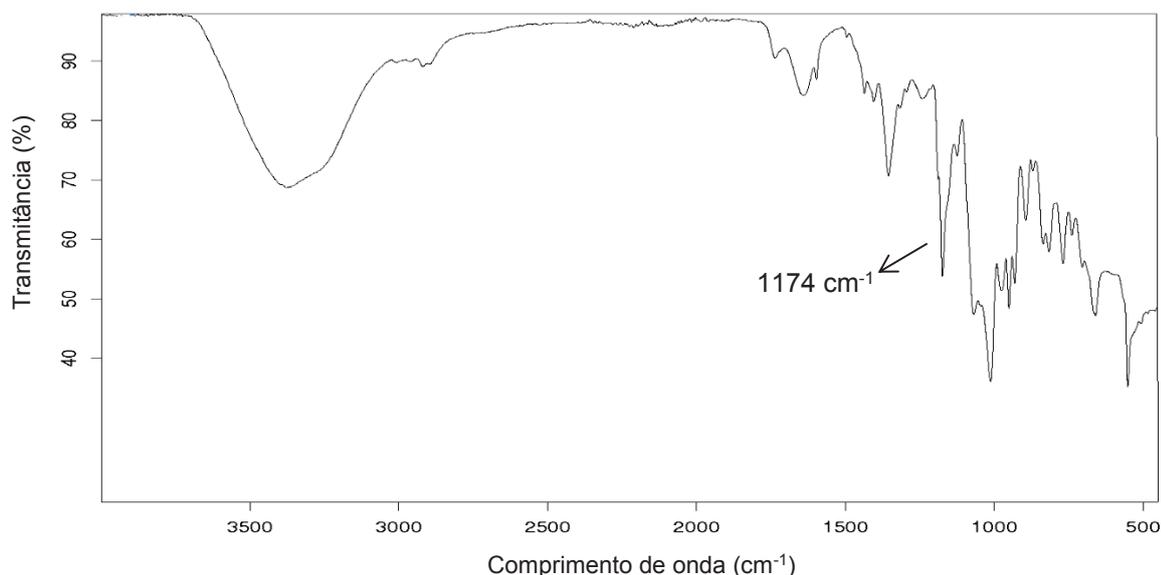
de tosilção em outras posições em conformidade como também relatado por Gericke e Heinze (2015).

A integração dos sinais de RMN ^1H indicou um grau de substituição por grupos tosila (DStosil) de 0,94 por díade. A amostra ATS2 apresentou maior Mw (330.000 g/mol) em comparação a agarose reduzida (AGR), provavelmente por causa da introdução de tosil em alto DS.

Durante a reação de tosilção poderia haver a formação de um derivado clorado, proveniente do deslocamento nucleofílico de grupos tosila com íons cloreto (formados como produtos secundários após a conversão de cloreto de tosil) o que levaria a formação do subproduto cloro-deoxi (GERICKE e HEINZE, 2015). Para confirmar que não houve a formação deste subproduto clorado foi determinado o DS de cloro, calculado por análise elementar (seção 5.5.6), que para a amostra foi de 0,05 indicando não haver formação de agarose cloro-deoxi substituída.

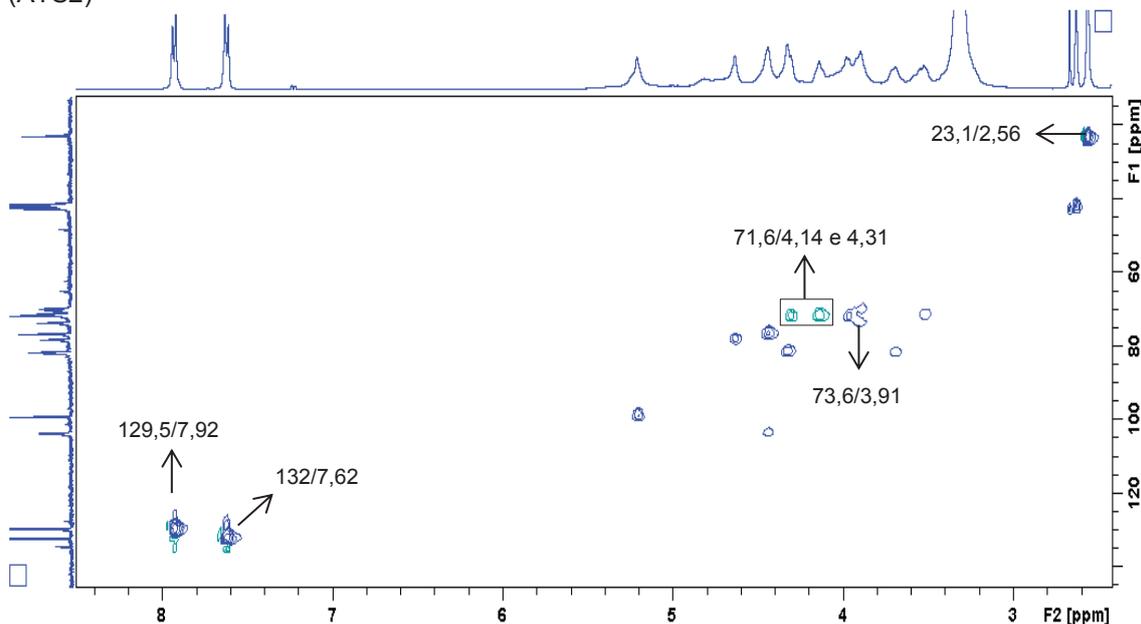
Com base na análise dos espectros de RMN do derivado tosila foi montada uma tabela com os assinalamentos de ^1H e ^{13}C para a díade contendo o grupamento tosil em G6 da agarose (TABELA 1).

FIGURA 19 – ESPECTROS DE INFRAVERMELHO DA TOSIL AGAROSE ATS2



NOTA: Região entre 4000 e 500 cm^{-1}
FONTE: A autora (2019)

FIGURA 20 - MAPA DE CORRELAÇÃO ^1H - ^{13}C HSQC EDITADO DO DERIVADO TOSIL DA AGAROSE (ATS2)



NOTA: Solvente: $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ (70°C); $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ como padrão interno ($\delta = 2,63\text{ppm}$ para ^1H e $42,01\text{ppm}$ para ^{13}C), Van de Velde; Rollema (2008).

FONTE: A autora (2019)

TABELA 1 – DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DE ^1H E ^{13}C DAS DIADES DE AGAROSE NATIVA E C6 TOSILADA (ATS2)

^a Deslocamentos químicos (ppm) $^{13}\text{C}/^1\text{H}$							
Amostra	^b Un.	1	2	3	4	5	6
AGR	G	103,8	71,5	82,6	69,5	76,9	62,2
		4,44	3,58	3,67	3,96	3,57	3,65/3,72
	LA	98,9	71,7	81,6	76,5	77,8	70,2
		5,22	3,96	4,35	4,48	4,67	4,05
ATS2	G6Ts	103,3	71,8	82,2	69,9	73,6	71,6
		4,44	3,51	3,69	3,89	3,91	4,14/4,31
	LA	98,9	71,9	81,6	76,6	77,9	70,8
		5,20	3,96	4,33	4,44	4,63	4,04

NOTAS: ^a Foi utilizado o solvente $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ como padrão interno ($\delta = 2,63$ e $42,01$ ppm para ^1H e ^{13}C respectivamente, Van de Velde e Rollema (2008), pH amostra = 7,0

^b Os códigos de letras são baseadas na nomenclatura desenvolvida por Knutsen *et al* (1994). G6Ts = 6-O-toluenosulfonil- β -D-galactopiranosose. G= β -D-galactopiranosose e LA= 3,6 anidro α -L-galactopiranosose
FONTE: A autora (2019)

Existem poucos relatos na literatura de tosilção da agarose, trabalhos realizados 1980 e 1993, mostraram baixa substituição por grupo tosilato (NILSSON; MOSBACH, 1980; BALASTEROS; MONTERO; SINESTERRA, 1993). Mais recentemente o trabalho de Gerick e Heinze (2015) otimizou as condições de tosilção em diferentes solventes orgânicos (dimetil imidazol, dimetil acetamida,

dimetil formamida e cloreto de 1-butil 3-metilimidazol), apresentando resultados mais promissores do que a tosilação em meio aquoso heterogêneo (HEUKO, 2015). Os autores estudaram diferentes condições que permitiam melhor solubilização do produto (com relação á solventes, diferentes temperaturas), condições em que havia formação de gel durante a reação e condições que permitiam maior regioseletividade da reação. Tendo em vista que o presente trabalho utilizou as condições de tosilação idênticas as descritas anteriormente (GERICK e HEINZE, 2015), foi obtida a fração ATS2 com alto DS e seletivamente substituída em C6 do anel de β -D-Gal.

5.1.3 Semissíntese do derivado azido da agarose (AN3)

Seguindo a rota sintética para obtenção do derivado amino da agarose, a reação posterior a tosilação foi a substituição nucleofílica de segunda ordem do grupo tosila pelo grupo azido através da reação com a azida de sódio (NaN_3).

Esta síntese foi realizada utilizando a condição otimizada descrita por Heuko (2015). O derivado azido foi sintetizado partindo-se de 3 g do derivado tosila ATS2 da agarose em DMSO anidro e NaN_3 a 80 °C. Foi obtido ao fim, 1,4 g de produto (AN3), com recuperação de 62%. O derivado azido (AN3) sintetizado foi caracterizado por reação colorimétrica para determinação do grupo azido adaptada do método descrito por Gaggini et al. (2004) e espectroscopia de infravermelho e de RMN de ^{13}C e ^1H , 1D e 2D.

A reação colorimétrica para determinação de grupo azido é baseada na reação de redução do grupo azido com PPh_3 , e posterior detecção do grupo amino resultante através da reação com a ninhidrina, ocorrendo a formação de uma coloração roxa azulada. Foi utilizado a glucosamina como controle positivo e a agarose nativa como controle negativo para comparação. O derivado AN3 sintetizado se mostrou positivo para o teste colorimétrico.

No espectro de infravermelho (FIGURA 21) houve o aparecimento da banda referente ao estiramento da ligação entre os nitrogênios do grupo azido $-\text{N}_3$ em aproximadamente 2100 cm^{-1} , ainda foi possível observar o desaparecimento da banda em 1174 cm^{-1} correspondente ao estiramento simétrico do $\text{O}=\text{S}=\text{O}$ do grupo tosila (SILVERSTEIN et al., 1994).

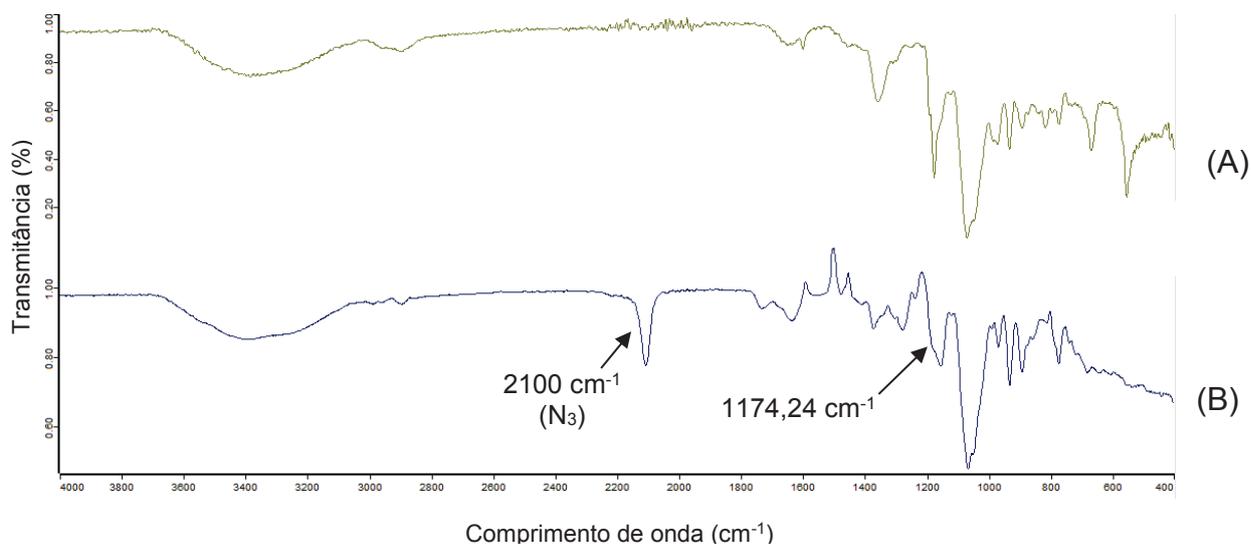
No espectro de RMN de ^1H do derivado azido (FIGURA 22) não foi possível visualizar mais os picos na região aromática entre 8,00 e 7,50 ppm com

correspondência ao grupo tosila, indicando a substituição deste pelo grupo azido. No RMN de ^1H - ^{13}C HSQC da amostra (FIGURA 23) foi possível confirmar a entrada do grupo azido em C6 das unidades de β -D-Galp, através do aparecimento da correlação em 3,51 e 3,65/52,6 ppm, correspondente a C6 da unidade de 6-azido-6-desoxi- β -D-galactopiranoose e o deslocamento de C5/H5 deste anel de 76,9/3,57 para 74,6/3,80 ppm, indicando a substituição do grupo tosila pelo grupo azido.

A massa molar média (M_w) determinada por espalhamento de luz dinâmico (DLS) para a amostra AN3 foi de 167.000 g/mol. Este resultado sugere uma clivagem parcial do esqueleto polissacarídico durante as condições de reação.

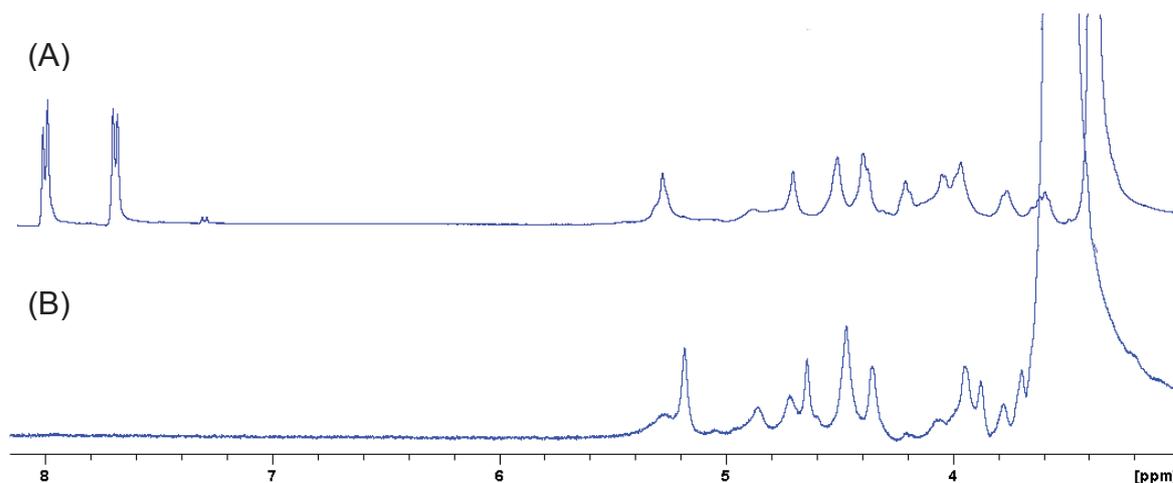
Com base na análise dos espectros de RMN do derivado azido foi montada uma tabela com os assinalamentos de ^1H e ^{13}C para a díade contendo o grupamento azido em C6 do anel de β -D-Galp da agarose (TABELA 2).

FIGURA 21 – ESPECTROS DE INFRAVERMELHO DA TOSIL AGAROSE ATS2 (A) E AZIDO AGAROSE AN3 (B)



NOTA: Região 4000-800 cm⁻¹
FONTE: A autora (2019)

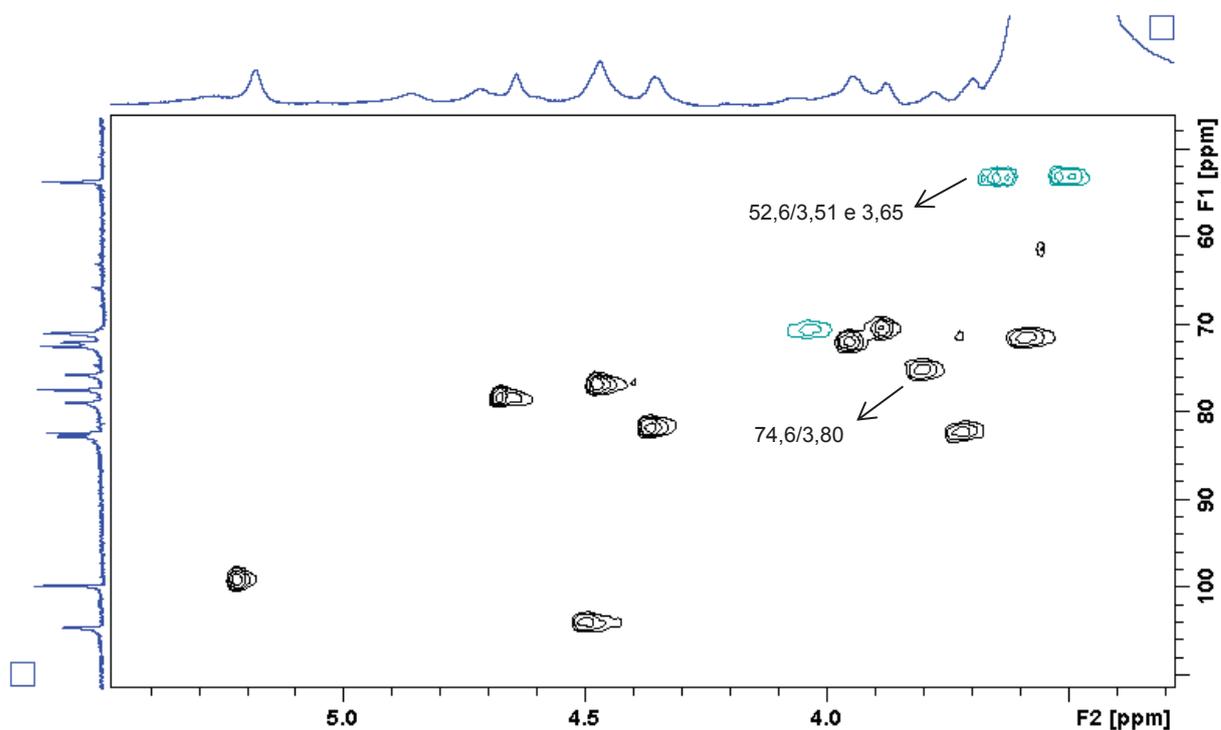
FIGURA 22 – ESPECTRO DE RMN DE ^1H DO DERIVADO TOSIL DA AGAROSE ATS (A) E DERIVADO AZIDO AN3 (B)



NOTA: Solvente: $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ (70°C); $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ como padrão interno ($\delta = 2,63$ ppm para ^1H), Van de Velde; Rollema (2008)

FONTE: A autora (2019)

FIGURA 23 – MAPA DE CORRELAÇÃO ^1H - ^{13}C HSQC EDITADO DO DERIVADO AZIDO DA AGAROSE (AN3)



NOTA: Solvente: $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ (70°C); $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ como padrão interno ($\delta = 2,63$ ppm para ^1H e $42,01$ ppm para ^{13}C), Van de Velde; Rollema (2008). pH amostra = $7,0$

FONTE: A autora (2019)

TABELA 2 – DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DE ^1H E ^{13}C DAS DIÁDE DE AGAROSE NATIVA E DO DERIVADO C6 AZIDO (AN3)

^a Deslocamentos químicos (ppm) $^{13}\text{C}/^1\text{H}$							
Amostra	^b Un.	1	2	3	4	5	6
AGR	G	103,8	71,5	82,6	69,5	76,9	62,2
		4,44	3,58	3,67	3,96	3,57	3,65/3,72
	LA	98,9	71,7	81,6	76,5	77,8	70,2
		5,22	3,96	4,35	4,48	4,67	4,05
AN3	^c G6N ₃	103,4	71,0	81,7	69,7	74,6	52,6
		4,49	3,56	3,72	3,88	3,80	3,51/3,65
	LA	98,5	71,5	81,2	76,4	77,8	70,0
		5,22	3,95	4,37	4,48	4,68	4,04

NOTAS: ^a Foi utilizado o solvente $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ como padrão interno ($\delta = 2,63$ e $42,01$ ppm para ^1H e ^{13}C respectivamente, Van de Velde e Rollema (2008) pH amostra = 7,0)

^b Os códigos de letras são baseados na nomenclatura desenvolvida por Knutsen *et al* (1994)

^cG6N₃ = 6-azido-6-desoxi- β -D-galactopiranosose. G= β -D-galactopiranosose e LA= 3,6 anidro α -L-galactopiranosose

FONTE: A autora (2019)

Gericke & Heinze (2015) sintetizaram o derivado azido-desoxi-agarose, porém nenhum detalhe da síntese ou caracterização química foi relatado. Eles alcançaram um bom DS por grupo azido de 0,63. No presente estudo, o DS_{azido}, calculado por análise elementar e pela integração dos sinais de RMN de ^1H (calculado utilizando o pico relativo ao G5_{azido} em 3,80 ppm e LA1 em 5,22 ppm, conforme equação do item 4.3), indicou um grau de substituição de 0,6 e 0,5, respectivamente.

Os DS obtidos indicam que nem todos os grupos tosil foram substituídos por azido, uma vez que o DS do derivado tosil foi de 0,94 enquanto o DS de azido foi 0,5-0,6. No entanto, no espectro de RMN de ^1H da amostra AN3 (FIGURA 22B) não aparecem hidrogênios aromáticos presentes no grupo tosil, e no RMN de ^1H - ^{13}C HSQC (FIGURA 23) as correlações atribuídas a C6/H6 (71,6 / 4.14 e 4,31 ppm) e C5/H5 (73,6/3,91 ppm) observados nas unidades β -D-Galp tosiladas não estão presentes, indicando a ausência de grupamentos de tosil neste polissacarídeo. Não se sabe exatamente qual a explicação para estes resultados, mas uma possível explicação para o DS_{azido} de 0,50, seria a substituição do grupo tosil pela hidroxila, proveniente de alguma umidade presente no meio de reação, no entanto não é observado no espectro correlação da posição 6 hidroxilada (62,2 e 3,65/3,72). Como o derivado azido apresenta excelente solubilidade em DMSO, no preparo da amostra para o RMN (que utilizou DMSO) poderia ter ocorrido uma melhor solubilização de

uma fração contendo C6-azido ao invés da fração contendo C6-OH, não sendo possível observar esta última correlação no espectro. Outra possível explicação é que o valor do DS de tosil (0,94) calculado por RMN ^1H (através da integração dos picos aromáticos e H1 do anel de 3,6 anidrogactose) poderia estar superestimado, podendo haver a presença física do grupo tosil no polissacarídeo, que, no entanto, não estaria covalentemente ligado em C6.

Vale ressaltar que derivados azido são compostos estáveis importantes em síntese orgânica que podem ser utilizados em *click chemistry*, através da reação de cicloadição entre o grupo azido e um terminal alcino. Reações de *click chemistry* fornecem estratégias sintéticas eficientes e permitem sintetizar derivados com novas funcionalidades, arquitetura e propriedades que são dificilmente obtidos por métodos convencionais, podendo ser aplicados por exemplo como catalisadores e suportes cromatográficos (ROSTOVTSEV et al., 2002, MENG; EDGAR, 2015).

5.1.4 Semissíntese do derivado amino da agarose (ANH)

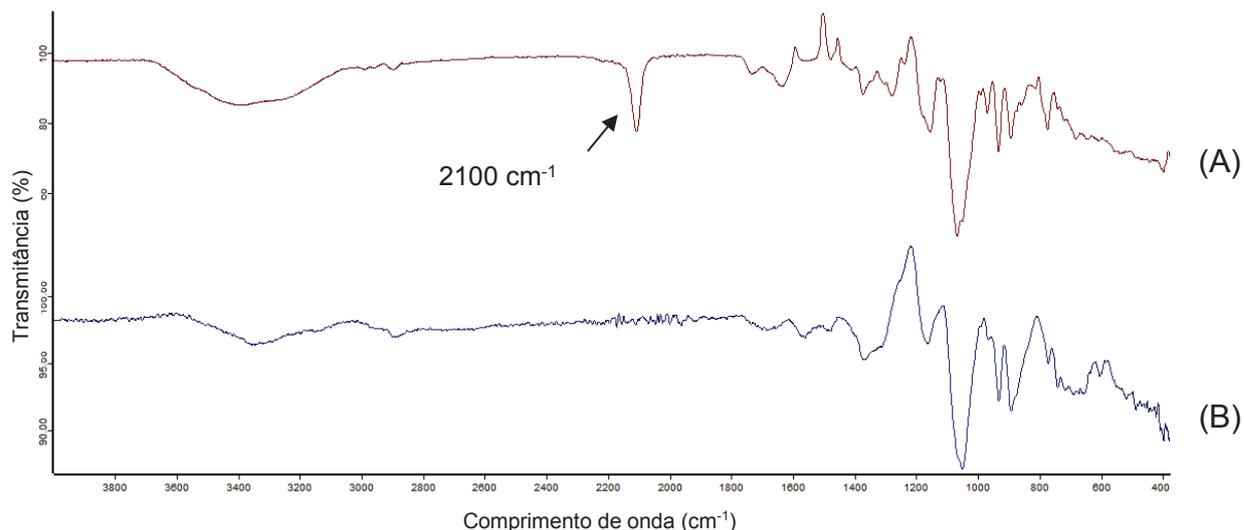
Uma vez obtido o derivado azido (AN3), realizou-se então a reação de redução deste para obtenção do derivado amino (ANH). Para isto, foi feita a reação de Staudinger, utilizando a condição otimizada por Heuko (2015). O derivado amino (ANH) foi sintetizado utilizando 800 mg do derivado azido (AN3), em reação utilizando trifetilfosfina e água como reagentes, formando 1,04 g do produto (ANH).

Conforme observado em trabalho anterior (HEUKO, 2015) ocorre um aumento de massa significativo devido à presença ainda de um excesso de trifetilfosfina e da formação de óxido de trifetilfosfina (subproduto da reação). Assim, da mesma forma realizada anteriormente para eliminar esses contaminantes foi feita uma purificação adicional, em aparelho de Soxhlet com extração por etanol, por 24h. Ao fim do processo obteve-se 570 mg do derivado amino liofilizado com recuperação de 81%, corroborando com o encontrado anteriormente (HEUKO, 2015).

O derivado amino sintetizado foi caracterizado por reação colorimétrica da ninhidrina (YEMM e COCKING, 1955), que é capaz de identificar preferencialmente aminas primárias. No teste foi utilizado a agarose azido como controle negativo e a glucosamina como controle positivo. O derivado se mostrou positivo para o teste colorimétrico em que foi observado o surgimento de uma coloração levemente azul/violeta, indicando a presença do grupo amino.

No espectro de infravermelho (FIGURA 24) houve o desaparecimento da banda em 2100 cm^{-1} referente ao estiramento da ligação entre os nitrogênios do grupo azido N_3 , indicando a possível redução deste grupo azido e formação do derivado amina.

FIGURA 24- ESPECTROS DE INFRAVERMELHO DAS AMOSTRAS AZIDO AGAROSE AN3 (A) E AMINO AGAROSE ANH (B).



NOTA: Região $4000\text{-}800\text{ cm}^{-1}$

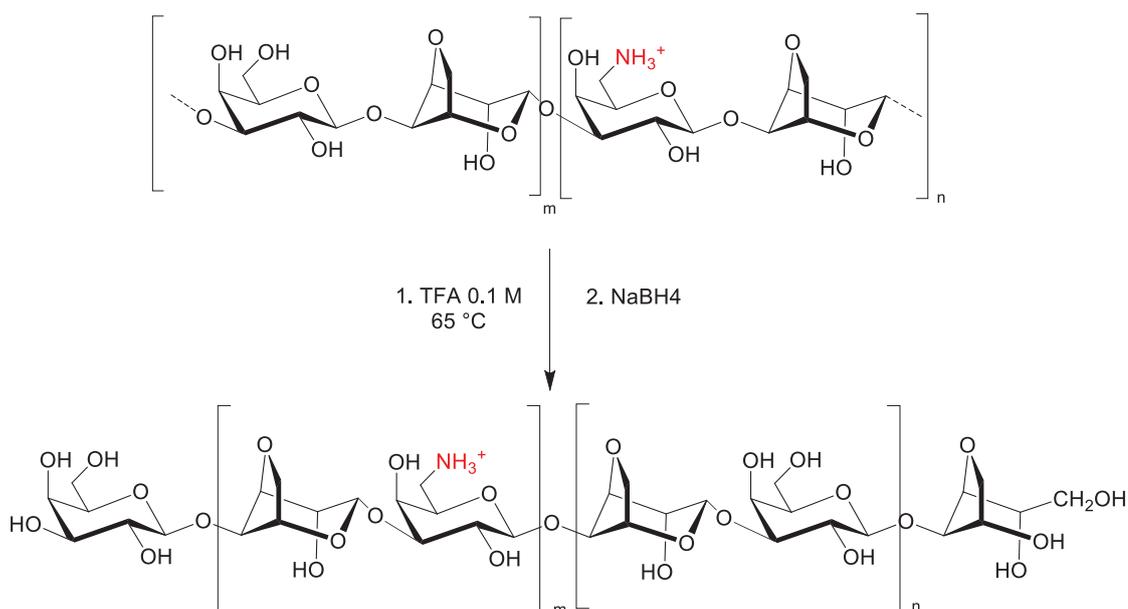
FONTE: A autora (2019)

A amostra não foi analisada por RMN, devido a sua baixa solubilidade. No trabalho anterior (HEUKO, 2015) também houve dificuldade de solubilização da amostra. Além disso, já foram relatados na literatura dificuldades para solubilizar polissacarídeos aminados (FOX; EDGAR, 2012, CIMECIOGLU et al., 1994). Apesar de possuir interessante aplicação, como em medicina regenerativa, nesta forma insolúvel, no presente trabalho o derivado amina sintetizado seria testado quanto a sua atividade antibacteriana, desta forma a solubilidade deste produto era um parâmetro importante não somente para sua caracterização como também para a avaliação da atividade pretendida.

Assim, este produto foi submetido a uma hidrólise ácida parcial (FIGURA 24), com o objetivo de despolimerizar a cadeia polissacarídica, gerando uma molécula menor e assim melhorando a sua solubilidade. A hidrólise ácida foi realizada com base no trabalho de Ducatti et al. (2011) em que foi feita a hidrólise ácida parcial da agarose e produção dos oligossacarídeos.

Sabe-se que a ligação 3,6 anidro é instável a condições muito ácidas, que utiliza ácidos muito fortes ou concentrados (YANG et al. 2009), assim no trabalho de Ducatti et al (2009) foi utilizado TFA 0,1 M para hidrólise. A temperatura utilizada foi de 65°C por 2 h e nestas condições alcançou-se quebra seletiva da ligação glicosídica (alfa) envolvendo a unidade 3,6 anidro-galactose.

FIGURA 25- ESQUEMA DE HIDRÓLISE ÁCIDA PARCIAL DO DERIVADO AMINO DA AGAROSE

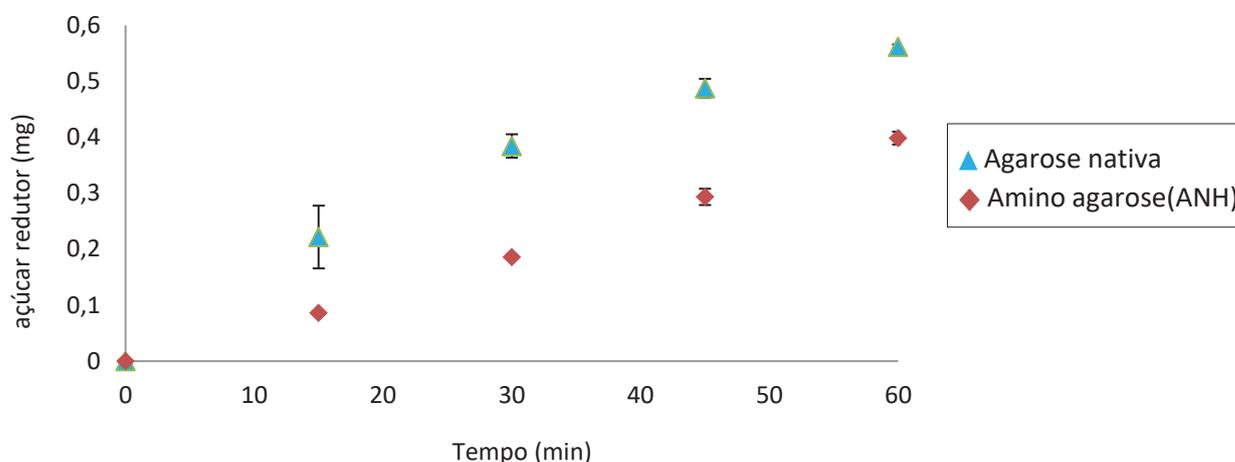


FONTE: A autora (2019)

5.1.4.1 Hidrólise ácida parcial do derivado amino da agarose (ANH)

No presente trabalho, para escolha do tempo de hidrólise inicialmente foi montada uma curva de hidrólise com a amino agarose ANH, e agarose nativa a critério de comparação. A curva foi constituída medindo-se a formação de açúcar redutor, utilizando o método do dinitrosalicilato (DNS), por tempo de hidrólise. As alíquotas foram retiradas a cada 15 minutos até o tempo de 60 minutos (GRÁFICO 1).

GRÁFICO 1 – CURVAS DE HIDRÓLISE ÁCIDA PARCIAL DAS AMOSTRAS AGAROSE NATIVA E AMINO AGAROSE.



NOTA: Agarose nativa (▲) e amino agarose (◆).
 Hidrólise ácida parcial realizada com TFA 0,1 mol/L, 65 °C.
 FONTE: A autora (2019)

O tempo escolhido para hidrólise da aminoagarose ANH foi de 20 minutos. Este tempo foi escolhido, pois nele foi observada a completa solubilização da amostra, que inicialmente encontrava-se totalmente insolúvel e houve pouca degradação por hidrólise (observada pela baixa formação de açúcar redutor), mantendo ainda uma cadeia polimérica mais intacta.

Analisando o gráfico, ainda é possível concluir que a amostra aminada apresentou um perfil de despolimerização mais lento (velocidade de formação de 0,0067 mg de açúcar redutor/min) em comparação à agarose nativa (velocidade de formação de 0,0093 mg de açúcar redutor/min). Esse perfil de hidrólise ocorre possivelmente pela diferença de solubilidade entre as moléculas. Como o derivado amino é mais insolúvel este apresenta um perfil mais lento de despolimerização.

Assim, utilizando como tempo de hidrólise 20 minutos, foi realizada a hidrólise parcial de 365 mg do derivado amino da agarose, à 65°C, em ácido trifluoroacético (TFA) 0,1 mol/L. A fim de reduzir as pontas redutoras provenientes da hidrólise, foi adicionado NaBH₄. A solução foi dialisada primeiramente em membrana de 1 Kda para eliminar o excesso de NaBH₄ e em seguida o produto foi novamente dialisado em membrana de 12-14 Kda. No fim das diálises, após liofilização, foram recuperados 127 mg do derivado amino da agarose despolimerizado ANHD.

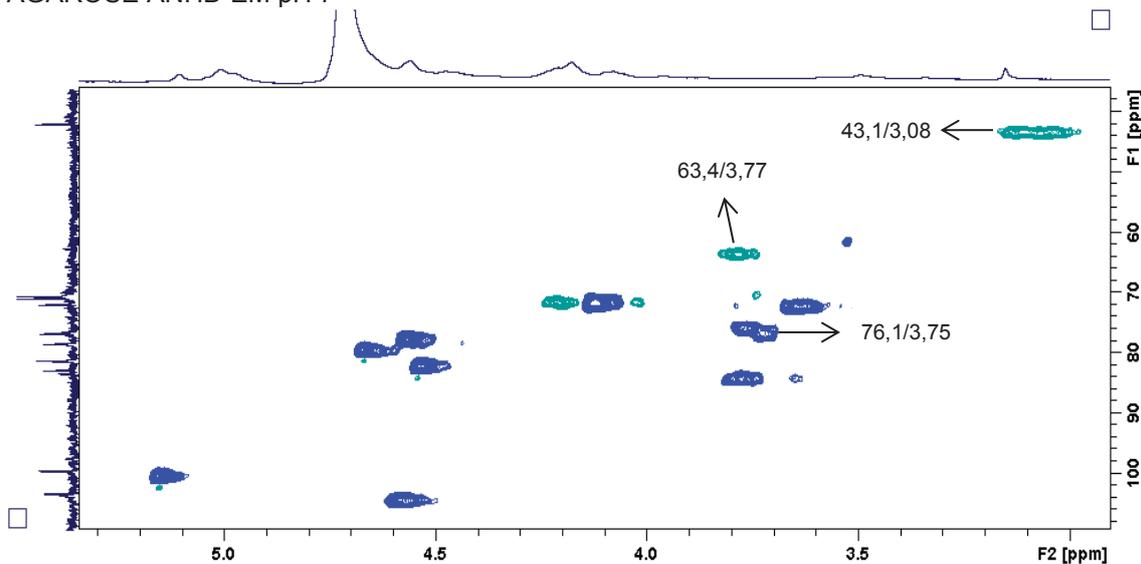
Após a hidrólise, a massa molar média (M_w) determinado para a amostra ANHD foi de 39.000 g/mol, indicando que este derivado ainda possui uma estrutura polimérica e que agora é solúvel em água. O espectro de RMN de ^1H - ^{13}C - HSQC foi realizado em dois diferentes pHs. Uma das análises foi realizada em pH 7 (FIGURA 26), através da simples diluição da amostra em D_2O . Para outra análise, a amostra ANHD foi primeiramente dissolvida com HCl 0,04 mol/L, esta solução foi então liofilizada e o produto foi ressolubilizado em D_2O , obtendo-se uma solução de pH 4 para análise de RMN (FIGURA 26).

Pela análise dos espectros (FIGURAS 26 e 27) é possível observar que ocorrem pequenos deslocamentos nas correlações de ^1H e ^{13}C no espectro de HSQC quando a mesma amostra é preparada em diferentes pHs. Em ambos os espectros é possível observar o desaparecimento da correlação em 52,6/3,51 e 3,65 ppm atribuída a G6 da unidade de 6-azido-6-desoxi- β -D-galactopiranosose e confirmar a entrada do grupo amino na cadeia do polissacarídeo através do aparecimento de uma nova correlação em 43,1/3,08 ppm em pH 7 (FIGURA 25) e em 42,5/3,36 ppm em pH 4 (FIGURA 26) atribuída a G6 da unidade de 6-amino-6-desoxi- β -D-galactopiranosose. A correlação atribuída à G5 aparece em 76,1/3,75 ppm em pH 7 (FIGURA 26) e em 72,6/3,99 ppm em pH 4 (FIGURA 27). Esta diferença dos deslocamentos das correlações de ^1H e ^{13}C também foi observado em estudo anterior (HEUKO, 2015), demonstrando a importância do pH para a análise.

Os assinalamentos de ^1H e ^{13}C realizados para a díade amino da agarose, com substituição em G6 corroboram com os resultados encontrados por Heuko (2015) e Kondaaveti et al. (2014) para a amino agarose e estão apresentados na tabela 3.

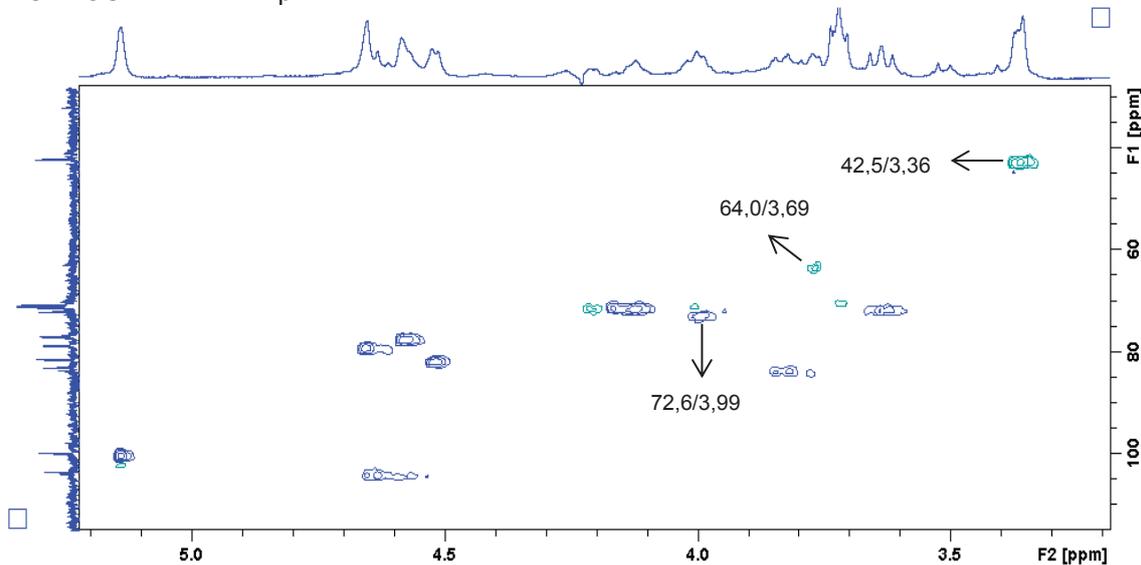
O DS da amostra, calculado por análise elementar, foi de 0,5 e o calculado por análise de RMN de ^1H (calculado utilizando os picos relativo ao G6_{amino} em 4,02 e 4,22 ppm e LA1 em 5,14 ppm, conforme equação do item 4.3) foi de 0,47. Juntos, estes resultados implicam a redução completa dos grupos azido (DS_{azido} 0,50) em grupos amino. No espectro ^1H - ^{13}C HSQC da amostra ANHD ainda é possível observar uma correlação em 63,4/3,77 (FIGURA 27) e 64,0/3,69 (FIGURA 26) nos pHs 4 e 7, respectivamente, correspondendo a C6/H6 de unidades β -D-Galp não substituída, o que poderia confirmar a suspeita de que parte do grupo tosila em ATS2 (DS_{tosil} 0,94) teria sido substituído por hidroxil em AGN3 (DS_{azido} 0,5-0,6) voltando à estrutura nativa (C6 hidroxilado) visível no espectro HSQC do derivado amino, no entanto essas correlações da agarose nativa não foram observadas no derivado azido.

FIGURA 26 – MAPA DE CORRELAÇÃO ^1H - ^{13}C HSQC EDITADO DO DERIVADO AMINO DA AGAROSE ANHD EM pH 7



NOTA: Solvente: D_2O (70 °C); acetona como padrão interno ($\delta = 2,21$ e $32,69$ ppm para ^1H e ^{13}C), Van de Velde; Rollema (2008). pH amostra = 7,0.
 FONTE: A autora (2019)

FIGURA 27 – MAPA DE CORRELAÇÃO ^1H - ^{13}C HSQC EDITADO DO DERIVADO AMINO DA AGAROSE ANHD EM pH 4



NOTA: Solvente: D_2O (70 °C); acetona como padrão interno ($\delta = 2,21$ e $32,69$ ppm para ^1H e ^{13}C), Van de Velde; Rollema (2008). pH amostra = 4,0.
 FONTE: A autora (2019)

TABELA 3 – DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DE ^1H E ^{13}C DAS DÍADES DE AGAROSE NATIVA E DO DERIVADO C6 AMINO ANHD

^a Deslocamentos químicos (ppm) $^{13}\text{C}/^1\text{H}$							
Amostra	^b Un.	1	2	3	4	5	6
AGR	G	103,9	71,6	82,6	69,9	76,9	62,3
		4,41	3,54	3,65	3,92	3,56	3,63/3,69
	LA	98,9	71,9	81,7	77,7	76,6	70,3
		5,19	3,94	4,32	4,64	4,47	4,03
ANHD	^c G6NH ₂	104,1	72,2	84,4	70,9	72,6	43,1
		4,57	3,63	3,77	4,13	3,99	3,08
	LA	100,2	72,0	82,0	77,7	79,5	71,4
		5,14	4,13	4,53	4,56	4,66	4,02/4,21

NOTA:^a Foi utilizado o padrão interno acetona (2,21 e 32,69 ppm para ^1H e ^{13}C respectivamente, Van de Velde e Rollema (2008)). pH da amostra = 7,0.

^b Os códigos de letras são baseados na nomenclatura desenvolvida por Knutsen et al (1994).

^c G6NH₂ = 6-amino-6-desoxi- β -D-galactopiranosose. G= β -D-galactopiranosose e LA= 3,6 anidro α -L-galactopiranosose

FONTE: A autora (2019)

5.1.5 Atividade antimicrobiana do derivado amino despolimerizado da agarose (ANHD)

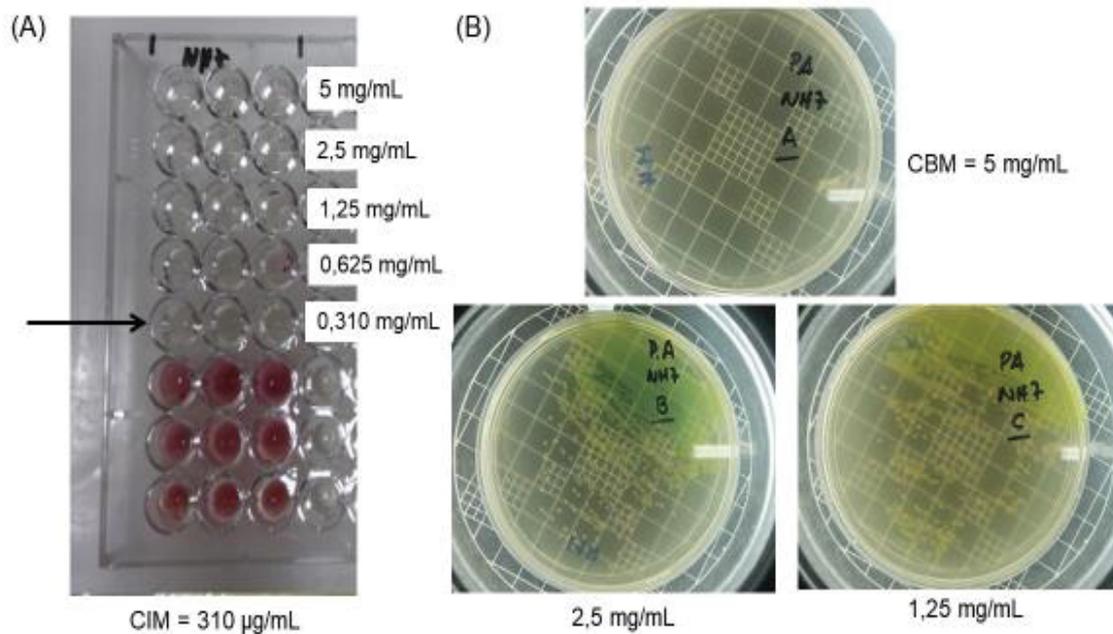
Aminopolissacarídeos como a quitosana se destacam pela inibição do crescimento de microrganismos. A atividade antimicrobiana destes aminopolissacarídeos é explicada principalmente por seus grupos amino, e de sua natureza catiônica (RABEA et al., 2003; GOY et al., 2009).

Acredita-se que os grupos amino protonados se ligam a grupos aniônicos da membrana celular destes microrganismos, através de interação eletrostática resultando na lise celular (RABEA et al., 2003). A quitosana carregada também pode interagir com nutrientes essenciais, interferindo no crescimento microbiano. No entanto, sabe-se que outros fatores estão também relacionados com este mecanismo de inibição como: propriedades físico-químicas do polímero, sua massa molar e as características da membrana do microrganismo (JIA et al., 2001, SILVA et al., 2006; LI et al. 2015; GOY et al., 2016).

Tendo isto em vista, o derivado amino despolimerizado ANHD, sintetizado no presente estudo foi avaliado quanto à sua atividade antimicrobiana frente aos microrganismos *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 e *Escherichia coli* ATCC 25922, utilizando o ensaio de microdiluição

(VEIGA et al., 2019), para determinação das concentrações inibitórias mínimas (CIM), e das concentrações bactericidas mínimas (CBM).

As amostras foram preparadas na concentração de 10 mg/mL, e através da diluição seriada a primeira concentração estudada foi de 5 mg/mL (metade da concentração original), seguida de 2,5 mL; 1,25 mL e assim por diante (FIGURA 28A). Após incubação, a menor concentração em que não era observada a coloração rosa proveniente da interação do corante com células viáveis bacterianas era considerada a concentração inibitória mínima (CIM), em que o crescimento microbiano é inibido, representando a concentração bacteriostática. As concentrações acima do CIM foram transferidas para placa de ágar e estas foram novamente incubadas (FIGURA 28B), com a finalidade de determinar a concentração bactericida mínima (CBM), em que não somente foi inibido o crescimento bacteriano, como foram mortas todas as bactérias. Os resultados de CIM e CBM encontrados foram expressos em mg/mL e encontram-se na tabela 4.

FIGURA 28 – CIM e CBM DA AMINOAGAROSE PARA *PSEUDOMONAS AERUGIONOSA*

NOTA: (A) Ensaio de microdiluição em microplaca para determinação do CIM e (B) Ensaio realizado em placa com as concentrações em que houve inibição do crescimento para determinação do CBM.
 FONTE: A autora (2019)

TABELA 4– CIM E CBM DA AMINOAGAROSE (ANHD) PARA OS MICRORGANISMOS *S. aureus*, *P.aeruginosa* E *E.coli*

Bactéria	Concentração inibitória mínima - CIM (mg/mL)	Concentração bactericida mínima - CBM (mg/mL)
<i>Staphylococcus aureus</i>	2,50	5,00
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,31	5,00
<i>Escherichia coli</i>	2,50	2,50

FONTE: A autora (2019)

Todos os microrganismos testados tiveram seu crescimento inibido pela ANHD, sendo que a maior inibição observada foi para a bactéria gram-negativa *Pseudomonas aeruginosa* (TABELA 4). Para este microrganismo a inibição ocorreu na escala de microgramas (310 µg/mL), no entanto a atividade bactericida só ocorreu na concentração de 5 mg/mL da amostra (FIGURA 27).

Em trabalho recente, Liu, Jiang, Zhu, Huang e Zhang (2019) determinaram o CIM e o CBM de um cloridrato de quitosana solúvel (WCS) e uma quitosana sulfonada modificada (SCS) com massas molares semelhantes ao do presente estudo (31.000 g/mol). Eles encontraram valores de CIM, para WCS e SCS, de 1 mg/mL, enquanto os valores de CBM foram de 16 mg/mL, 8 mg/mL, respectivamente.

Encontrar moléculas com boa atividade contra *P. aeruginosa* é de extrema importância, uma vez que esta bactéria apresenta quatro camadas de membranas com uma camada superficial reticulada de lipopolissacarídeo tornando este microrganismo resistente a muitos agentes antibacterianos, sendo sabidamente a bactéria gram negativa mais resistente (HUNG et al., 2010; HUANG et al., 2010; LIM, HUANG e LOO, 2012).

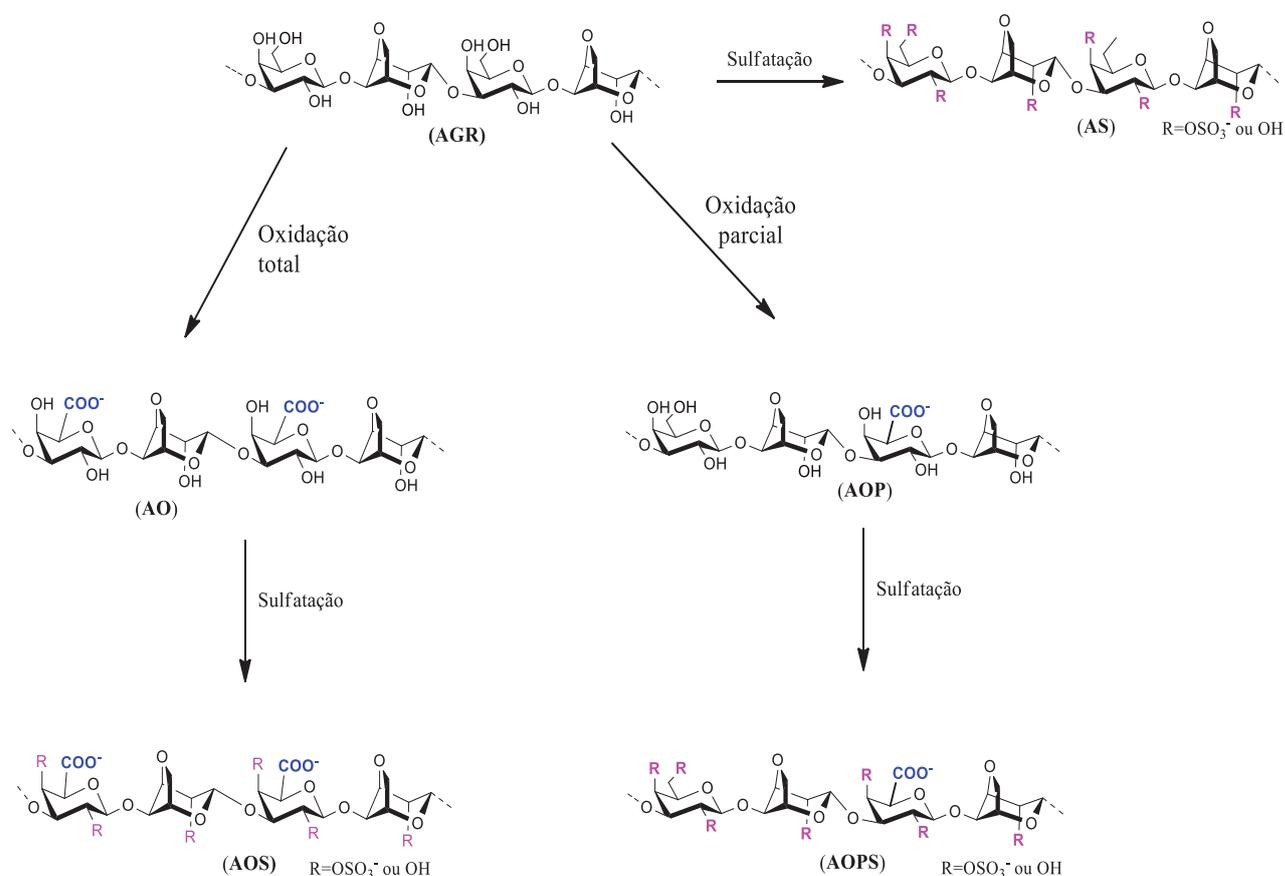
Para *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* foram observados o mesmo valor de CIM (2,5 mg/mL). Para a bactéria gram negativa *Escherichia coli* a atividade bactericida já ocorria nesta concentração (2,5 mg/mL) enquanto para *Staphylococcus aureus*, gram-positiva, essa atividade foi observada somente em 5 mg/mL. Possivelmente, essa diferença poderia ser explicada pelas diferenças na parede celular desses microrganismos. A parede celular de *E. coli*, por exemplo, tem uma espessura de 7 a 8 nm, enquanto a parede de *S. aureus* é de cerca de 20 nm (Goy, Morais & Assis, 2016), dificultando a morte de *S. aureus* por lise da membrana.

Assim, a despolimerização resolveu o problema da solubilidade do polissacarídeo permitindo seu estudo da atividade antimicrobiana. A solubilização do derivado não requer solução ácida (é solúvel em pH 7), favorecendo sua aplicação biológica como antibacteriano. O derivado amino da agarose sintetizado apresentou relevante atividade antimicrobiana, o que se deve a presença do grupo amino que conferiu ao polímero, inicialmente inerte e usado como meio de cultivo de microrganismos, a propriedade bacteriostática e bactericida. Este produto antimicrobiano pode ainda ser utilizado em diferentes aplicações tais como catalisador de sínteses em reações importantes tais como reações aldólicas, similares à catalisada por aldolases (DWIVEDI et al. 2006; RICCI et al. 2010; RICCI et al., 2013; GIOIA et al., 2013; ZHAO et al., 2015; GONZALO et al., 2018), suporte para imobilização de enzimas (SPAGNA et al. 2000, VIEIRA et al. 2011) e *gene delivery* (SARANYA et al, 2011; et al. 2018; ALI, AHMED, 2018).

5.2 PARTE II-SÍNTESE DOS DERIVADOS C6-OXIDADOS E SULFATADOS DA AGAROSE

Na segunda parte deste trabalho foram sintetizados os derivados oxidados e sulfatados da agarose que apresentam potenciais atividades biológicas. Inicialmente foram sintetizados os derivados: sulfatado (AS), C6-oxidado (AO) e parcialmente C6-oxidado (AOP). Em seguida, os derivados oxidados foram sulfatados gerando uma fração C6-parcialmente oxidada e sulfatada (AOPS) e outra com maior grau de oxidação em C6-e sulfatada (AOS) (FIGURA 29). As reações de oxidação utilizaram os reagentes TEMPO e TCCA e as reações de sulfatação foram feitas com o agente sulfatante trióxido de enxofre-piridina (SO_3Py). Parâmetros de síntese foram modificados a fim de produzir as moléculas químicas de interesse. A seguir serão apresentados os resultados referentes à semissíntese e caracterização dos derivados oxidados e sulfatados da agarose.

FIGURA 29 – ROTA PARA SEMISSÍNTESE DE DERIVADOS DA AGAROSE OXIDADOS E SULFATADO



FONTE: A autora (2019)

5.2.1 Semissíntese do derivado sulfatado da agarose (AS)

Através das reações de sulfatação de polissacarídeos grupos hidroxilas são transformados em ésteres de sulfatos. Reações de sulfatação de polissacarídeos são realizadas há muitas décadas com o objetivo de expandir e dar novas propriedades biológicas para os polissacarídeos, sobretudo propriedades anticoagulantes (MARUYAMA et al., 1998; MESTECHKINA, SHCHERBUKHIN, 2010; ZHANG et al., 2010; MAAS et al., 2012; YANG et al., 2013).

As reações de sulfatação da agarose realizadas neste trabalho, foram adaptadas da metodologia descrita por Araújo et al (2013). As sulfatações foram realizadas em DMF anidro, a 30 °C, utilizando como agente sulfatante o complexo trióxido de enxofre-piridina (SO₃-Py) e para evitar a degradação do polímero, foi acrescentado o 2-metil-2-buteno (2M2B) (PAPY-GARCIA et al., 2005).

Foram testadas 4 condições de síntese, variando os parâmetros: tempo de reação (7 e 18 h), concentração do polissacarídeo no meio reacional (5 e 10 mg/mL) e adição ou não de 2M2B.

Os produtos de síntese foram avaliados pela adaptação do método do DMMB (azul de dimetimetileno) (ENOBAXHARE, BADER, LEE, 1996), reagente catiônico que altera sua coloração de azul para rosa em presença de grupos sulfatos. Este corante é utilizado para determinação de glicosaminoglicanos sulfatados em amostras biológicas, e neste estudo foi utilizado como método qualitativo rápido para identificar a sulfatação das amostras.

A quantificação de grupos sulfatos foi realizada através da dosagem de sulfato, descrita por Dodgson e Prince (1962) e então foi calculado o grau de substituição (DS) das díades em cada amostra. A reação de sulfatação foi otimizada para obtenção do produto, conforme demonstrado na tabela 5.

TABELA 5 – REAÇÕES DE SULFATAÇÃO DA AGAROSE.



Entrada	2M2B (2-metil-2- buteno)	Tempo (h)	Concentração polissacarídeo (mg/mL)	Colorimetria (DMMB)	Dosagem sulfato (DS)
1	Sim	7	10	negativo	0,4
2	Sim	18	10	negativo	0,4
3	Não	7	10	negativo	0,3
4	Sim	7	5	positivo	2,7

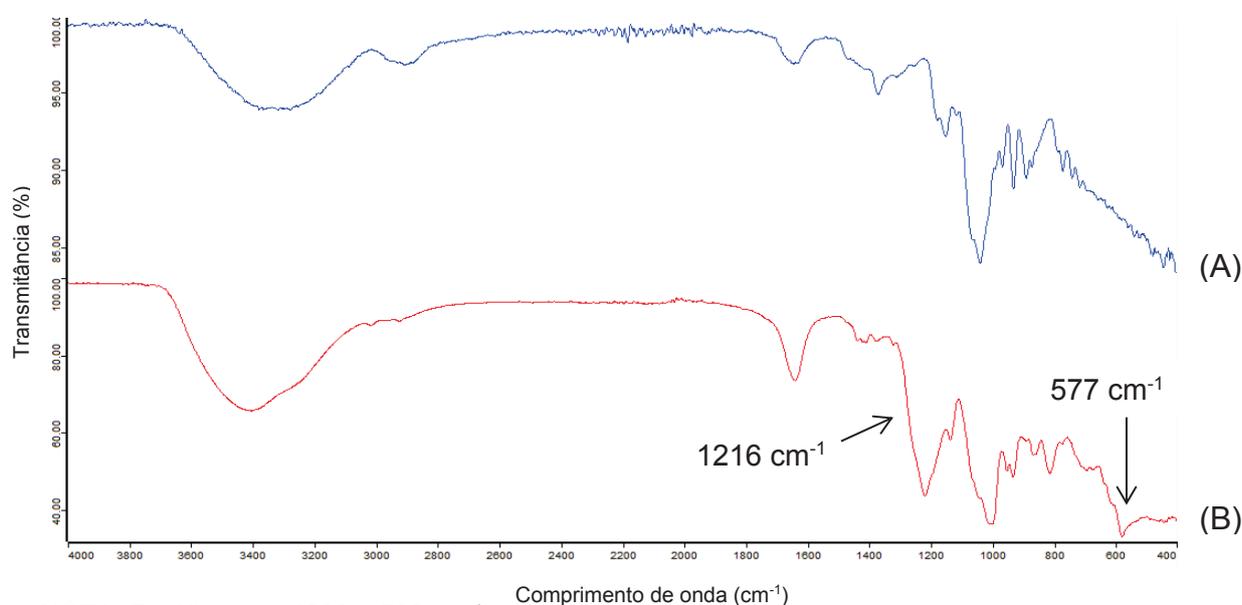
NOTA; Todas as reações foram realizadas com a adição de 20 equivalentes de SO_3Py em DMFA e temperatura de 30°C , partindo-se de 50 mg de polissacarídeo.

Analisando a tabela, é possível observar que nas entradas 1 (em que a reação foi conduzida por 7h) e 2 (reação de 18h) realizadas na concentração de 10 mg/mL houve uma sulfatação muito baixa do polissacarídeo (ambos apresentaram DS de 0,4) demonstrando que o tempo de reação aparentemente não interfere na formação do produto. Pela análise das entradas 1 e 3 da tabela, em que o parâmetro variado foi a adição ou não de 2M2B na mesma concentração também se observou DSs de sulfato baixos e muito próximos entre si (0,4 e 0,3 respectivamente) indicando que a presença desse reagente não resulta em uma melhor sulfatação, atuando provavelmente somente para evitar a degradação do polissacarídeo e a perda de massa, conforme relatado na literatura. Apenas na entrada 5, em que houve uma diminuição da concentração do polissacarídeo no meio reacional (de 10 mg/mL para 5 mg/mL), é possível observar a formação do produto com alto DS. A diminuição da concentração possivelmente deixou o polissacarídeo mais solúvel e tornou o meio reacional mais homogêneo, facilitando a reação de ocorrer. Assim, uma nova reação foi realizada em escala preparativa, utilizando as condições da entrada 4 da tabela 5, partiu-se de 200 mg do polissacarídeo nativo, e obteve-se ao final 181 mg do polissacarídeo sulfatado (AS), com recuperação de 91% em massa.

A amostra AS foi testada pelo método do DMMB, apresentando coloração rosa indicando a presença de sulfato na amostra. A dosagem de sulfato pelo método turbidimétrico mostrou DS de 2,7, coerente com o observado para reação em escala menor (entrada 4, tabela 5), indicando um alto grau de sulfatação.

A caracterização foi feita por espectroscopia de infravermelho e RMN de ^1H e ^{13}C 1D e 2D. No espectro de infravermelho (FIGURA 30) é possível observar as bandas em 1216 cm^{-1} , correspondente ao estiramento assimétrico da ligação S=O e em 577 cm^{-1} correspondente ao dobramento da ligação O=S=O (PRADO-FERNÁNDEZ et al., 2003), confirmando a entrada do grupo sulfato na molécula.

FIGURA 30 – ESPECTRO DE INFRAVERMELHO DAS AMOSTRAS AGAROSE REDUZIDA AGR (A) E AGAROSE SULFATADA AS (B)



NOTA: Região entre 4000 e 500 cm^{-1}

FONTE: A autora (2019)

O espectro de RMN de ^1H - ^{13}C HSQC da amostra AS (FIGURA 31), foi analisado utilizando como base trabalhos de sulfatação da agarose (LIANG et al., 2014; MATSUHIRO et al., 2014), de caracterização da agarose 6-O sulfatada (HU et al., 2012, ZHAO et al., 2017) e também trabalhos de sulfatação e dessulfatação de carragenanas (KOLENDER, MATULEWICZ, 2004; ARAÚJO et al., 2013). No espectro é possível observar a sulfatação no C6 do anel de β -D-galactopiranosose pelo deslocamento da correlação C6/H6 de $62,3/3,63; 3,69$ ppm para $69,8/4,27; 4,20$ ppm e pelo deslocamento sofrido pelo C e H vizinhos, C5/H5 de $76,9/3,56$ ppm para $75,0/4,06$ ppm.

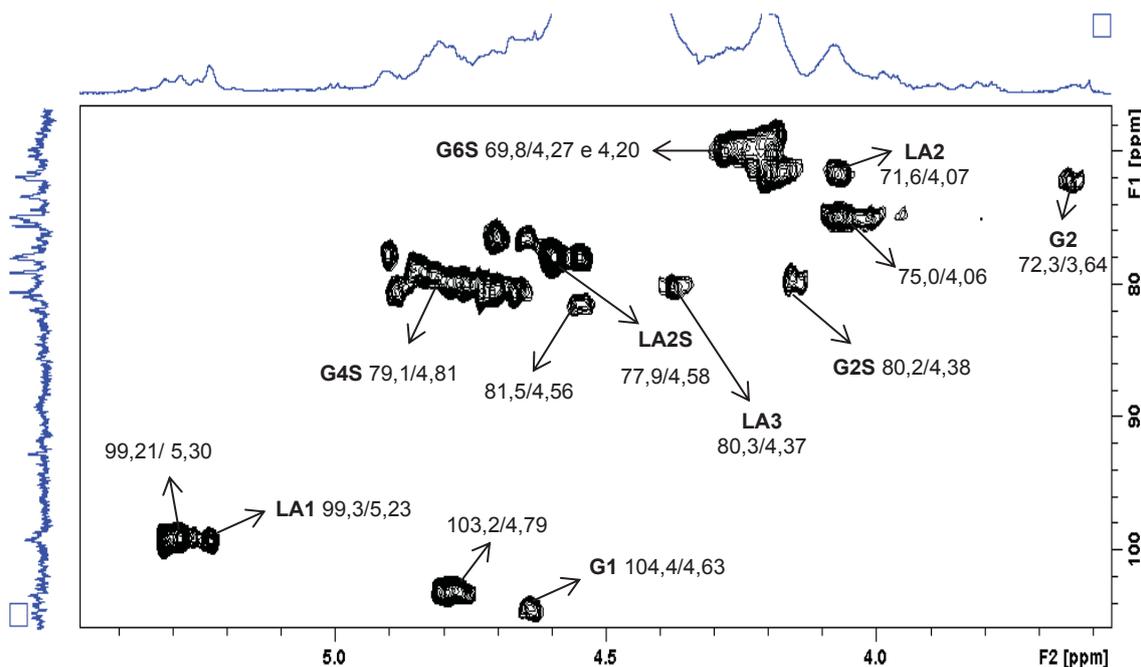
Neste mesmo anel é possível observar a sulfatação em C2 pelo deslocamento da correlação C2/H2 de 71,6/3,54 ppm para 80,2/4,38 ppm e um deslocamento na correlação C1/H1 de 104,4/4,66 ppm para 103,2/4,79 ppm. No espectro de RMN de ^1H - ^1H COSY (FIGURA 31) aparece a correlação 4,38/4,79 que corresponde a H1/H2 da unidade sulfatada na posição 2, confirmando o assinalamento da correlação C1/H1 desta unidade na figura 31. No entanto ainda se observa nesta a correlação de C2/H2 não sulfatado em 72,23/3,64 ppm e de C1/H1 em 103,2/4,79, indicando que existem unidades de β -D-Galp não sulfatadas em C2. Ainda no anel de β -D-galactopiranosose, observa-se a sulfatação em C4, pelo deslocamento da correlação C4/H4 de 69,9/3,92 ppm para 79,1/4,81 ppm. A sulfatação do C2 e C4 da unidade de β -Galp gera um deslocamento de C3/H3, assim, a correlação em 4,15/79,4 ppm foi assinalada como C3/H3 do anel de β -D-Galp da agarose (KOLENDER, MATULEWICZ, 2004; ARAÚJO et al., 2013). Esse assinalamento foi confirmado por RMN de ^1H - ^1H COSY (FIGURA 33) em que é possível observar a correlação ^1H - ^1H em 4,15/4,81 correspondente à H3/H4 da unidade de β -D-Galp sulfatada na posição 4.

No anel de 3,6-anidro- α -L-galactopiranosose ocorreu sulfatação em C2, o que foi observado pelo deslocamento da correlação C2/H2 de 71,9/3,94 ppm para 77,9/4,58 ppm (FIGURA 31), gerando assim também o deslocamento de C3/H3 de 81,7/4,32 ppm para 81,5/4,56. No entanto, ainda é possível observar a correlação em 72,3/3,64 ppm correspondente a C2/H2, em 80,3/4,37 ppm correspondente a C3/H3 e em 99,3/5,23 ppm correspondente à C1/H1 desta unidade não sulfatada em C2, indicando que a sulfatação em C2 deste anel foi parcial. Os assinalamentos do anel de 3,6-anidro- α -L-galactopiranosose sulfatado em C2 e não sulfatado foram confirmados também por RMN de ^1H - ^1H COSY e TOCSY. No espectro de COSY (FIGURA 32) é possível observar a correlação ^1H - ^1H em 5,23/4,07 e 4,07/4,37 ppm correspondente ao H1/H2 e H2/H3, respectivamente da unidade de 3,6-anidro- α -L-galactopiranosose. Em 5,30/4,58 ppm foi observada a correlação correspondente ao H1/H2 da unidade de 3,6-anidro- α -L-galactopiranosose 2-sulfato.

Dessa forma, o espectro indica a sulfatação total na posição 6 e 4 do anel de β -D-galactopiranosose e sulfatação parcial nas posições 2 do anel de β -D-galactopiranosose e 3,6-anidro- α -L-galactopiranosose. O assinalamento da díade sulfatada proposto está apresentado na tabela 6.

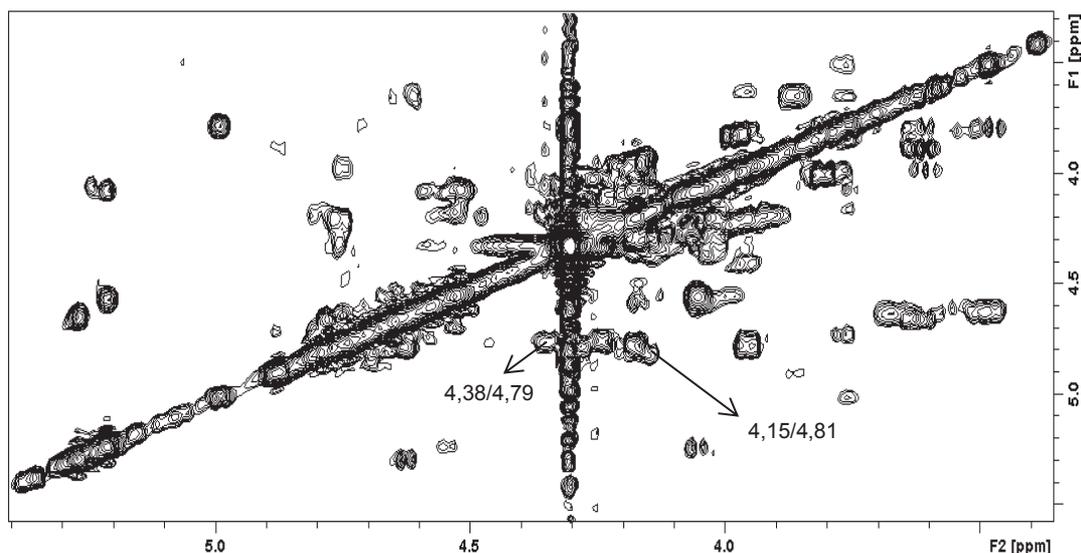
A massa molar média (Mw) do polissacarídeo AS foi determinada utilizando-se cromatografia de exclusão estérica de alta precisão acoplada a espalhamento de luz laser em multiângulos (HPSEC/MALLS). O perfil de eluição obtido por HPSEC/MALLS acoplado ao detector de índice de refração da amostra (FIGURA 33) mostra que houve a formação de um pico em 49,4 minutos, e por comparação à uma curva de dextrana foi determinada a massa de aproximadamente 42.157 g/mol. A massa molar da agarose reduzida (AGR), substrato da reação, é 110.000 g/mol, dessa forma houve uma considerável diminuição da cadeia polissacarídica, provavelmente devido ao pH baixo do meio de sulfatação que gerou degradação do polissacarídeo por hidrólise ácida, o que também foi relatado para carragenanas (ARAÚJO et al., 2013).

FIGURA 31 – MAPA DE CORRELAÇÃO ^1H - ^{13}C HSQC DA AGAROSE SULFATADA (AS)



NOTA: Solvente: D_2O (70 °C); acetona como padrão interno ($\delta = 2,21$ e $32,69$ ppm para ^1H e ^{13}C), Van de Velde; Rollema (2008).

FONTE: A autora (2019)

FIGURA 32 – MAPA DE CORRELAÇÃO ^1H - ^1H COSY DA AGAROSE SULFATADA (AS)

NOTA: Solvente: D_2O (70 °C); acetona como padrão interno ($\delta = 2,21$ para ^1H), Van de Velde; Rollema (2008).

FONTE: A autora (2019)

TABELA 6 – DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DE ^1H E ^{13}C DAS DIADES DE AGAROSE NATIVA E AGAROSE SULFATADA (AS)

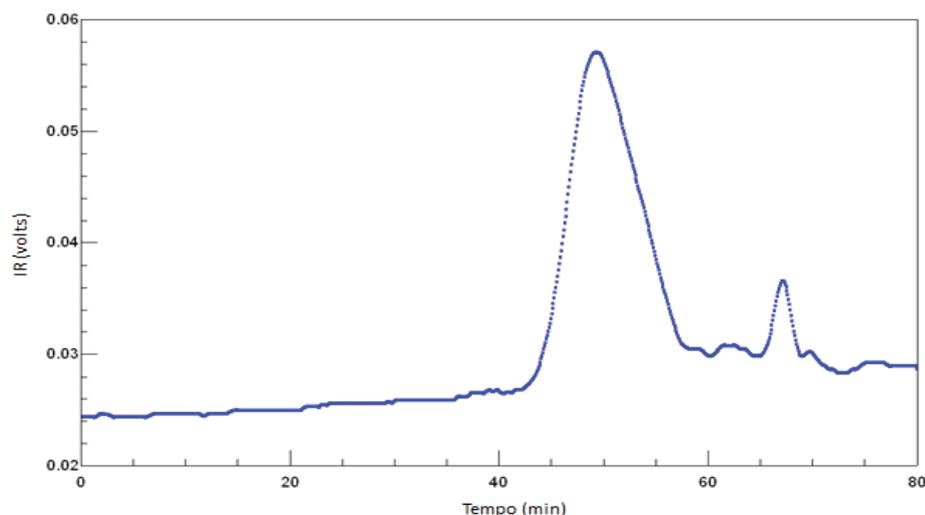
^a Deslocamentos químicos (ppm) $^{13}\text{C}/^1\text{H}$							
Amostra	^b Un.	1	2	3	4	5	6
AGR	G	104,4 4,66	71,6 3,54	82,6 3,65	69,9 3,92	76,9 3,56	62,3 3,63/3,69
	LA	99,3 5,19	71,9 3,94	81,7 4,32	76,6 4,47	78,0 4,64	70,3 4,03
AS	G2S,4S,6S	103,2 4,79	80,2 4,38	74,7 4,00	79,1 4,81	75,0 4,06	69,8 4,27/4,20
	LA2S	99,2 5,30	77,9 4,58	81,5 4,56	76,4 4,70	77,9 4,54	71,5 4,20

NOTA: ^aFoi utilizado como padrão interno acetona (2,21 e 32,69 ppm para ^1H e ^{13}C respectivamente)

^b Os códigos de letras são baseados na nomenclatura desenvolvida por Knutsen et al (1994).

G2S = C2/H2 da unidade β -D-galactopiranosose, LA2S = C2/H2 da unidade de 3,6 anidro α -L-galactopiranosose,

FIGURA 33 – CROMATOGRAMA DA AGAROSE SULFATADA OBTIDO POR HPSEC/MALLS ACOPLADO AO DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO (IR)



FONTE: A autora (2019)

Polissacarídeos com alto grau de sulfatação apresentam habilidades por ligarem em proteínas humanas e de modo geral maior tendência a apresentar propriedades biológicas, tais como anticoagulante, antioxidantes e antitumorais. Sabe-se que o aumento do grau de sulfatação geralmente está associado a um maior efeito anticoagulante, apesar de outros fatores tais como posição de substituição por grupo sulfato e a massa molar do polissacarídeo estarem associadas à estas atividades (OPOKU et al. 2006, PEREIRA et al., 2015, MATSUHIRO et al., 2014).

Neste trabalho foi produzida uma agarose persulfatada com DS de 2,7. Na literatura já foram realizadas sulfatações da agarose (YOUPING et al. 2012, MATSUHIRO et al., 2014, LIANG et al. 2014). No trabalho de Youping e colaboradores (2012) foram obtidas moléculas de DS 0,77 a 1,1, enquanto nos trabalhos de Matsuhira et al (2014) e Liang et al (2014) foram obtidas moléculas com 35,5 % e 35,3 % de grupos sulfatos respectivamente (DS de aproximadamente 2). No presente trabalho houve maior grau de sulfatação do polissacarídeo, produzindo um derivado de interesse para posterior estudo de suas propriedades biológicas.

5.2.2 Semissíntese do derivado C6 oxidado da agarose (AO)

A oxidação regioseletiva de polissacarídeos utilizando o reagente TEMPO transforma unidades monossacarídicas em seus respectivos ácidos urônicos. Esta reação pode introduzir ao polissacarídeo uma maior capacidade geleificante, complexadora e antifloculante e ampliar suas aplicações dentro da área biológica (PEREZ, MONTANARI, VIGNON, 2003, PONEDEL'KINA; KHAIBRAKHMANOVA; ODINOKOV, 2010, SU et al., 2013, PIERRE et al., 2017).

Neste trabalho a oxidação seletiva foi realizada com o reagente de oxidação TEMPO (*N-oxil-2,2,6,6-tetrametilpiperidina*), sob condição alcalina e utilizando TCCA (ácido triclorohisocianúrico) como co-oxidante. Essa forma de oxidação é um método efetivo de introduzir carboxila em polissacarídeos, mostrando alta seletividade de oxidação do carbono 6, que contém uma hidroxila primária, além de apresentar alta taxa de reação, ocorrendo em uma única etapa sem necessidade de precauções como atmosfera inerte ou solvente (EVIER et al., 1995; BRAGD et al., 2004 DING et al., 2008, PIERRE et al., 2017).

No presente trabalho reações de oxidação da agarose foram realizadas utilizando os reagentes TEMPO/TCCA, como base no trabalho de dos Santos-Fidencio et al (2019) de oxidação de carragenanas e Heuko (2015) de oxidação da amino agarose. A obtenção do derivado oxidado da agarose se deu através da oxidação seletiva do carbono 6 do anel de β -D-galactopiranosose. A reação foi realizada em tampão $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$, de pH 9,5, para manutenção do pH básico durante toda a reação, uma vez que se sabe que o ambiente alcalino é fundamental para seletividade da oxidação de álcoois primários (BAILEY et al., 2007). Ao fim das reações foi adicionado NaBH_4 para reduzir o derivado carbonílico, intermediário desta reação, que poderia ter sido formado (COSENZA et al., 2015).

Foram realizadas algumas reações alterando-se o tempo de reação (TABELA 7). Foram estudados os tempos de 24, 18 e 6 h conforme apresentado nas entradas 1, 2 e 3 da tabela 7, respectivamente. A oxidação da molécula leva à formação de uma unidade de ácido galacturônico, dessa forma os produtos foram monitorados por dosagem de ácidos urônicos (FILISSETTI-COZZI, CARPITA 1991) e o grau de oxidação do polissacarídeo foi calculado por RMN de ^1H - ^{13}C HSQC, através da integração das correlações correspondentes aos C5/H5 do anel de β -D-

galactopirranose em 77,4/3,72 e GU5, correspondente a C5/H5 deslocado pela oxidação em C6, em 77,2/4,16 ppm, conforme representado na equação 4, item 4.4.

TABELA 7– REAÇÕES TESTADAS PARA OXIDAÇÃO DA AGAROSE



Entrada	Reação	Tempo (h)	Dosagem de ácido urônico (g%) ^a	RMN ^b
1	AGROX3	24	50%	97%
2	AGROX1	18	53%	90%
3	AGROX4	6	44%	90%

NOTA: ^a Porcentagem de conversão da unidade de galactose em unidade de ácido galacturônico determinada pelo método turbidimétrico de Filisetti-Cozzi e Carpita, 1991.

^b Porcentagem de conversão da unidade de galactose em unidade de ácido galacturônico, calculada por RMN de ¹H-¹³C HSQC.

Todas as entradas apresentaram altos graus de oxidação, representada pela formação de aproximadamente 50% na dosagem de ácido galacturônico, indicando aproximadamente 100% de oxidação das amostras, uma vez que somente uma unidade do dissacarídeo pode ser oxidada. As quantidades calculadas por HSQC indicaram oxidações acima de 90%. Foi escolhida a reação da entrada 3 para fazer a reação em escala preparativa, pois o tempo de reação era menor.

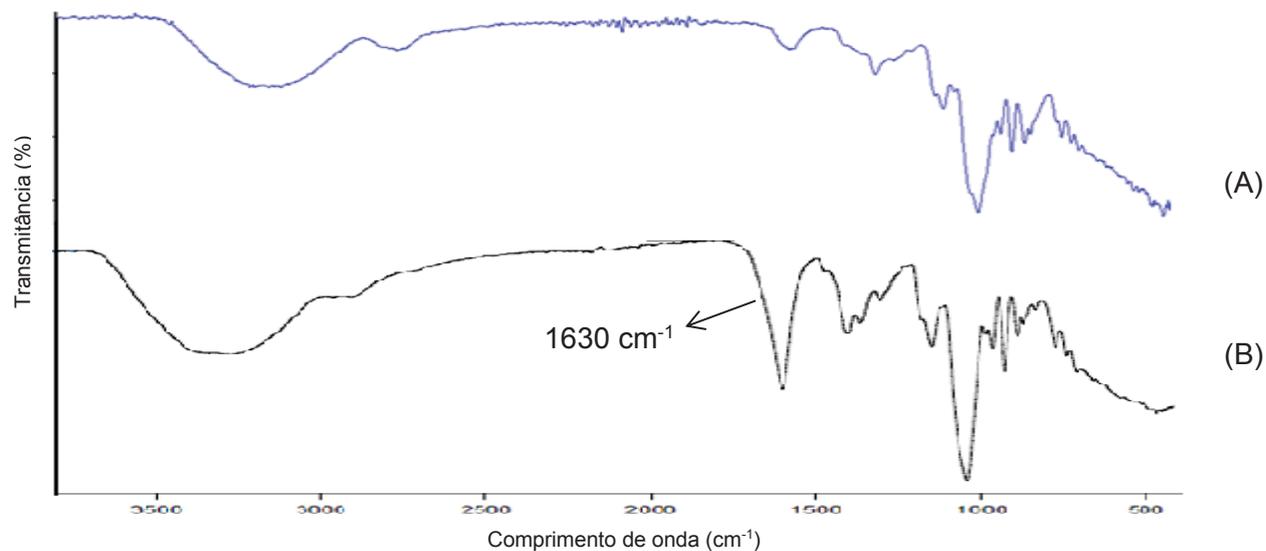
Assim, foram oxidados 1 g de agarose nativa, obtendo-se 672 mg do derivado oxidado (AO), com recuperação de 64%. O produto apresentou 43% de ácido galacturônico, coerente com o valor encontrado em escala analítica (tabela 7, entrada 3) e foi caracterizado por espectroscopia de infravermelho e RMN de ¹H e ¹³C 1D e 2D. A análise do espectro de infravermelho (FIGURA 34) mostrou o aparecimento de uma banda em 1630 cm⁻¹ correspondente ao estiramento simétrico -COO⁻ (SU et al., 2013), indicando a oxidação da amostra e formação da carboxila. No RMN de ¹H-¹³C HSQC da amostra oxidada AO (FIGURA 35) foi observado o deslocamento da correlação de C5/H5 de 77,4/3,72 ppm para 77,2/4,05 ppm e de C4/H4 (que sai sobreposto ao sinal do C2/H2 da unidade de 3,6-anidro- α -L-galactopirranose) de 71,0/4,10 ppm para 72,2/4,40 ppm, devido a transformação da unidade de

β -D-galactopiranosose em β -D-galactopiranosidurônico. Deslocamentos semelhantes foram encontrados na amino agarose carboxilada e nas carragenanas oxidadas (HEUKO, 2015; SANTOS, 2015). Ainda é possível observar a correlação correspondente ao C6/H6 da unidade de β -D-galactopiranosose em 63,3/3,75 ppm em baixa intensidade, indicando que a oxidação foi quase completa. O cálculo do grau de oxidação (Equação 4, item 4.4) foi de 97%. O assinalamento da díade oxidada proposta está apresentado na tabela 8.

A metodologia clássica para determinação da composição monossacarídica é baseada na hidrólise ácida e posterior derivatização dos monossacarídeos a alditóis acetatos, que em seguida são determinados e quantificados utilizando cromatografia gasosa (GC-MS ou GLC-FID). No entanto estas técnicas não foram utilizadas para esta amostra, pois a presença do grupo carboxila dificulta a hidrólise e derivatização dos monossacarídeos (COSENZA et al., 2015). Assim, para a amostra AO, foi feita a quantificação do teor de 3,6 anidro galactose e ácido galacturônico (unidades que formam a díade da agarose oxidada), através da metodologia do resorcinol (YAPHE, ARSENAULT, 1965) e da dosagem de ácidos urônicos (FILISSETTI-COZZI, CARPITA, 1991), respectivamente. A dosagem do teor de 3,6 anidro foi de 27% e a dosagem de ácidos urônicos desta amostra foi de 43%. Para amostra nativa (AGR) foi observado um teor de 49% de 3,6 anidro-galactose determinado pela composição monossacarídica por GLC-FID, enquanto o valor pela metodologia do resorcinol foi de 33% de 3,6 anidro, próximo ao encontrado para a amostra AO (27%). O valor de ácidos urônicos indica que aproximadamente a outra metade (43%) se apresenta na forma de ácido galacturônico, confirmando assim que a oxidação nas unidades de β -D-galactopiranosose foi quase total.

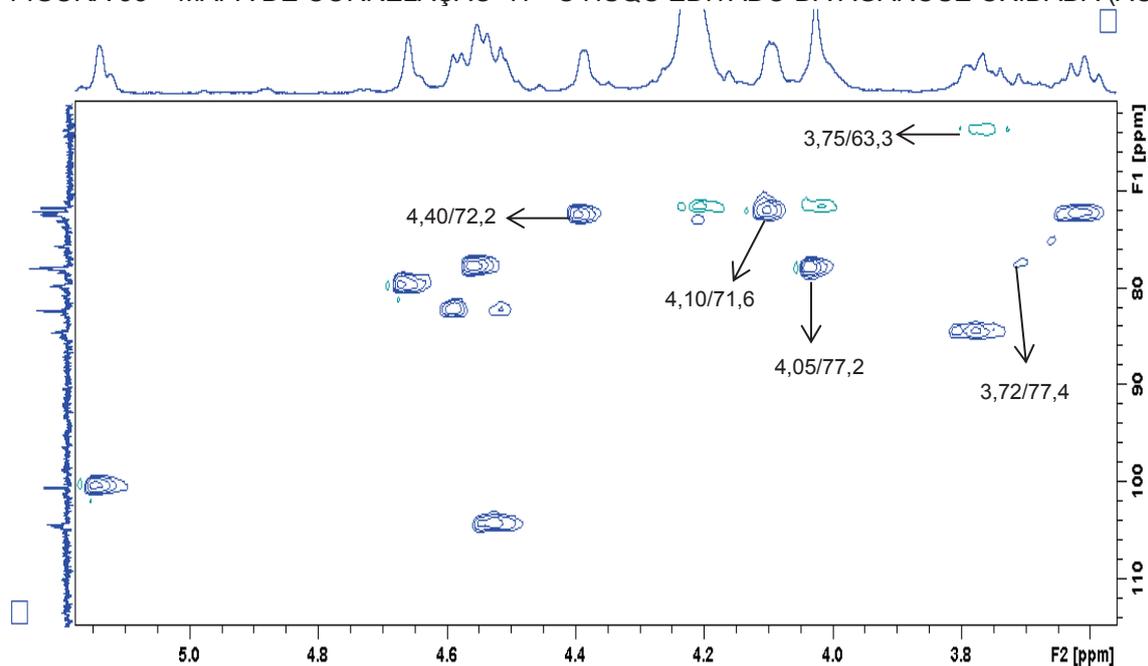
A amostra AO foi analisada utilizando HPSEC/MALLS-RI. No entanto, o perfil de eluição utilizando o detector de índice de refração se mostrou heterogêneo (FIGURA 36). Isso pode ter ocorrido pela baixa solubilidade da molécula em solução aquosa e possível formação de agregados. Dessa forma, o Mw desta amostra não foi determinado.

FIGURA 34 – ESPECTRO DE INFRAVERMELHO DAS AMOSTRAS AGAROSE NATIVA (AGR) E AGAROSE OXIDADA (AO)



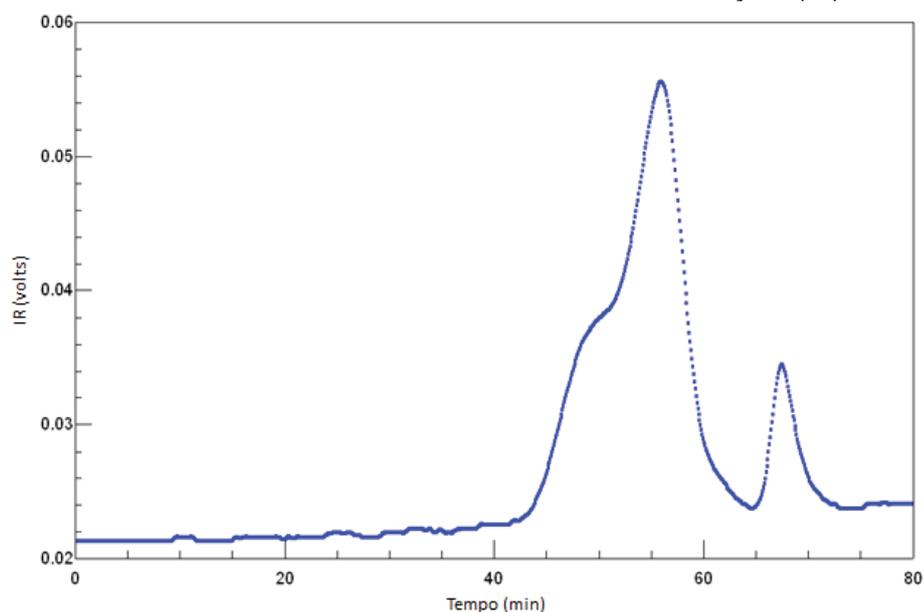
NOTA: Região entre 4000 e 500 cm^{-1}
 FONTE: A autora (2019)

FIGURA 35 – MAPA DE CORRELAÇÃO ^1H - ^{13}C HSQC EDITADO DA AGAROSE OXIDADA (AO)



NOTA: Solvente: D_2O (70 $^{\circ}\text{C}$); acetona como padrão interno ($\delta = 2,21$ e $32,69$ ppm para ^1H e ^{13}C), Van de Velde; Rollema (2008). pH 7.
 FONTE: A autora (2019)

FIGURA 36- CROMATOGRAMA DA AGAROSE OXIDADA (AO) OBTIDO POR HPSEC/MALLS ACOPLADO AO DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO (IR)



FONTE: A autora (2019)

TABELA 8- DESLOCAMENTOS DE ^1H E ^{13}C DAS DIADES DE AGAROSE NATIVA E AGAROSE C-6 OXIDADA (AO)

^a Deslocamentos químicos (ppm) $^{13}\text{C}/^1\text{H}$

Amostra	^b Un.	1	2	3	4	5	6
AGR	G	103,9 4,41	71,6 3,54	82,6 3,65	69,9 3,92	76,9 3,56	62,3 3,63/3,69
	LA	99,3 5,19	71,9 3,94	81,7 4,32	76,6 4,47	78,0 4,64	70,3 4,03
AO	^c GU	104,3 4,57	71,9 3,61	84,2 3,79	72,2 4,40	77,2 4,05	
	LA	100,4 5,14	71,8 4,11	82,0 4,57	77,5 4,56	79,4 4,66	71,4 4,02/4,42

NOTA ^a Foi utilizado o padrão interno acetona (2,21 e 32,69 ppm para ^1H e ^{13}C respectivamente)

^b Os códigos de letras são baseadas na nomenclatura desenvolvida por Knutsen *et al* (1994).

^c GU = β -D-galactopiranosidurônico, G= β -D-galactopiranoose, LA= 3,6 anidro α -L-galactopiranoose

Até o presente momento, foram relatados dois trabalhos de oxidação da agarose (SU *et al.* 2013; FORGET *et al.*, 2013). Ambos os estudos utilizaram um sistema TEMPO com NaBr e NaClO, o pH foi mantido em 10 – 11 e com adição de solução de NaOH. Su *et al.* (2013) em condições otimizadas alcançaram um valor máximo de 30% de oxidação e relataram a possível entrada do grupo carboxila em outras posições, bem como a despolimerização significativa do polissacarídeo (que

ao fim apresentou a massa de 4 Kda). No presente estudo, em condições otimizadas foi possível observar até 97 % de oxidação, semelhante ao encontrado por Forget et al (2013) que relatou grau de oxidação de até 93 %.

No presente trabalho o derivado oxidado da agarose foi pela primeira vez sintetizado utilizando o sistema TEMPO/TCCA demonstrando o sucesso da utilização deste sistema oxidante em tampão carbonato para oxidação deste polissacarídeo.

5.2.3 Semissíntese do derivado parcialmente oxidado em C6 da agarose (AOP)

Foi sintetizado também um derivado parcialmente oxidado em C6 da agarose (AOP). A estratégia de oxidação utilizada foi a mesma realizada para o derivado oxidado, modificando apenas o tempo de reação. Para esta reação foram utilizados 500 mg de agarose e a reação ocorreu por 3 horas em solução tampão $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$, de pH 9,5, com controle do pH durante todo o tempo. Ao fim obteve-se 378 mg do polissacarídeo com 76% de recuperação em massa.

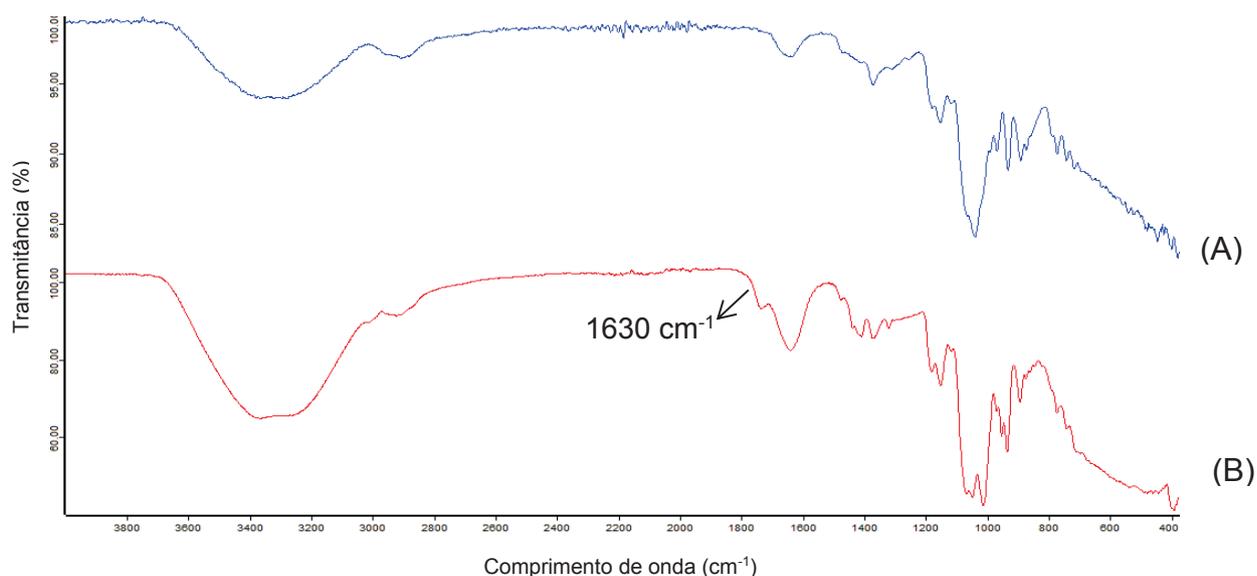
A amostra apresentou uma dosagem de ácido urônico (FILISSETTI-COZZI, CARPITA 1991) de 21%, indicando a formação da unidade de ácido galacturônico. A espectroscopia de infravermelho mostrou o aparecimento de uma banda em 1630 cm^{-1} correspondente ao estiramento simétrico $-\text{COO}^-$ (SU et al., 2013) (FIGURA 37) como também observado no derivado com maior grau de oxidação (FIGURA 34), mas para a presente amostra o aparecimento da banda foi mais discreto.

Da mesma forma, a caracterização foi feita por espectroscopia de RMN de ^{13}C e ^1H , 1D e 2D. No espectro de RMN de $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ HSQC da amostra oxidada AOP (FIGURA 38), foi observado ainda a presença da correlação correspondente ao C6/H6 do anel de $\beta\text{-D-Galp}$ em 62,3/3,63 e 3,69 ppm, indicando que a oxidação não foi completa (100%). É possível observar o deslocamento da correlação de C5/H5 deste mesmo anel, de 76,9/3,56 ppm para 77,2/4,16 ppm e de C4/H4 de 69,9/3,92 ppm para 71,9/4,42 ppm, devido a transformação da unidade de $\beta\text{-D-galactopiranosose}$ em $\beta\text{-D-galactopiranosidurônico}$. O cálculo do grau de oxidação (Equação 4, item 4.4) indicou 51 % de oxidação, coerente com o resultado encontrado pela dosagem de ácidos urônicos.

A amostra AOP também foi analisada por dosagem colorimétrica para quantificar o 3,6 anidro galactose e ácido galacturônico. Foi observado um teor de 32% de 3,6 anidro galactose, similar ao encontrado para a amostra nativa e oxidada, 33% e 27%, respectivamente, indicando que aproximadamente metade da díade se apresenta na forma de anel 3,6 anidro. Foi encontrado para a amostra AO 18% de ácidos urônicos, confirmando assim que a oxidação nas unidades de β -D-galactopiranosose foi parcial.

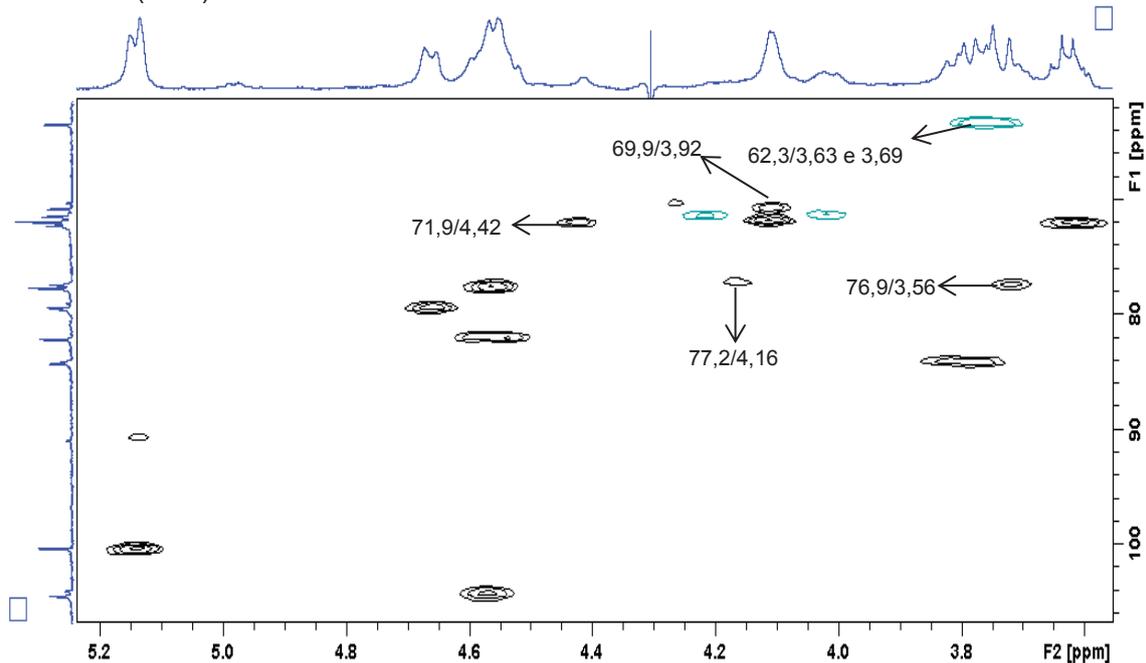
A amostra AOP foi analisada por HPSEC/MALLS-RI. No entanto, da mesma forma como ocorreu com a amostra oxidada (AO) o perfil de eluição no detector de índice de refração se mostrou heterogêneo indicando mais de uma população de moléculas (FIGURA 39). Assim utilizando esta técnica não foi possível determinar a massa molar (Mw) do derivado oxidado.

FIGURA 37 – ESPECTRO DE INFRAVERMELHO DAS AMOSTRAS AGAROSE NATIVA (A) E AGAROSE PARCIALMENTE OXIDADA AOP (B)



NOTA: Região entre 4000 e 500 cm⁻¹
FONTE: A autora (2019)

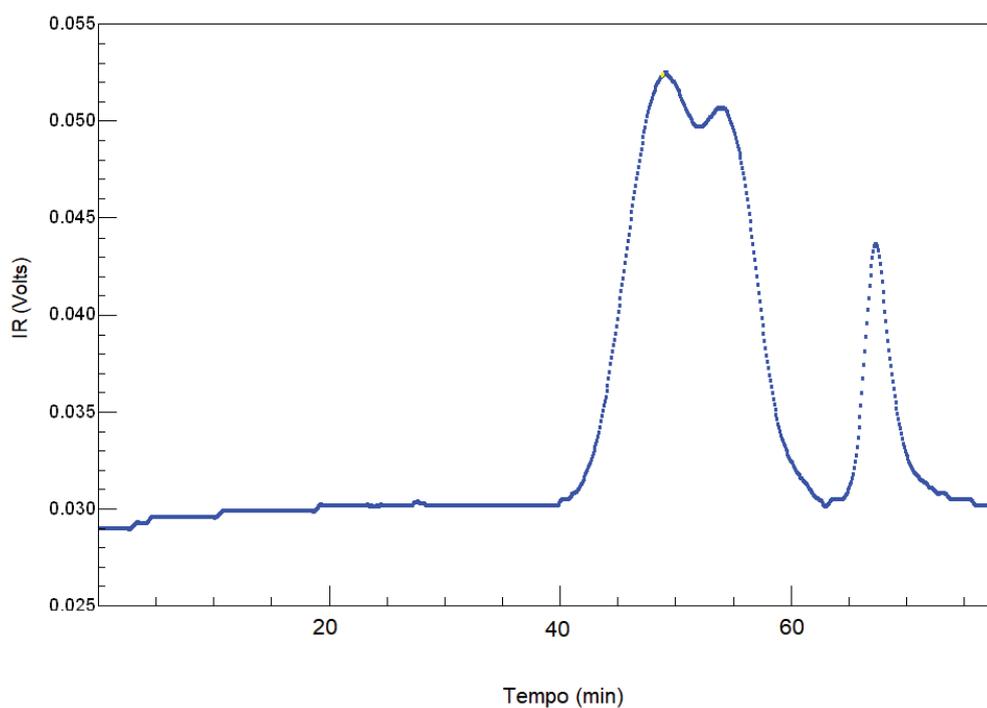
FIGURA 38 – MAPA DE CORRELAÇÃO ^1H - ^{13}C HSQC EDITADO DA AGAROSE PARCIALMENTE OXIDADA (AOP)



NOTA: Solvente: D_2O (70 °C); acetona como padrão interno ($\delta = 2,21$ e $32,69$ ppm para ^1H e ^{13}C), Van de Velde; Rollema (2008). pH 7.

FONTE: A autora (2019)

FIGURA 39 CROMATOGRAMA DA AGAROSE PARCIALMENTE OXIDADA (AOP) OBTIDO POR HPSEC/MALLS ACOPLADO AO DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO (IR)



O derivado parcialmente oxidado (AOP) foi sintetizado com sucesso, apenas reduzindo-se o tempo de oxidação. A oxidação da agarose e geração dos derivados contendo unidades de ácidos urônicos pode aumentar as propriedades de superfície deste polissacarídeo, bem como sua capacidade complexadora e geleificante, ampliando suas aplicações dentro da área biológica (PONEDEL'KINA; KHAIBRAKHMANOVA; ODINOKOV, 2010, SU et al., 2013, PIERRE et al., 2017).

5.2.4 Semissíntese do derivado parcialmente oxidado em C6 e sulfatado da agarose (AOPS)

Com base na melhor condição para sulfatação obtida com a amostra AS, foi realizada a sulfatação da agarose parcialmente oxidada AOP para obtenção de uma molécula sulfatada e com menor grau de oxidação.

Para esta reação, 200 mg de agarose parcialmente oxidada (AOP) na forma de sal de trietilamônio foi sulfatada em DMFa, a 30°C por 24 h. Ao fim da reação foram obtidos 81 mg da amostra parcialmente oxidada e sulfatada com uma recuperação de 41 % da massa inicial. A colorimetria do DMMB indicou sulfatação da amostra e esta apresentou um grau de substituição por grupos sulfatos (DS) de 2,5, a partir da dosagem de grupos sulfatos por turbidimetria (DODGSON E PRINCE, 1962).

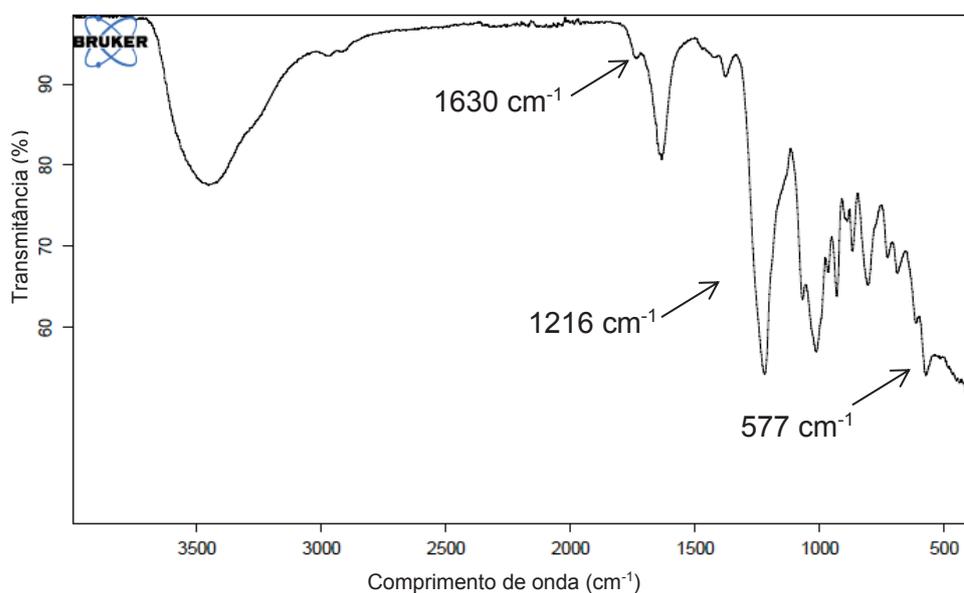
No espectro de infravermelho da amostra AOPS (FIGURA 40), foi possível observar as bandas em 1630 cm^{-1} correspondente ao estiramento simétrico $-\text{COO}^-$, em 1216 cm^{-1} , correspondente ao estiramento assimétrico da ligação $\text{S}=\text{O}$ e em 577 cm^{-1} correspondente ao dobramento da ligação $\text{O}=\text{S}=\text{O}$ (PRADO-FERNÁNDEZ et al., 2003, SU et al., 2013), confirmando a entrada do grupo sulfato na molécula parcialmente oxidada.

No espectro de RMN de $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ HSQC da amostra AOPS (FIGURA 41), foi possível observar a sulfatação total em C6 do anel de $\beta\text{-D-Galp}$, pelo desaparecimento da correlação C6/H6 de 62,3/3,63; 3,69 ppm e o aparecimento da correlação em 69,4/4,22; 4,29 ppm, bem como pelo aparecimento da correlação em 74,9/4,06 ppm correspondente à C5/H5 após sulfatação na posição 6. Neste mesmo anel é possível observar a sulfatação em C2, pelo aparecimento da correlação em 80,2/4,38 ppm e em C4, observada pela correlação em 78,6/4,87 ppm. No anel de 3,6 anidro-galactopiranosose também ocorreu sulfatação no C2, o que foi observado pelo aparecimento da correlação em 77,7/4,60 ppm. Não foram observadas correlações correspondentes às posições G2, G4, G6 e LA2 não sulfatadas na amostra.

Assim, esta amostra foi ainda analisada pela dosagem de ácidos urônicos (FILISETTI-COZZI, CARPITA, 1991), para confirmar a presença da carboxila após a sulfatação, apresentado 13% de ácidos urônicos, indicando que o produto sulfatado formado ainda estava parcialmente oxidado.

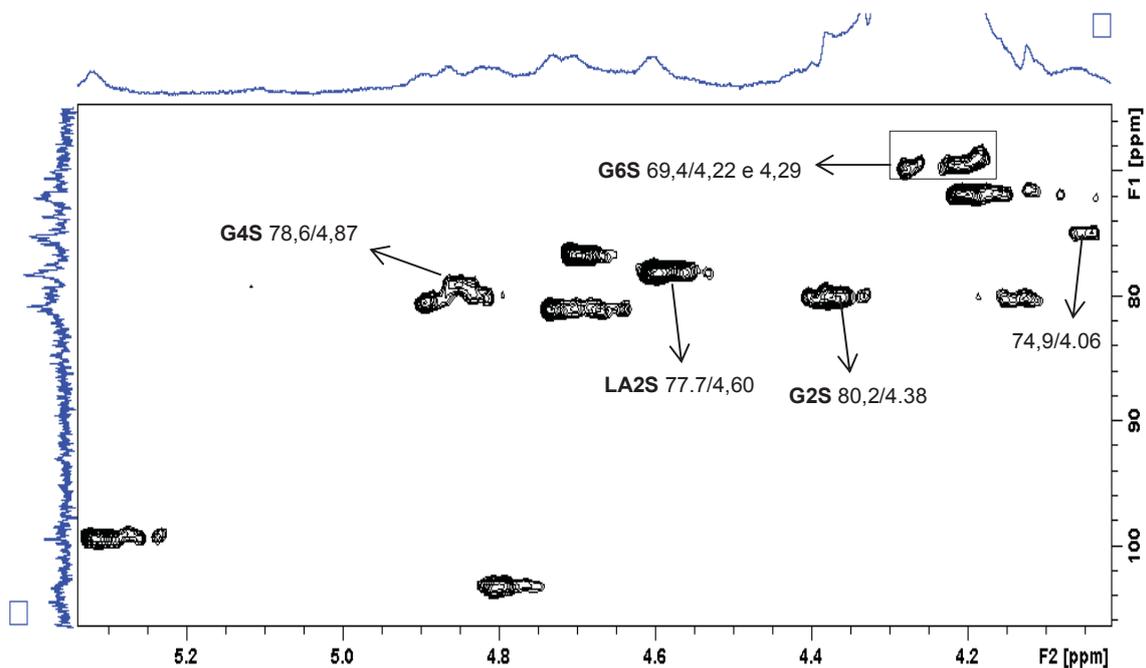
O cromatograma obtido por HPSEC/MALLS acoplado ao detector de índice de refração da amostra (FIGURA 42) mostrou a presença de um pico em 51,33 minutos, e por comparação à uma curva de dextrana foi determinada a massa de aproximadamente 35.481 g/mol.

FIGURA 40 – ESPECTRO DE INFRAVERMELHO DA AGAROSE PARCIALMENTE OXIDADA E SULFATADA (AOPS)



NOTA: Região entre 4000 e 500 cm^{-1}
FONTE: A autora (2019)

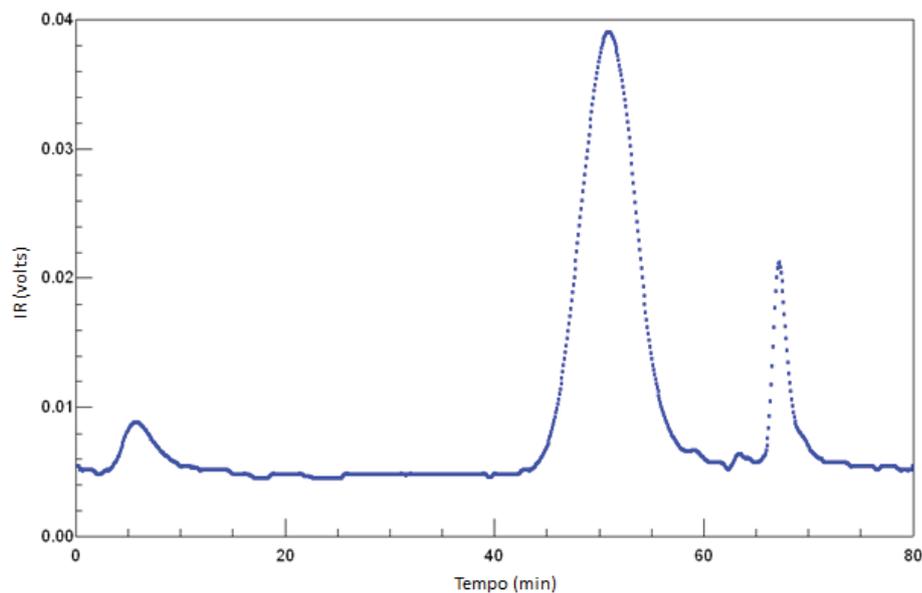
FIGURA 41 – MAPA DE CORRELAÇÃO ^1H - ^{13}C HSQC DA AGAROSE PARCIALMENTE OXIDADA E SULFATADA (AOPS)



NOTA: Solvente: D_2O (70°C); acetona como padrão interno ($\delta = 2,21$ e $32,69$ ppm para ^1H e ^{13}C), Van de Velde; Rollema (2008). pH 7.

FONTE: A autora (2019)

FIGURA 42 - CROMATOGRAMA DA AGAROSE PARCIALMENTE OXIDADA E SULFATADA (AOPS) OBTIDO POR HPSEC/MALLS ACOPLADO AO DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO (IR)



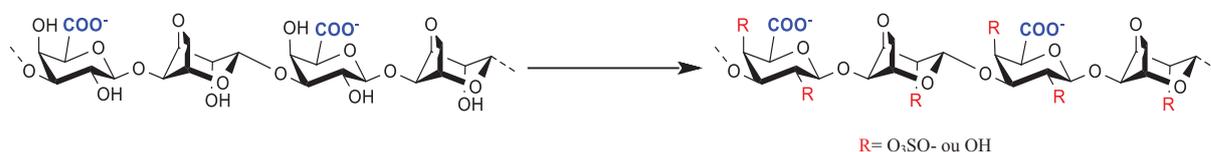
FONTE: A autora (2019)

Dessa forma, foi sintetizado o derivado inédito parcialmente oxidado e sulfatado da agarose (AOPS). A análise de HSQC do produto indicou entrada do grupo sulfato em todas as posições livres do polissacarídeo, formando um produto persulfatado. Mesmo não sendo possível observar correlações associadas à díade oxidada no RMN, a espectroscopia de infravermelho, bem como a dosagem de ácidos urônicos, indicaram a presença da carboxila na amostra.

5.2.5 Semissíntese do derivado oxidado em C6 e sulfatado da agarose (AOS)

O derivado oxidado (AO), que apresentou grau de oxidação de 97 % foi então sulfatado para síntese do derivado oxidado e sulfatado da agarose (AOS). Foram testadas 5 condições de síntese, variando os parâmetros: solvente da reação (DMSO e DMF), temperatura (30 e 75°C) e tempo da reação (7 e 24h) (TABELA 9). Os produtos de síntese foram avaliados pela colorimetria do DMMB (azul de dimetimetileno) (ENOBAXHARE, BADER, LEE, 1996).

TABELA 9 – REAÇÕES TESTADAS PARA SULFATAÇÃO DA AGAROSE OXIDADA



Entrada	Amostra	Solvente	Temperatura (°C)	Tempo (h)	DMMB
1	Sal trietilamônio	DMFa	30	7	NEGATIVO
2	Sal trietilamônio	DMSOa	30	7	NEGATIVO
3	Sal piridônio	DMSOa	30	7	NEGATIVO
4	Sal trietilamônio	DMFa	75	7	POSITIVO
5	Sal trietilamônio	DMFa	30	24	POSITIVO

NOTA: Reações realizadas com a adição de 20 equivalentes do complexo SO₃-piridina.

Inicialmente foi testada a solubilidade da agarose oxidada nos solventes orgânicos DMF e DMSO. A amostra se mostrou muito pouco solúvel nestes solventes e, assim, para testar as reações de sulfatação foram utilizadas amostras na forma de sais (de trietilamônio e piridônio) com o objetivo de melhorar a solubilidade da molécula.

A primeira condição apresentada na tabela 9 (entrada 1) foi realizada com a amostra oxidada na forma de sal de trietilamônio, em DMFa, a 30°C no tempo de 7 h. A solubilidade do substrato da reação melhorou consideravelmente na forma de sal, em comparação com a amostra nativa, no entanto ainda não houve solubilidade completa. Após purificação do produto, essa amostra apresentou um resultado negativo para o DMMB (coloração azul), indicando que não houve sulfatação. Na entrada 2 (TABELA 9), foi então modificado o solvente de síntese, utilizando-se DMSOa, no entanto, a amostra também não foi sulfatada. Como uma terceira tentativa foi feita a reação com a amostra na forma de sal de piridônio, pois utilizando a piridina como contra-íon esperava-se melhorar a solubilidade e tornar a reação mais homogênea. Esta reação (tabela 9, entrada 3) foi realizada em DMSOa e também apresentou um resultado negativo para o DMMB não indicando sulfatação.

Como a solubilidade da amostra na forma de sal de trietilamônio e de piridônio era muito parecida visualmente, optou-se por utilizar a forma trietilamônio para as reações seguintes pela maior facilidade na manipulação da trietilamina em comparação a piridina. O DMSOa se mostrou um solvente melhor para solubilização da molécula, no entanto relatos na literatura indicaram que este solvente não era adequado para sulfatação uma vez que poderia reagir com o agente sulfatante (SO_3 -piridina) (VARKEY, WITFIELD, SWERN, 1974).

Assim, nas reações seguintes (tabela 9, entrada 4 e 5) optou-se por usar o DMFa como solvente. Na entrada 4, o parâmetro de síntese modificado foi a temperatura da reação (75°C). Para esta reação o teste do DMMB mostrou-se positivo (formou uma coloração rosa fraca) indicando sulfatação da amostra. Por fim foi aumentado o tempo de reação (de 7 h para 24 h), e foi utilizada a temperatura de 30°C, e a colorimetria do DMMB indicou a formação de um produto sulfatado. Os produtos da entrada 4 e 5 tiveram seus grupos sulfato quantificados através da dosagem de sulfato, descrita por Dodgson e Prince (1962) e o grau de substituição (DS) calculado para as amostras foi de 0,9 e 2,4, respectivamente.

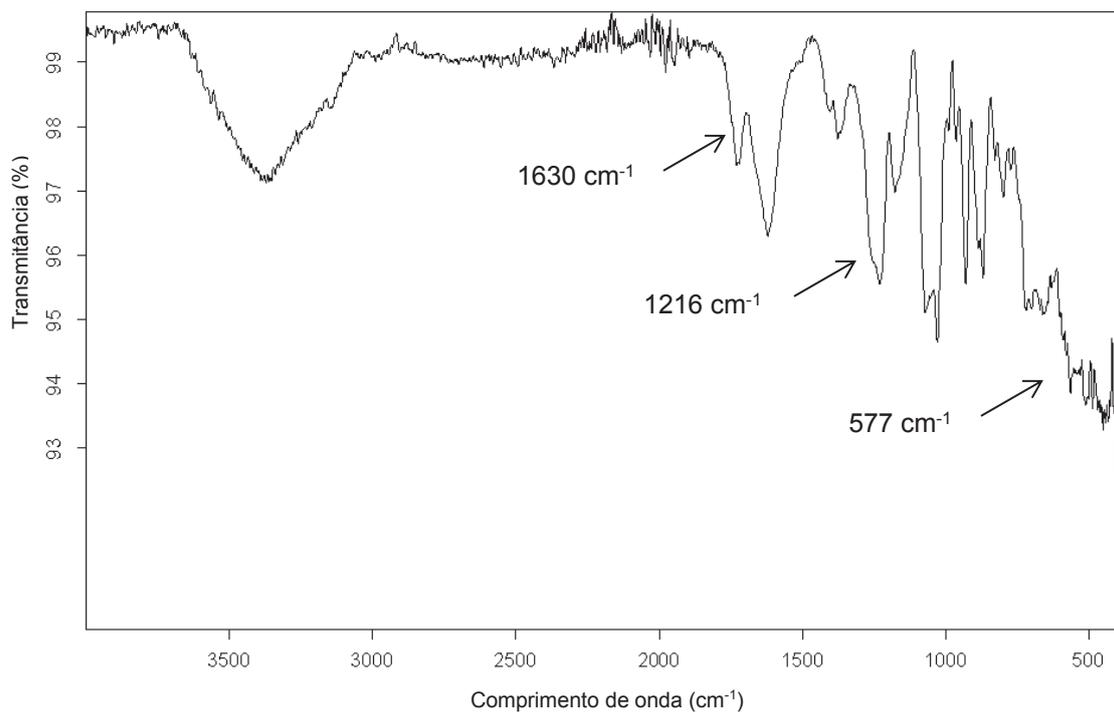
A amostra AOS de DS 2,4 (tabela 9, entrada 5) foi caracterizada por espectroscopia de infravermelho e RMN de ^1H e ^{13}C 1D e 2D. No espectro de infravermelho (FIGURA 43) é possível observar as bandas em 1630 cm^{-1} correspondente ao estiramento simétrico $-\text{COO}^-$ (SU et al., 2013), em 1216 cm^{-1} , correspondente ao estiramento assimétrico da ligação $\text{S}=\text{O}$ e em 577 cm^{-1} correspondente ao dobramento da ligação $\text{O}=\text{S}=\text{O}$ (PRADO-FERNÁNDEZ et al., 2003), confirmando a entrada do grupo sulfato na molécula oxidada. A amostra AOS foi ainda analisada pela dosagem de ácidos urônicos (FILISSETTI-COZZI, CARPITA, 1991) apresentado resultado positivo, indicando ainda a presença da carboxila após a reação de sulfatação.

Utilizando como base o assinalamento realizado para a agarose sulfatada (AS) e a agarose oxidada (AO), foi interpretado o espectro de RMN de ^1H - ^{13}C HSQC da amostra AOS (FIGURA 44). No espectro observa-se que ocorreu sulfatação no C2 do anel de 3,6 anidro galactopiranosose que aparece na correlação C2/H2 de $77,9/4,57$ ppm. Devido à sulfatação nesta posição é possível observar também a correlação em $80,0/4,69$ ppm, correspondente a C3/H3 vizinho e em $99,0/5,31$ ppm, correspondente a C1/H1. No entanto, ainda é possível observar que esta posição não foi totalmente sulfatada pois ainda há a presença da correlação C2/H2 em $71,6/4,11$ além das correlações de C3/H3 em $81,9/4,59$ ppm e de C1/H1 em $100,2/5,15$, correspondentes à unidade de 3,6 anidro galactopiranosose não sulfatada em C2.

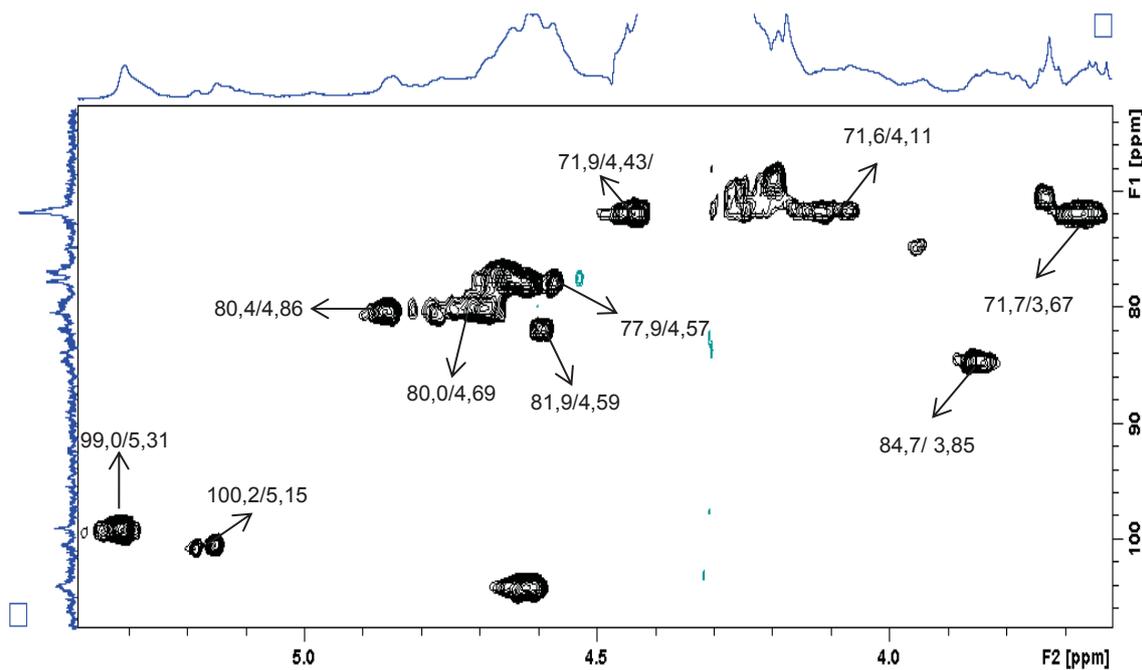
Com relação o anel de β -D-Galactopiranosidurônico é possível observar que este foi sulfatado em C4 pela correlação C4/H4 em $80,4/4,86$ ppm. No entanto ainda é possível observar a presença de C4 não sulfatado que aparece na correlação $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ de $71,9/4,43$ ppm, bem como as correlações correspondentes aos C2/H2 e C3/H3, vizinhos à esta posição não sulfatada, que aparecem em $71,7/3,67$ e $84,7/3,85$ ppm, respectivamente. A análise do espectro indica que não houve sulfatação em C2 deste anel. Com os dados obtidos por RMN de ^1H - ^{13}C HSQC foi proposto um assinalamento de $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ para a díade C4-sulfatada do anel de β -D-Galactopiranosidurônico (GU4S) e C2-sulfatada do anel de 3,6 anidro galactopiranosose (LA2S) (TABELA 10).

A massa molar da amostra AOS foi determinada utilizando-se HPSEC/MALLS. O cromatograma obtido (FIGURA 45) mostrou a presença de um pico em 52,14 minutos, e por comparação à uma curva de dextrana foi determinada a massa de aproximadamente foi determinada a massa de 27.108 g/mol .

FIGURA 43 – ESPECTRO DE INFRAVERMELHO DA AGAROSE OXIDADA E SULFATADA (AOS)



NOTA: Região entre 4000 e 500 cm^{-1}
 FONTE: A autora (2019)

FIGURA 44 – MAPA DE CORRELAÇÃO ^1H - ^{13}C HSQC DA AGAROSE OXIDADA E SULFATADA (AOS)

NOTA: Solvente: D_2O (70 $^\circ\text{C}$); acetona como padrão interno ($\delta = 2,21$ e $32,69$ ppm para ^1H e ^{13}C), Van de Velde; Rollema (2008).
 FONTE: A autora (2019)

TABELA 10 – DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DE ^1H E ^{13}C DAS DIADES DE AGAROSE OXIDADA (AO) E AGAROSE C-6 OXIDADA E SULFATADA (AOS)

^a Deslocamentos químicos (ppm) $^{13}\text{C}/^1\text{H}$							
Amostra	^b Un.	1	2	3	4	5	6
AO	GU	104,3	71,9	84,2	71,9	77,2	
		4,57	3,61	3,79	4,42	4,16	
	LA	100,2	71,8	82,0	77,5	79,4	71,4
		5,15	4,11	4,57	4,56	4,66	4,02/4,42
AOS	GU4S	103,8	71,7	84,7	80,4	74,7	
		4,63	3,67	3,85	4,86	3,95	
	LA2S	99,0	77,8	80,6	77,3	80,4	70,7
		5,31	4,57	4,69	4,64	4,77	4,25

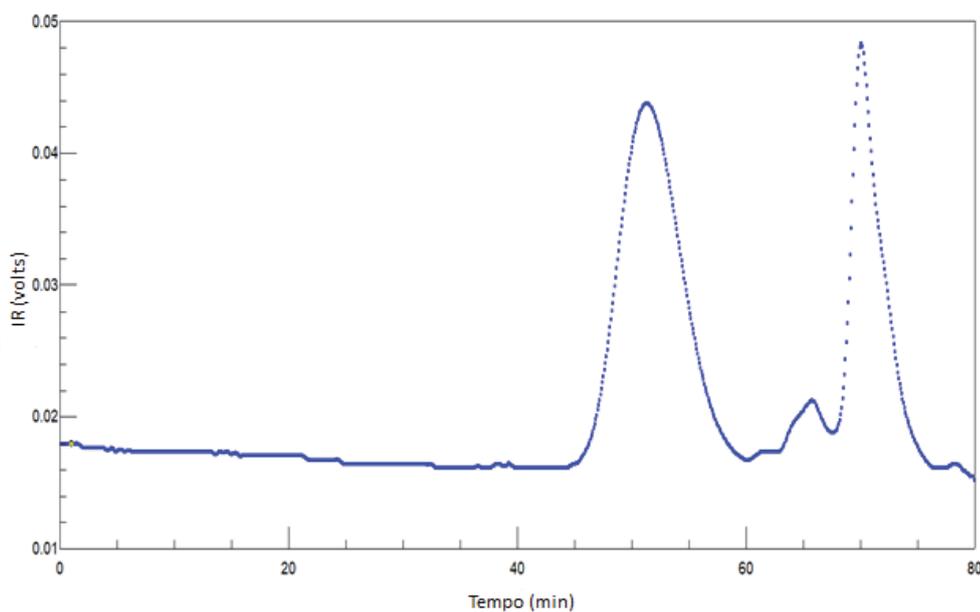
NOTA ^a Foi utilizado o padrão interno acetona (2,21 e 32,69 ppm para ^1H e ^{13}C respectivamente)

^b Os códigos de letras referem-se à nomenclatura desenvolvida por Knutsen *et al* (1994).

GU= β -D-galactopiranosidurônico, LA= 3,6 anidro α -L-galactopiranosose,

GU4S= Unidade β -D-galactopiranosidurônico 4-sulfato e LA2S= Unidade 3,6 anidro α -L-galactopiranosose 2-sulfato

FIGURA 45 – CROMATOGRAMA DA AGAROSE OXIDADA E SULFATADA (AOS) OBTIDO POR HPSEC/MALLS ACOPLADO AO DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO (IR)



FONTE: A autora (2019)

A caracterização do produto permite confirmar a sulfatação da amostra oxidada e a formação do derivado C6-oxidado e sulfatado da agarose, até nosso conhecimento, nunca descrito na literatura. A análise do RMN indica que houve entrada do grupo sulfato em C6 remanescente da oxidação e parcialmente em C4 do anel de β -D-Galp, bem como no C2 do anel de 3,6 anidrogactopirranose. Não houve sulfatação no C2 do anel de β -D-Galp. Liang et al. (2014) relataram que esta posição é de fato a menos reativa para sulfatação, sendo a última substituída na sulfatação da agarose nativa.

Os produtos AOS e AOPS são muito interessantes para o estudo de diferentes atividades biológicas uma vez que possui uma unidade de ácido urônico e a presença de grupos sulfatos. O estudo de seu potencial anticoagulante, seria interessante, sobretudo, uma vez que ambos os grupos sulfato e carboxila estão presentes na molécula da heparina.

6 CONCLUSÕES

No presente estudo foram sintetizados diferentes derivados da agarose com potencial aplicação biológica. Na primeira parte do trabalho a rota sintética desenvolvida, composta de 3 etapas, visava a inserção regioseletiva do grupo amino no esqueleto da agarose com a finalidade de produzir um derivado com propriedades antibacterianas. As reações foram regioseletivas na posição C6 do anel de β -D-Galp do polissacarídeo e produziram intermediários interessantes, como o derivado azido que pode ser aplicado, por exemplo, em *click chemistry*.

O produto final, C6-amino agarose despolimerizada (ANHD), se mostrou solúvel em solução aquosa à pH 7 e apresentou relevante atividade bacteriostática e bactericida contra as bactérias *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*. A maior inibição observada foi para a bactéria *Pseudomonas aeruginosa* em que obteve-se uma concentração inibitória mínima (CIM) na escala de microgramas, de 310 μ g/mL, e uma concentração bactericida mínima (CBM) de 2,5 mg/mL.

Assim, a síntese do derivado amino se mostrou bem-sucedida, produzindo interessantes intermediários e a inserção do grupo amino em C6 gerou um produto com atividade antibacteriana, conforme pretendido. Este derivado amino da agarose sintetizado se mostra promissor para utilização em diferentes áreas onde pode ser utilizado como conservante de alimentos, em soluções antissépticas, enxaguantes bucais, na formulação de sabonetes, no tratamento de água, entre outras.

Neste trabalho também foi possível realizar a inserção dos grupos carboxila e sulfato no esqueleto polissacarídico, gerando produtos de potencial aplicação biológica. Foram sintetizados os derivados: sulfatado (AS), com alto grau de sulfatação, parcialmente oxidado (AOP) e totalmente oxidado (AO) no C6 da agarose. Os produtos oxidados foram ainda sulfatados, gerando os derivados: parcialmente oxidado e sulfatado (AOPS) e totalmente oxidado e sulfatado (AOS), até então inéditos na literatura.

Devido a estes grupos químicos inseridos, estes produtos apresentam grande potencial biológico e poderão ser testados futuramente quanto as suas potenciais atividades. A atividade anticoagulante destes produtos se mostra interessante de ser estudada, devido à presença de grupos químicos presentes e relacionados à atividade anticoagulante da heparina.

REFERÊNCIAS

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

ARAÚJO, C. A.; NOSEDA, M. D.; CIPRIANI, T. R.; GONÇALVES, A. G.; DUARTE, M. E. R.; DUCATTI, D. R. B. Selective sulfation of carrageenans and the influence of sulfate regiochemistry on anticoagulant properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 91, n. 2, p. 483–91, 2013.

AGARWAL, A.; DANISHEFSKY, I. Requirement of free carboxyl groups for the anticoagulant activity of heparin. **Thrombosis Research**, v.42, p.673 - 680, 1986.

AHSAN, S. M.; THOMAS, M.; REDDY, K. K.; GOPAL, S.; ASTHANA, A.; BHATNAGAR, I. Chitosan as biomaterial in drug delivery and tissue engineering. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 110, p. 97–109, 2018.

AKBAR, A.; SHAKEEL, A. A review on chitosan and its nanocomposites in drug delivery **International Journal of Biological Macromolecules**, p. 273–286, 2018

ALI, A.; AHMED, S. International Journal of Biological Macromolecules A review on chitosan and its nanocomposites in drug delivery. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 109, p. 273–286, 2018.

AL-HORANI, R. A.; DESAI, U. R. Chemical sulfation of small molecules – advances and challenges. **Tetrahedron**, v. 66, p. 2907-2918, 2010.

ALVES, F. C. B.; **Ação antimicrobiana de associações de antimicrobianos: nisina, óleos essenciais e compostos majoritários.** Dissertação (Biologia Geral e Aplicada) – Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2014.

ANANIAS, M.; YANO, T. Serogroups and virulence genotypes of Escherichia coli isolated from patients with sepsis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 41, n.10, p. 877-883, 2008.

ANGELIN, M.; HERMANSSON, M.; DONG, H.; RAMSTRÖM, O. Direct, Mild, and Selective Synthesis of Unprotected Dialdo-Glycosides. **European Journal of Organic Chemistry**, v. 2006, n. 19, p. 4323–4326, 2006.

ARAKI, C. Some recent studies on the polysaccharides of agarophytes. **Journal of Applied Phycology**, v.7, 231-243,1966.

ARAÚJO, C. A DE; NOSEDA, M. D.; CIPRIANI, T. R.; GONÇALVES, A. G.; DUARTE, M. E. R.; DUCATTI, D. R. B. Selective sulfation of carrageenans and the influence of sulfate regiochemistry on anticoagulant properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 91, n. 2, p. 483–91, 2013.

ARMISEN, R.; GALACTAS, F. Production, properties and uses of agar. **Production and Utilization of Products from Commercial Seaweeds**. 1987

ARYA, N., FORGET, A., SAREM, M., SHASTRI, V. P. RGDSP functionalized carboxylated agarose as extrudable carriers for chondrocyte delivery. **Material Science and Engineering:C**, v. 99, 103-111, 2019.

ASPINALL, G. O. Chemical characterization and structure determination of polysaccharides. In: **The polysaccharides**, v.1, p. 2330-2338, 1982.

AWAD, H. A.; QUINN, W. M.; LEDDY, H. A.; GIMBLE, J. M.; GUILAK, F. Chondrogenic differentiation of adipose-derived adult stem cells in agarose, alginate, and gelatin scaffolds. **Biomaterials**, n. 25, p. 3211–3222, 2004.

AYRES, M. C. C.; BRANDÃO, M. S.; VIEIRA-JUNIOR, G. M. MENOR, J. C. A. S.; SILVA, H. B.; SOARES, M. J. S.; CHAVES, M. H. Atividade antibacteriana de plantas úteis e constituintes químicos da raiz de *copernicia prunifera*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, n.1, p, 90-97, 2008.

BAILEY, W. F.; BOBBITT, J. M.; WIBERG, K. B. Mechanism of the oxidation of alcohols by oxoammonium cations. **Journal of Organic Chemistry**, v.72, n. 12, p. 4504-4509, 2007.

BALLESTEROS, A.; MONTERO, J. M. S.; SINISTERRA, J. V. p-Toluenesulfonyl chloride activation of agarose as exemplified by the coupling of lysine and micrococcal endonuclease. **Journal of Molecular Catalysis**, v. 38, p. 227–236, 1986.

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

BAUMANN H., RICHTER, A., KLEMM, D.; FAUST, V. Concepts for preparation of novel regioselective modified cellulose derivatives sulfated, aminated, carboxylated and acetylated for hemocompatible ultrathin coatings on biomaterials. **Macromol. Chem. Phys**, n. 1, p.1950–1962, 2000.

BARDDAL, H. P. O.; GRACHER, A. H. P.; SIMAS-TOSIN, F. F.; IACOMINI, M. CIPRIANI, R. Anticoagulant activity of native and partially degraded glycolglucuronomannan after chemical sulfation. **International Journal of Biological Macromolecules**, n.80, p. 328-333, 2015.

BEDINIA, E., LAEZZAA, 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.

BOLD, H.C.; WYNNE, M.J. **Introduction to the Algae**. Englewood Cliffs, N.J: Prentice-Hall, 1985. 720p.

BRAGD, P. L.; BEKKUM, H. VAN; BESEMER, A. C. TEMPO-mediated oxidation of polysaccharides : survey of methods and applications. **Topic in Catalysis** , v. 27, n. February, 2004.

CANTAS, L., SHAH; S. Q., CAVACO; L. M.; MANAIA, C. M.; WALSH, F., POPOWSKA, M.; SORUM, H. A brief multi-disciplinary review on antimicrobial resistance in medicine and its linkage to the global environmental microbiota. **Frontiers in Microbiology** ,v.4, p.96. 2013.

CARLOS, M. M. L.; FREITAS, P. D. F. S. Estudo da cascata de coagulação sanguínea e seus valores de referência. **Acta Veterinaria Brasileira**, v.1, n.2, p.49 - 55, 2007

CARVALHO, M. M.; FREITAS, R. A.; DUCATTI, D. R. B.; FERREIRA, L. G.; GONÇALVES, A. G. ; COLODI, F. G.; ARANHA, E. M.; NOSEDA, M. D.; DUARTE, M. E. R. Modification of ulvans via periodate-chlorite oxidation: Chemical characterization and anticoagulant activity, **Carbohydrate Polymers**, v.197, p. 631-634, 2018

CASU, B.; NAGGI, A.; TORRI, G. Re-visiting the structure of heparin. **Carbohydrate Research.**, v. 403 p. 60 - 68, 2015.

CAUGHEY, G. H. Building a better heparin. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 28, n. 2, p. 129-132, 2003.

CHHATBAR, M. U.; GODIYA, C. B.; SIDDHANTA, A. K. Functional modification of agarose: A facile synthesis of an agarose-saccharate derivative. **Carbohydrate Polymers**, v. 88, n. 3, p. 1118–1123, 2012.

CHEN, S.; LI, G.; WU, N.; GUO, X.; LIAO, N.; YE, X.; LIU, D.; XUE, C.; CHAI, W. Sulfation pattern of the fucose branch is important for the anticoagulant and antithrombotic activities of fucosylated chondroitin sulfates. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1830, p. 3054-3066, 2013.

CHEN, Z., SEIFFERT, D.; HAWES, B. Inhibition of Factor XI activity as a promising antithrombotic strategy. **Drug Discovery Today**, v. 19, n. 9, p. 1435–1439, 2014

CIANCIA, M.; QUINTANA, I.; CEREZO, A S. Overview of anticoagulant activity of sulfated polysaccharides from seaweeds in relation to their structures, focusing on those of green seaweeds. **Current medicinal chemistry**, v. 17, p. 2503–2529, 2010.

CIGAN, A. D.; ROACH, B. L.; NIMS, R. J.; TAN. A.R.; ALBRO, M. B.; STOKER, A. M.; COOK, J. L.; VUNJAK-NOVAKOVIC, G.; HUNG, C. T.; ATESHIAN, G. A. High seeding density of human chondrocytes in agarose produces tissue-engineered cartilage approaching native mechanical and biochemical properties. **Journal of Biomechanics**, v. 49, p.1909-1917, 2016

CIMECIOGLU, A. L.; BALL, D. H.; KAPLAN, J. D.L.; HUANG, S. H Preparation of Amylose Derivatives Selectively Modified at (2-6. 6-Amino-6-deoxy amylose A. L. **Macromolecules**, n. 27, p. 2917-2922, 1994.

- CIMECIOGLU, A.L.; BALL, D. H.; HUANG, S. H.; KAPLAN, D. L. A Direct Regioselective Route to 6-azido-6-deoxy Polysaccharides Under Mild and Homogeneous Conditions. **Macromolecules**, p.155–156, 1997.
- COHEN, M. The role of low-molecular-weight heparins in arterial diseases: optimizing antithrombotic therapy. **Thrombosis Research**, v. 100, p. 131 - 139, 2000.
- COLMAN, R. W. Are hemostasis and thrombosis two sides of the same coin? **The Journal Experimental of Medicine**, v. 203, n.3, p. 493–495, 2006.
- COSTERTON, J. W. et al. Microbial Biofilms. **Annual Review of Microbial**, v. 49, n.1, p. 711-745, 1995.
- CURRY, A. N. G.; PIERCE, J. M. T. Conventional and near-patient tests of coagulation. **Continuing Education in Anaesthesia, Critical Care & Pain**, v. 7, n. 2, p. 45-50, 2007.
- DAS, B.; REDDY, V. S.; REDDY, M. R. An efficient and selective tosylation of alcohols with p-toluenesulfonic acid. **Tetrahedron Letters**, v. 45, n. 36, p. 6717–6719, 2004.
- DA SILVA PEREZ, D.; MONTANARI, S.; VIGNON, M.R. TEMPO-mediated oxidation of cellulose III. **Biomacromolecules**, v. 4, n.5, p.1417–1425, 2003.
- DAVIE, E. W.; RATNOFF, O. D. Waterfall sequence for intrinsic blood clotting. **Science**, v. 145, p. 1310-1312, 1964
- DE ROSA, E.; URCIUOLO, F.; BORSELLI, C.; GERBASIO, D.; IMPARATO, G.; NETTI, P. A. Time and space evolution of transport properties in agarose–chondrocyte constructs. **Tissue Engineering**, n. 12, p. 2193–2201, 2006
- DEMAIN, A. L.; SANCHEZ, S. Microbial drug discovery: 80 years of progress. **The Journal of Antibiotics**, v.62, n.1, p. 5-16, 2009.
- DING et al., TEMPO-mediated selective oxidation of substituted polysaccharides--an efficient approach for the determination of the degree of substitution at C-6. **Carbohydrate Research**.v. 343, n.18, p.3112–3116, 2008
- DJERIBI, R.; BOUCHLOUKH, W.; JOUENNE, T.; MENAA, B. Characterization of bacterial biofilms formed on urinary catheters. **American Journal of Infection Control**, v. 40, n. 9, p. 854-859, 2012.
- DODGSON, K.S; PRINCE, R. G. A note on the determination of the ester sulphate content of sulphated polysaccharides. **Biochemical Journal**, v. 84, p. 106-110, 1962.
- 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, p. 286-293, 2019.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350–356, 1956.

DWIVEDI, N., BISHT, S. S.; TRIPATHI, R. P. Asymmetric organocatalysis with glycosyl-beta-amino acids: direct asymmetric aldol reaction of acetone with aldehydes. **Carbohydrate Research**, v. 341, n.16, p. 2737–43, 2006.

ELCHINGER, P.-H.; FAUGERAS, P.-A.; BOËNS, B.; *et al* . Polysaccharides: The “Click” Chemistry Impact. **Polymers**, v. 3, n. 4, p. 1607–1651, 2011.

ENOBAXHARE, B. O.; BADER, D. L.; LEE, D. A. Quantification of sulfates glycosaminoglycans in chondrocyte/alginate cultures, by use of 1,9-Dimethylmethylene blue. **Analytical Biochemistry**, v. 243, p. 189-191, 1996.

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

FARNDAL, R. W.; BUTTLE, D. J.; BARRETT, A. J. Improved quantitation and discrimination of sulphated glycosaminoglycans by use of dimethylmethylene blue. **BBA - General Subjects**, v. 883, p. 173–177, 1986

FENG-ZHU, J.; ZHENG, L. Study on antimicrobial activity of chitosan with different molecular weights. **Carbohydrate Polymers**, v. 54, p. 527-530, 2003

FERNÁNDEZ, P. V.; QUINTANA, I.; CEREZO, A. S.; CARAMELO, J. J.; POL-FACHIN, L.; VERLI, H.; ESTEVEZ, J. M.; CIANCIA, M. Anticoagulant Activity of a Unique Sulfated Pyranosic (1→3)-β-L-Arabinan through Direct Interaction with Thrombin, **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n.1, p. 223-233.

FERREIRA, C. N.; SOUZA, M. O.; DUSSE, L. M. S.; CARVALHO, M. G. O novo modelo da cascata de coagulação baseado nas superfícies celulares e suas implicações. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 32, n. 5, p. 416-42, 2010

FEESE, E., SADEGHIFAR, H., GRACZ, D. S. et al. Photobactericidal Porphyrin-Cellulose Nanocrystals: Synthesis, Characterization, and Antimicrobial Properties. **Biomacromolecules**, v. 12, p. 3528–3539, 2011.

FENICAL, W. Halogenation in Rhodophyta- Review. *Journal of Phycology*, v. 13, n.11, p.245-259, 1975.

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

FORGET, A; ARYA, N.; RANDRIANTSILEFISOA, R.; MIESSMER, F.; BUCK, M.; AHMADI, V.; JONAS, D.; BLENCOWE, A.; SHASTRI, V. P. Nonwoven Carboxylated Agarose-Based Fiber Meshes with Antimicrobial Properties. **Biomacromolecules**, v.17, n.12, p. 4021–4026, 2016.

FORGET, A.; CHRISTENSENA, J.; LUDEKEC, S.; KOHLERA, E.; THOBIAS, S.; MATLOUBIA, M.; THOMANNA, R.; SHASTRIA, V.P. Polysaccharide hydrogels with tunable stiffness and provasculogenic properties via α -helix to β -sheet switch in secondary structure. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.110, n.32, p. 12887-12892 2013.

FOX, S. C.; EDGAR, K. J. Staudinger Reduction Chemistry of Cellulose: Synthesis of Selectively O-Acylated 6-Amino-6deoxy-cellulose. **Biomacromolecules**, v. 13, p. 992–1001, 2012.

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

GAGGINI, F.; PORCHEDDU, A.; REGINATO, G.; RODRIQUEZ, M.; TADDEI, M. Colorimetric tools for solid-phase organic synthesis. **Journal of Combinatorial Chemistry**, v. 6, n. 5, p. 805–10, 2004.

GERICKE, M.; SCHALLER, J.; LIEBERT, T.; *et al* . Studies on the tosylation of cellulose in mixtures of ionic liquids and a co-solvent. **Carbohydrate Polymers**, v. 89, n. 2, p. 526–536, 2012.

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

GIOIA, C. *et al*. Chitosan Aerogel Beads as a Heterogeneous Organocatalyst for the Asymmetric Aldol Reaction in the Presence of Water: An Assessment of the Effect of Additives, **European Journal of Organic Chemistry**, p. 588-594, 2013.

GÓMEZ-MASCARAQUE, L. G.; MÉNDEZ, J. A.; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, M.; VÁZQUEZ, B.; SAN ROMÁN, J. Oxidized dextrans as alternative crosslinking agents for polysaccharides: application to hydrogels of agarose-chitosan. **Acta biomaterialia**, v. 10, n. 2, p. 798–811, 2014.

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. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.26, n.1, p.122–127, 2016.

GOY, R.C, BRITTO, D., ASSIS, O.B.G. A review of the antimicrobial activity of chitosan. **Polímeros**, v.19,n.3, p. 241-247, 2009.

GONZALO, G.; FRANCONETTIA, A.; FERNANDEZA, R.; LASSALETAC, J. M.; ESCRIBANO, F. C. Preparation of chitosan-supported urea materials and their application in some organocatalytic procedures. **Carbohydrate Polymers**, v.199, p. 365-374, 2018.

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

GRASSAUER, A.; WEINMUELLNER, R.; MEIER, C.; PRETSCH, A.; PRIESCHL-GRASSAUER, E. Unger H Iota-carrageenan is a potent inhibitor of rhinovirus infection. **Virology Journal**, v. 5, p. 1–13, 2008.

HASEGAWA, T.; UMEDA, M.; NUMATA, M.; *et al* . “Click chemistry” on polysaccharides: a convenient, general, and monitorable approach to develop (1-->3)-beta-D-glucans with various functional appendages. **Carbohydrate Research**, v. 341, n. 1, p. 35–40, 2006.

HEINZE, T.; TALABA, P.; HEINZE, U. Starch derivatives of high degree of functionalization . 1 . Effective , homogeneous synthesis of p -toluenesulfonyl (tosyl) starch with a new functionalization pattern. **Carbohydrate Polymers**, v. 42, p. 411–420, 2000.

HEUKO, J. G. **Síntese e caracterização de derivado amino carboxilado da agarose**. 100 p, Dissertação (Mestrado em Ciências-Bioquímica) - Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2015.

HOLME, K. R.; PERLIN, A. S. Chitosan N-sulfate. A water-soluble polyelectrolyte. **Carbohydrate Polymers**, v. 302, p. 7–12, 1997.

HU, J.; ZHU, Y.; TONG, H.; SHEN, X.; CHEN, L.; RAN, J. A detailed study of homogeneous agarose/hydroxyapatite nanocomposites for load-bearing bone tissue. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 82, p. 134-143, 2016.

HUANG, R.; DU, Y.; YANG, J.; FAN, L. Influence of functional groups on the in vitro anticoagulant activity of chitosan sulfate. **Carbohydrate Research**, v. 338, p. 483–489, 2003.

HUANG, N. M. , LIM, H. N., RADIMAN, S., KHIEW, P. S., CHIU, W. S., HASHIM, R., CHIA, C. H. Sucrose ester micellar-mediated synthesis of Ag nanoparticles and the antibacterial properties. **Colloids and Surfaces A**,v. 353, p. 69, 2010.

IWAI, S., SHIMIZU, H.; SUZAWA, Y.; AKASHI, M.; YUR, Y. Hydroxyapatite agarose composite gels as a biochemical material for the repair of alveolar bone defects due to cleft lip and palate., v. 27, p. 637-644, 2015.

JAGER, M.; MINNAARD, A. J. Regioselective modification of unprotected glycosides. **Chemical Communications**, p. 656–664, 2016

JAYAKUMAR, R.; CHENNAZHII, K. P.; MUZZARELLI, R. A. A.; TAMURA, H.; NAIR, S. V, SELVAMURUGAN, N. Chitosan conjugated DNA nanoparticles in gene therapy. **Carbohydrate Polymers**, v. 79, p. 1–8, 2010

JIA, Z.; SHEN, D.; XU, W. Synthesis and antibacterial activities of quaternary ammonium salt of chitosan. **Carbohydrate Research**, v. 333, p.1–6, 2001.

JIE, Y.; ZHANG, L.; CHEN, P.; MAO, X.; TANG, S. Preparation of agarose sulfate and its antithrombogenicity. **Journal of Wuhan University of Technology-Mater**, v. 27, n. 1, p. 110–114, 2012.

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

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

JOTHI, M.V, BHAT, K.M, PRATIBHA, P.K, BHAT, G.S. The evaluation of a biodegradable dental chip containing chlorhexidine in chitosan base as a targeted drug delivery in the management of chronic periodontitis in patients. **Drug Development Research**. v. 70, p. 395-401, 2009.

KATO, Y.; MATSUO, R.; ISOGAI, A. Oxidation process of water-soluble starch in TEMPO-mediated system. **Carbohydrate Polymers**, v. 51, n. 1, p. 69–75, 2003.

KHANARIAN, N.T.; HANEY, N. M.; BURGA, R. A.; LU, H. H. A functional agarosehydroxyapatite scaffold for osteochondral interface regeneration. **Biomaterials**, v. 33, p. 5247–5258, 2012.

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

KOLENDER, A. A; MATULEWICZ, M. C. Desulfation of sulfated galactans with chlorotrimethylsilane. Characterization of beta-carrageenan by ¹H NMR spectroscopy. **Carbohydrate Research**, v. 339, n. 9, p. 1619–29, 2004.

KONDAVEETI, S.; PRASAD, K.; SIDDHANTA, A K. Functional modification of agarose: a facile synthesis of a fluorescent agarose-tryptophan based hydrogel. **Carbohydrate Polymers**, v. 97, n. 1, p. 165–71, 2013. Elsevier Ltd.

KONDAVEETI, S.; MEHTA, G. K.; SIDDHANTA, A K. Modification of agarose: 6-Aminoagarose mediated syntheses of fluorogenic pyridine carboxylic acid amides. **Carbohydrate polymers**, v. 106, p. 365–73, 2014

KONDAVEETI, S.; MEHTA, G. K.; SIDDHANTA, A K. Modification of agarose: 6-Aminoagarose mediated syntheses of fluorogenic pyridine carboxylic acid amides. **Carbohydrate Polymers**, v. 106, p. 365–73, 2014.

KRAJEWSKI, W. A. A composite agarose-polyacrylamide matrix as two-dimensional hard support for solid-phase protein assays. **Analytical Biochemistry**, v. 497, p. 57-9, 2016.

KOLB, H. C.; FINN, M. G.; SHARPLESS, K. B. Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. **Angewandte Chemie (International ed. in English)**, v. 40, n. 11, p. 2004–2021, 2001.

- KRAJEWSKI, W. A. A composite agarose e polyacrylamide matrix as two-dimensional hard support for solid-phase protein assays. **Analytical Biochemistry**, 497, 57–59 , 2016.
- KURITA, K. Controlled functionalization of the polysaccharide chitin. **Progress in Polymer Science**, v. 26, n. 9, p. 1921–1971, 2001.
- LEIBBRANDT, A.; MEIER, C.; KONIG-SCHUSTER, M., WEINMULLNER, R., KALTHOFF, D., PFUGFELDER, B., GRAF, P.; et al. Iota-carrageenan is a potent inhibitor of influenza a virus infection. **Plos ONE**, v. 5,p. 1–12, 2010.
- LI, Z.; YANG, F.; YANG,R. nternational Journal of Biological Macromolecules Synthesis and characterization of chitosan derivatives with dual-antibacterial functional groups. **International Journal of Biological Macromolecules**. v.75, p.378–387, 2015.
- LI, W., CHEN, L., HUANG, Z., WU, X., ZHANG, Y., HU, Q., WANG, Y. The influence of cyclodextrin modification on cellular uptake and transfection efficiency of polyplexes. **Organic & Biomolecular Chemistry**,v. 9,p. 7799, 2011.
- LIANG, W.; MAO, X.; PENG, X.; TANG, S. Effects of sulfate group in red seaweed polysaccharides on anticoagulant activity and cytotoxicity. **Carbohydrate Polymers**, v. 101, p. 776–85, 2014.
- LIEBERT, T.; HÄNSCH, C.; HEINZE, T. Click chemistry with polysaccharides. **Macromolecular Rapid Communications**, v. 27, p. 208–213, 2006.
- LIM, S. H., HUDSON, S. M. Synthesis and antimicrobial activity of a water-soluble chitosan derivative with a fiber-reactive group. **Carbohydrate Research**, v. 339, n.2, p. 313–319, 2004.
- LIM, H. N., HUANG, N. M., LOO, C. H. Facile preparation of graphene-based chitosan films: Enhanced thermal, mechanical and antibacterial properties. **Journal of Non-Crystalline Solids**, v. 358, p. 525-530, 2012.
- LUCA, L. DE; GIACOMELLI, G.; MASALA, S.; PORCHEDDU, A.; CHIMICA, D. Trichloroisocyanuric / TEMPO Oxidation of Alcohols under Mild Conditions : A Close Investigation. **Journal of Organic Chemistry** , v. 68, n. 12, p. 4999–5001, 2003.
- LUTZ, J.-F.; ZARAFSHANI, Z. Efficient construction of therapeutics, bioconjugates, biomaterials and bioactive surfaces using azide-alkyne “click” chemistry. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 60, n. 9, p. 958–70, 2008.
- LYNAM, D. A.; SHAHRIARI, D.; WOLF, K. J.; ANGART, P. A.; KOFFLER J.; TUSZYNSKI, M. H.; CHAN, C.; WALTON, P.; SAKAMOTO, J. Brain derived neurotrophic factor release from layer-by-layer coated agarose nerve guidance scaffolds., p. 128-131, 2015.

MAAS, N.C. et al., Sulfation pattern of citrus pectin and its carboxy-reduced derivatives: Influence on anticoagulant and antithrombotic effects. **Carbohydrate Polymers**, v.89, n.4, p.1081–1087, 2012.

MACLAUGHLINA, F. C.; MUMPER, R. J.; WANG, J.; TAGLIAFERRI, J. M.; GILL, I; GINCHCLIFFE, M.; ROLLAND, A. P. Chitosan and depolymerized chitosan oligomers as condensing carriers for in vivo plasmid delivery., v. 56, p. 259-272, 1998.

MACFARLANE, R. G. An enzyme cascade in the blood clotting mechanism, and its function as a biochemical amplifier. **Nature**, v. 202, p. 498-499, 1964.

MARUYAMA, T., TOIDA, T., IMANARI, T. YU, G., LINDHART, R.J. Conformational changes and anticoagulant activity of chondroitin sulfate following its O-sulfonation. **Carbohydrate Research**., v. 306, n.1, p. 35-43, 1998.

MARTIN, B.C; MINNER, E.J; WISEMAN, S.L; GILBERT, R.J. Agarose and methylcellulose hydrogel blends for nerve regeneration applications. **Journal of Neural Engineering**, n.5 p. 221-231, 2008.

MATSUHIRO, B. et al. Sulfation of agarose from subantarctic *Ahnfeltia plicata* (*Ahnfeltiales* , *Rhodophyta*): studies of its antioxidant and anticoagulant properties in vitro and its copolymerization with acrylamide., v. 26, n.5, p.2011–2019, 2014.

MEENA, R.; SIDDHANTA, A. K.; PRASAD, K.; et al. Preparation, characterization and benchmarking of agarose from *Gracilaria dura* of Indian waters. **Carbohydrate Polymers**, v. 69, n. 1, p. 179–188, 2007.

MEHROTA, S.; LYNAM, D.; LIU, C.; SHAHRIARI, D. et al. Time controlled release of arabinofuranosylcytosine (Ara-C) from agarose hydrogels using layer-by-layer assembly: An in vitro study. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**, v. 23, p. 439–463, 2012.

MENG, X.; EDGAR, K. J. “Click” reactions in polysaccharide modification. **Progress in Polymer Science**, v. 53, p. ASAP, 2015.

MESTECHKINA, N. M.; SHCHERBUKHIN, V. D. Sulfated polysaccharides and their anticoagulant activity: A review. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 46, n. 3, p. 267–273, 2010.

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

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n.3, p. 426-428, 1959.

MIZDAL, C. R.; **Avaliação de novos compostos antimicrobianos na inibição da formação do biofilme de *Escherichia coli***. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Universidade Federal de Santa Maria, 2014.

MOURÃO, P. A. S.; PEREIRA, M. S. Searching for alternatives to heparin: sulfated fucans from marine invertebrates. **Trends in Cardiovascular Medicine**, v. 9, n. 8, p. 225-232, 1999.

MORITA, Y.; SUGAHARA, Y.; TAKAHASHI, A.; IBONAI, M. Preparation of chitin-p-toluenesulfonate and deoxy(thiocyanato)chitin. **Pergamon**, v. 30, n. 11, p. 1231–1236, 1994.

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

NEGISHI, K.; MASHIKO, Y.; YAMASHITA, E.; OTSUKA, A.; HASEGAWA, T. Cellulose Chemistry Meets Click Chemistry: Syntheses and Properties of Cellulose-Based Glycoclusters with High Structural Homogeneity. **Polymers**, v. 3, n. 4, p. 489–508, 2011.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**. 4ed. São Paulo, Sarvier. 2006. 1202 pg.

NILSSON, K.; MOSBACH, K. p-Toluenesulfonyl chloride as an activating agent of agarose for the preparation of immobilized affinity ligands and proteins. **European Journal of Biochemistry**, v. 112, n. 2, p. 397–402, 1980

NISHIMURA, S. I.; NISHI, N.; TOKURA, S., OKIEI, W.; SOMORIN, O. Inhibition of the hydro-lytic activity of thrombin by chitin heparinoids. **Carbohydrate Research**, v. 156, p. 286-292, 1986.

NISHINO, T.; AIZU, Y.; NAGUMO, T. The influence of a fucan sulfate from the Brown seaweed *Ecklonia kurome* on its antithrombin activity. **Thrombosis. Research.**, v. 64, p. 723-731, 1991.

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

PAINTER, T.J. In: Aspinall GO, editor. **The polysaccharides**. v.2, New York: Academic Press, 1983, p. 195.

PAPY-GARCIA, D.; BARBIER-CHASSEFIÈRE, V.; ROUET, V.; KERROS, M.; KLOCHENDLER, C.; TOURNAIRE, M.; BARRTAULT, D.; CARUELLE, J.; PETIT, E. Nondegradative Sulfation of polysaccharides. syntheses and structure characterization of biologically active heparan sulfate mimetics. **Macromolecules**, v. 38, p. 4647-4654, 2005.

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

PAHIMANOLIS, N.; VESTERINEN, A. H.; RICH, J.; SEPPALA, J. Modification of dextran using click-chemistry approach in aqueous media. **Carbohydrate Polymers**, v. 82, p. 78–82, 2010.

PAPY-GARCIA, D.; BARBIER-CHASSEFIÈRE, V.; ROUET, V.; KERROS, M.; KLOCHENDLER, C.; TOURNAIRE, M.; BARRTAULT, D.; CARUELLE, J.; PETIT, E. Nondegradative Sulfation of polysaccharides. syntheses and structure characterization of biologically active heparan sulfate mimetics. **Macromolecules**, v. 38, p. 4647-4654, 2005.

PEREIRA, M.G. et al. Structure and anticoagulant activity of a sulfated galactan from the red alga , *Gelidium crinale* . Is there a specific structural requirement for the anticoagulant action ? **Carbohydrate Research**. v.340, n.12 , p.2015–2023, 2015.

PETTER, R. C., SALEK, J. S., SIKORSKI, C. T., KUMARAVEL, G., LIN, F. Cooperative binding by aggregated mono-6-(alkylamino)- β -cyclodextrins. **Journal of the American Chemical Society**, v. 112, p. 3860-3868, 1990.

PIERRE, G. et al. TEMPO -mediated oxidation of polysaccharides: An ongoing story. **Carbohydrate Polymers**. v. 165, p.71–85, 2017.

PIGNATELLO, R., BASILE, L., PUGLISI, G. Chitosan glutamate hydrogels with local anesthetic activity for buccal application. **Drug Delivery**. v. 16, p. 176-81, 2009.

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

PODESVA, K., PROCHASKA, O., MEDIN, A. Studies on agaroses: 1. Specific refractive index increments in dimethyl sulfoxide and in water at various wavelengths and temperatures. **Polymer**, v.36, 4967-4970, 1995.

PONEDEL'KINA, I. Y.; KHAIBRAKHMANOVA, E. A.; ODINOKOV, V. N. Nitroxide-catalyzed selective oxidation of alcohols and polysaccharides. **Russian Chemical Reviews**, v. 79, n.1, p. 63–75, 2010.

RABEA, E.I. BADAWY, M. E.; STEVENS, C.V., SMAGGHE, G., STEURBAUT, W. Chitosanas antimicrobial agent: applications and mode of action. **Biomacromolecules**, n.4, p. 1457–1465, 2003.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. **J.Rang e Dale Farmacologia**: 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007.

PELEGRÍN, Y. F.; MURANO, E.. Agars from three species of *Gracilaria* (Rhodophyta) from Yucatán Peninsula. **Bioresource Technology**, 96(3), 295–302, 2005.

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

RABENSTEIN, D. L. Heparin and heparan sulfate: structure and function. **Natural product reports**, v. 19, n. 3, p. 312-331, 2002.

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

RENN, D. W. Agar and Agarose : Indispensable Partners in Biotechnology. **Industrial & Engineering Chemistry Product Research and Development**, v. 23, p. 17–21, 1984.

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

REZENDE, S. M. Distúrbios da hemostasia: doenças hemorrágicas. **Revista Médica de Minas Gerais**, v. 20, n. 4, p. 534-553, 2010

RICCI, A.; BERNARDI, L.; GIOIA, C.; VIERUCCI, S.; ROBITZERB, M.; QUIGNARD, F. Chitosan aerogel: a recyclable, heterogeneous organocatalyst for the asymmetric direct aldol reaction in water. **Chemical Communications**, n. 34, 2010.

RICCI, A.; BERNARDI, L.; BOURAHLA, K.; TANCHOUX, N.; ROBITZER, M.; QUIGNARD, F. Chitosan Aerogel Beads as a Heterogeneous Organocatalyst for the Asymmetric Aldol Reaction in the Presence of Water: An Assessment of the Effect of Additives. **European Journal of Organic Chemistry**, p. 588-594, 2013.

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

ROSTOVTSEV, V. V; GREEN, L. G.; FOKIN, V. V; SHARPLESS, K. B. A stepwise huisgen cycloaddition process: copper(I)-catalyzed regioselective “ligation” of azides and terminal alkynes. **Angewandte Chemie**, v. 41, n. 14, p. 2596–9, 2002.

RORRER, G. L.; CHENEY, D. P. Bioprocess engineering of cell and tissue cultures for marine seaweeds. **Aquacultural Engineering**, 32, 11–41, 2004.

SANTOS, G. C. dos; **Oxidação seletiva de carragenanas utilizando o reagente TEMPO e o ácido tricloroisocianúrico como co-oxidante**. Dissertação (Mestrado em Ciências-Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2015.

SANTOS-FIDENCIO, G. C dos; 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, p. 286–293, 2019.

N.; MOORTHI, A.; .SARAVANAN, S.; DEVI, M. P.; SELVAMURUGAN, N. Chitosan and its derivatives for gene delivery., v. 48, n. 2, p. 234-238, 2011.

SATOH, T.; KANO, H.; NAKATANI, M. SAKAIRI, N. 6-Amino-6-deoxy-chitosan. Sequential chemical modifications at the C-6 positions of N-phthaloyl-chitosan and evaluation as a gene carrier. **Carbohydrate Research**, v. 341, p. 2406–2413, 2006.

SENEL, S.; MCCLURE, S. J. Potential applications of chitosan in veterinary medicine. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, n. 10, p. 1467–1480, 2004

SENNI, K., PEREIRA, J., GUENICHE, F., DELBARRE-LADRAT, C.; HELLEY, D.; COLLIEC-JOUAULT, S. Marine Polysaccharides : A Source of Bioactive Molecules for Cell Therapy and Tissue Engineering, **Marine Drugs**, v.9, n. 9, p.1664–1681, 2011

SIMÕES, M.; BENNETT, R. N.; ROSA, E. A. Understanding antimicrobial activities of phytochemicals against multidrug resistant bacteria and biofilms. **Natural Products Report.**, v. 26, n. 6, p.746-757, 2009.

SILVA, H.S.R.C, DOS SANTOS, K.S.C.R.; FERREIRA, E.I. Quitosana: Derivados hidossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços. **Química Nova**, v.29, n.4, p.776-785, 2006.

SILVERSTEIN, M. R.; BASSLER, C. G.; MORRIL, T. C. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**. 5^a edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994.

SPAGNA, G.; BARBAGALLO, R. N.; GIORGIO, P.; MARIA, R.; GUISAN, M. Stabilization of α b -glucosidase from *Aspergillus niger* by binding to an amine agarose gel. **Journal of Molecular Catalysis** , p. 63–69, 2000.

STEVENSON, R. J.; BOTHWELL, M.L.; LOWE,R.L. **Algal Ecology - Freshwater Benthic Ecosystems**. San Diego: Academic Press, 1996. 753p.

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

STILES, J.; GUPTILL-YORAN, L.; MOORE, G.E. Pogramichniy RM Effects of κ -carrageenan on in vitro replication of feline herpesvirus and on experimentally induced herpetic conjunctivitis in cats. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v. 49, p.1496–1501, 2008.

S.F-TISHER, P.C. ; TALARICO, L.B.; NOSEDA, M.D.; GUIMARÃES, S.M.P.B.; DAMONTE, E.B.; DUARTE, M.E.R. Chemical structure and antiviral activity of carrageenans from *Meristiella gelidium* against herpes simplex and dengue vírus. **Carbohydrate Polymers**, v.63, p. 459-465, 2006.

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

SU, Y.; CHU, B.; GAO, Y.; et al . Modification of agarose with carboxylation and grafting dopamine for promotion of its cell-adhesiveness. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, n. 2, p. 2245–51, 2013.

SUN, J.; TAN, H. Alginate-Based Biomaterials for Regenerative Medicine Applications, **Materials**, v. 6, n. 4 p. 1285–1309, 2013

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

TAVARES, W. Bactérias gram-positivas problemas: resistência do estafilococo, do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 33, n. 3, p. 281-301, 2000.

TANKAM, P. F.; MULLER, R.; MISCHNICKA, P.; HOPF, H. Alkynyl polysaccharides: synthesis of propargyl potato starch followed by subsequent derivatizations. **Carbohydrate Research**, v. 344, n. 14, 2007.

TESHIGORI, T.; YAMAMOTO, H.; SAKAMOTO, M.; TONAMI, H. Synthesis of mono- and di- aminated starchs. **Sen'i Gakkaishi**, 35, p. 525–529, 1979.

TILSTAM, U.; WEINMANN, H. Trichloroisocyanuric Acid : A Safe and Efficient Oxidant. **Organic Process Research & Development**, v. 6, n. 4, p. 384–393, 2002.

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

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

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

VARKEY, T. E.; WHITFIELD, G. F.; SWERN, D. . Activation of Dimethyl Sulfoxide by Electrophiles and Use of the Reactive Intermediates in the Preparation of Iminosulfuranes¹⁸. **Journal of Organic Chemistry**, v. 39, n. 23, p. 3365–3372, 1974.

VERLEE, A., MINCKE, S., STEVENS, C. V. Recent developments in antibacterial and antifungal chitosan and its derivatives. **Carbohydrate Polymer**, v. 164, p. 268–283, 2017.

VERKAIK M.J, BUSSCHER, H.J., JAGER, D., SLOMP, A.M, ABBAS, F., VAN DER MEI, H.C. Efficacy of natural antimicrobials in toothpaste formulations against oral biofilms *in vitro*. **Journal of Dentistry**. v.39, p. 218-24, 2011.

VEIGA, A., TOLEDO, M. G. T. T., ROSSA, L. S., MENGARDA, M., STOFELLA, N. C. F., OLIVEIRA, L. J., GONÇALVES, A. G., MURAKAMI, F. S. 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.

VIEIRA, M. F.; VIEIRA, A. M. S.; ZANIN, G. M.; *et al*. β -Glucosidase immobilized and stabilized on agarose matrix functionalized with distinct reactive groups. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 69, n. 1-2, p. 47–53, 2011.

WANG, T.-P.; CHANG, L.-L.; CHANG, S.-N.; *et al*. Successful preparation and characterization of biotechnological grade agarose from indigenous *Gelidium amansii* of Taiwan. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 3, p. 550–554, 2012.

WANG, L.; WANG, X.; WU, H.; LIU, R. Overview on biological activities and molecular characteristics of sulfated polysaccharides from marine green algae in recent years. **Marine Drugs**, v. 12, p. 4984-5020, 2014.

WEI, L.; LI, Q.; CHEN, Y.; ZHANG, J.; MI, Y.; DONG, F.; LEI, C. Enhanced antioxidant and antifungal activity of chitosan derivatives bearing 6-O-imidazole-based quaternary ammonium salts. **Carbohydrate Polymers**, 206, 493–503, 2019.

WIECKIEWICZ, M.; BOENING, K.W.; GRYCHOWSKA, N.; PARADOWSKA-STOLARZ, A. Clinical application of chitosan in dental specialities. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 17, n.5, p. 401-409, 2016.

YANG, J. *et al*. Preparation, characterization and *in vitro* anticoagulant activity of highly sulfated chitosan. **International Journal of Biological Macromolecules**. v.52, p.25–31, 2013.

YANG, B., YU, G., ZHAO, X., JIAO, G., REN, S., CHAI, W. Mechanism of mild acid hydrolysis of galactan polysaccharides with highly ordered disaccharide repeats leading to a complete series of exclusively odd-numbered oligosaccharides. **The FEBS journal**, v. 276, p. 2125-2137

YAMADA, Y; HOZUMI, K.; ASO, A.; HOTTA, A.; TOMA, K.; KATAGIRI, F.; *et al*. Laminin active peptide/agarose matrices as multifunctional biomaterials for tissue engineering. **Biomaterials**, n. 33, p.4118–4125, 2012.

YAPHE, W.; ARSENAULT, G.P. Improved resorcinol reagent for determination of fructose and 3,6-anhydrogalactose in polysaccharides. **Anal. Biochem.**, 13: 143-148, 1965.

YAICH, A. I.; EDLUND, U.; ALBERTSSON, A-C. Enhanced formability and mechanical performance of woodhydrolysate films through reductive amination chain extension. **Carbohydrate Polymers**, v. 117, p. 346-354, 2015.

YEMM, E.W.E; COCKING, E.C. The Determination of Amino-Acid with Ninhydrin. **Analytical Biochemistry**, v.80, p.209-213,1955.

YOUPING, J.; ZHANG, L.; CHEN, P.; MAO, X.; TANG, S. Preparation of agarose sulfate and its antithrombogenicity. **Journal of Wuhan University of Technology-Mater. Sci. Ed.**, v. 27, n. 1, p. 110–114, 2012.

ZAMPANO, G.; BERTOLDO, M.; CIARDELLI, F. Defined Chitosan-based networks by C-6-Azide–alkyne “click” reaction. **Reactive and Functional Polymers**, v. 70, n. 5, p. 272–281, 2010.

ZARRINTAJ, P.; MANOUCHEHRI, S.; AHMADI, Z.; SAEB, M. R.; URBANSKA, A. M.; KAPLAN, D. L.; MOZAFARI, M. Agarose-based biomaterials for tissue engineering. **Carbohydrate Polymers**, Tehran, v. 187, p. 66-84, Jan. 2018.

ZHOU, G.F.; SHENG, W.X.; YAO, W.H. et al. Effect of low molecular lambda-carrageenan from *Chondrus ocellatus* on antitumor H-22 activity of 5-Fu. **Pharmacological Research**, v. 53 (2), p. 129-134, 2006.