

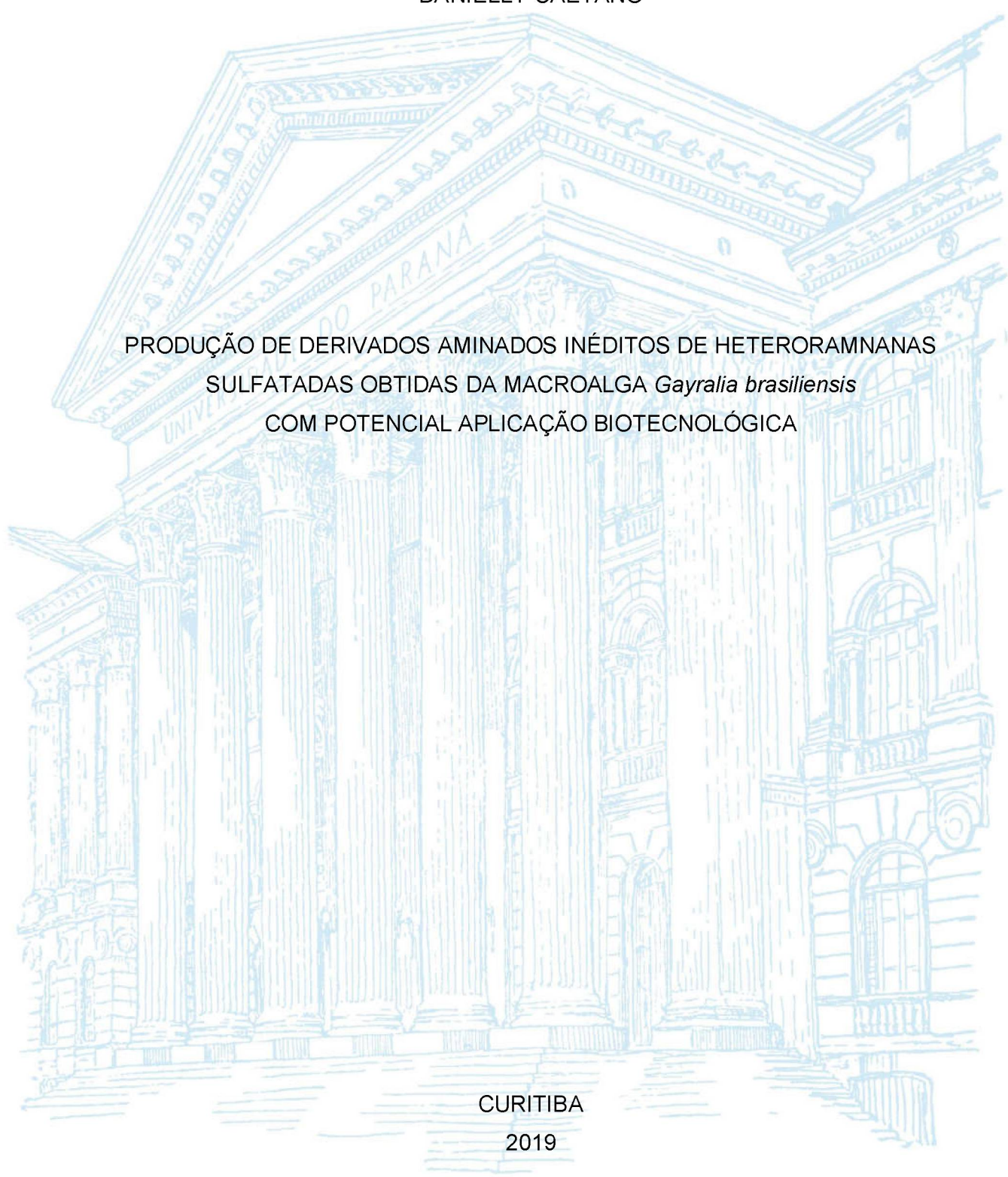
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

DANIELLY CAETANO

PRODUÇÃO DE DERIVADOS AMINADOS INÉDITOS DE HETERORAMNANAS
SULFATADAS OBTIDAS DA MACROALGA *Gayralia brasiliensis*
COM POTENCIAL APLICAÇÃO BIOTECNOLÓGICA

CURITIBA

2019



DANIELLY CAETANO

PRODUÇÃO DE DERIVADOS AMINADOS INÉDITOS DE HETERORAMNANAS
SULFATADAS OBTIDAS DA MACROALGA *Gayralia brasiliensis*
COM POTENCIAL APLICAÇÃO BIOTECNOLÓGICA

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Eugênia Duarte Nosedá
Coorientador: Prof. Dr. Miguel Daniel Nosedá

CURITIBA

2019

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

C128p

Caetano, Danielly

Produção de derivados aminados inéditos de heteroramnanas sulfatadas obtidas da macroalga *Gayralia brasiliensis* com potencial aplicação biotecnológica [recurso eletrônico] / Danielly Caetano. – Curitiba, 2019.

Dissertação - Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, 2019.

Orientador: Maria Eugênia Duarte Nosedá. Coorientador: Miguel Daniel Nosedá.

1. Polissacarídeos. 2. Algas marinhas. 3. Macroalgas. I. Universidade Federal do Paraná. II. Nosedá, Maria Eugênia Duarte. III. Nosedá, Miguel Daniel. IV. Título.

CDD: 572.566

Bibliotecária: Vanusa Maciel CRB- 9/1928



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO ENGENHARIA DE
BIOPROCESSOS E BIOTECNOLOGIA - 40001016036P8

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS E BIOTECNOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **DANIELLY CAETANO** intitulada: **PRODUÇÃO DE DERIVADOS AMINADOS INÉDITOS DE HETERORAMNANAS SULFATADAS OBTIDAS DA MACROALGA *Gayrelia brasiliensis* COM POTENCIAL APLICAÇÃO BIOTECNOLÓGICA**, após terem inquirido a autora e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

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

CURITIBA, 27 de Junho de 2019.

MARIA EUGÊNIA DUARTE NOSEDA

Presidente da Banca Examinadora (UFPR)

ALAN GUILHERME GONÇALVES

Avaliador Externo (UFPR)

DIOGO RICARDO BAZAN DUCATTI

Avaliador Externo (UFPR)

Dedico este trabalho a meus pais Donacir e Maria, e a meu irmão Diogo, por todo carinho, incentivo, compreensão e amor. Sem o apoio de cada um, eu não teria chegado até aqui.

AGRADECIMENTOS

À Professora Dr.^a Maria Eugênia e ao Professor Dr. Miguel, pela orientação e pelos ensinamentos, disponibilidade e confiança.

Aos colegas dos laboratórios E3 e 248.

Ao Centro de Estudos em Biofarmácia pela disponibilidade do equipamento para as análises de infravermelho e à pós-doutoranda Jaqueline Carneiro, pelas análises de FTIR.

Ao Centro de RMN pelas análises realizadas.

Aos técnicos do Departamento de Bioquímica pelas análises realizadas.

À Prof.^a Dr.^a Franciane Pellizzari pelas algas gentilmente cedidas.

Aos membros da banca examinadora, Professor Dr. Alan Guilherme Gonçalves e Professor Dr. Diogo Ricardo Bazan Ducatti pela disponibilidade.

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia.

À CAPES pela concessão da bolsa para a realização do mestrado no período de março/2018 a junho/2019. Às demais agências de fomento e projetos que financiaram este trabalho: CNPQ, Fundação Araucária e Projeto Universal.

Aos meus pais, Donacir e Maria, que me ensinaram a importância do trabalho duro, da perseverança e da honestidade. Ao meu irmão Diogo pelo apoio e paciência.

RESUMO

Algas verdes (Chlorophyta) sintetizam uma grande variedade de polissacarídeos sulfatados com atividades biológicas. Modificações químicas de polissacarídeos sulfatados podem alterar ou potencializar a atividade biológica desses polímeros trazendo novas perspectivas de aplicação biotecnológica. O objetivo do presente trabalho foi caracterizar e modificar quimicamente as heteroramnanas sulfatadas obtidas da clorófito *Gayralia brasiliensis* por meio de reação de O-alkilação para inserção de grupos amina. A alga seca e moída foi submetida a extrações aquosas sequenciais (80 °C, 5h) originando as frações GBR1 e GBR2 (18,2 e 6,5 % de rendimento, respectivamente). A fração de maior rendimento (GBR1) foi selecionada para caracterização e modificações químicas. GBR1 apresentou-se sulfatada (25,2 %), contendo ácidos urônicos (10,2 %) e baixos teores proteínas (2,9 %). GBR1 é constituída principalmente por unidades de ramnose, com menores porcentagens de xilose, glucose, galactose, arabinose e manose. Análises espectroscópicas (RMN mono- e bidimensional) permitiram determinar que GBR1 é constituída por unidades de α -L-ramnose 3- e 2-ligadas monossulfatadas, dissulfatadas ou não substituídas por grupos O-sulfato. A fração GBR1 foi submetida a reação de O-alkilação com o reagente 3-cloropropilamina, variando condições de tempo e quantidade de reagente, originando frações insolúveis. Análises colorimétricas (ninhidrina), de infravermelho e de RMN de ^{13}C em estado sólido sugerem que houve reação pela presença de grupos aminas livres, bandas características de estiramento N-H (1450 cm^{-1} , $3500\text{-}3300\text{ cm}^{-1}$) e sinais novos na região de 52,1-22,3 ppm, respectivamente. Adicionalmente, para obtenção de um derivado aminado solúvel em meio aquoso foi realizada a degradação controlada de Smith previamente à reação de O-alkilação resultando na fração GBR-S. Análises de HPSEC demonstraram que GBR-S apresenta menor massa molecular que a fração de origem. GBR-S foi submetida ao mesmo processo de O-alkilação realizado para a fração GBR1 gerando a fração GBR-SN. Esta fração apresentou-se solúvel em meio aquoso, com 26,4 % de grupos O-sulfato. Análises de RMN de ^1H e de HSQC demonstraram a presença de grupos amina livre ligados no polissacarídeo pela presença de novas correlações observadas no espectro de GBR-SN, tanto na região anomérica (100,1/5,08, 100,6/5,05 e 97,4/5,40 ppm) quanto na região de CH_2 da cadeia alquílica inserida (52,5-51,6/3,35-3,26, 38,1/3,17 e 24,5/2,18 ppm). Portanto, no presente trabalho heteroramnanas sulfatadas obtida de *G. brasiliensis*, caracterizadas quimicamente e por espectroscopia, foram modificadas por O-alkilação obtendo-se frações polissacarídicas aminadas inéditas com potencial aplicação biotecnológica.

Palavras-chave: Macroalgas verdes. *Gayralia brasiliensis*. Heteroramnanas sulfatadas. Modificações químicas. Degradação controlada de Smith. Aminoação por O-alkilação.

ABSTRACT

Green seaweed (Chlorophyta) synthesize a large variety of sulfated polysaccharides with biological activities. Chemical modifications of sulfated polysaccharides could modify enhance the biological activity of these polymers bringing new perspectives of biotechnological application. The goals of the present study were characterize and modify the chemical structure of sulfated heterorhamnan obtained from the chlorophyte *G. brasiliensis* through *O*-alkylation reaction to add amine groups to the molecule. The dried and milled seaweed was subjected to sequential aqueous extractions (80 °C, 5h) resulting the fractions GBR1 and GBR2 (18.2 and 6.5% yield, respectively). The highest yield fraction (GBR1) was selected for characterization and chemical modifications. GBR1 is sulfated (25.2 %), contains uronic acids (10.2 %) and low proteins content (2.9 %). GBR1 consists mainly of rhamnose units, with lower percentages of xylose, glucose, galactose, arabinose and mannose. ¹H and ¹³C NMR analyzes indicated that GBR1 consists of 3- and 2-linked α -L-rhamnose units which are monosulfated, disulfated or unsubstituted by *O*-sulfate groups. GBR1 fraction was subjected to *O*-alkylation reaction using 3-chloropropylamine, varying conditions as time and amount of reagent, resulting in insoluble fractions. Colorimetric (ninhydrin), infrared and solid-state ¹³C NMR analyzes suggest the presence of free amine groups, characteristic N-H stretching bands (1450 cm⁻¹, 3500-3300 cm⁻¹) and new signals at 52.1-22.3 ppm, respectively. Additionally, in order to obtain a water soluble amino derivative it was performed the controlled Smith degradation prior to the *O*-alkylation reaction resulting in the GBR-S fraction. HPSEC analyzes show that GBR-S has lower molecular weight than the GBR1 fraction. GBR-S fraction was subjected to the same amination process, yielding a water soluble fraction (GBR-SN) containing 26.4 % of *O*-sulfate groups. ¹H NMR and HSQC analyzes suggest the presence of free amine groups linked to the polysaccharide chain by the presence of new correlations observed at GBR-SN spectrum, at the anomeric region (100.1/5.08, 100.6/5.05 and 97.4/5.40 ppm) as well as at the CH₂ region of the inserted alkyl chain (52.5-51.6/3.35-3.26, 38.1/3.17 and 24.5/2.18 ppm). Therefore, in the present study sulfated heteroramnans obtained from *G. brasiliensis*, characterized chemically and by spectroscopy, were modified by *O*-alkylation. Unpublished aminated polysaccharides fractions with potential biotechnological application were obtained.

Keywords: Green seaweed. *Gayralia brasiliensis*. Sulphated heterorhamnan. Chemical modifications. Controlled Smith degradation. Amination by *O*-alkylation.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DE <i>Gayralia brasiliensis</i> (SETA PRETA) E <i>G. oxysperma</i> (SETA BRANCA) AO LONGO DA COSTA BRASILEIRA.....	17
FIGURA 2 – PRINCIPAIS UNIDADES DE RAMNOSE PRESENTES NA HETERORAMNANA SULFATADA OBTIDA DE <i>G. oxysperma</i>	19
FIGURA 3 - ESTRUTURA ESQUEMÁTICA DAS UNIDADES DE RAMNOSE PRESENTES NAS HETERORAMNANAS SULFATADAS NATIVAS DE <i>G. brasiliensis</i>	20
FIGURA 4 – ESQUEMA DA AMINAÇÃO REDUTIVA ÁPOS OXIDAÇÃO COM PERIODATO.....	22
FIGURA 5 – AMINAÇÃO DA FUCOIDANA.....	23
FIGURA 6 - ASPECTO GERAL DA MACROALGA <i>G. brasiliensis</i>	26
FIGURA 7 – FLUXOGRAMA DA EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS.....	27
FIGURA 8 – DESENHO EXPERIMENTAL.....	32
FIGURA 9 – ESQUEMA DA REAÇÃO ESPERADA ENTRE A FRAÇÃO GBR1 E 3-CLOROPROPILAMINA.....	33
FIGURA 10 – FLUXOGRAMA DA EXTRAÇÃO.....	35
FIGURA 11 – ESPECTRO DE INFRAVERMELHO DA FRAÇÃO NATIVA GBR1.....	38
FIGURA 12 - ESPECTRO DE RMN DE ¹³ C DA FRAÇÃO GBR1.....	40
FIGURA 13 – ESPECTRO DE RMN de ¹³ C DA FRAÇÃO GBR1: AMPLIAÇÃO.....	41
FIGURA 14 – ESPECTRO DE HSQC DA FRAÇÃO GBR1.....	42
FIGURA 15 – ESPECTRO DE HSQC DA FRAÇÃO GBR1: AMPLIAÇÃO DA REGIÃO ANOMÉRICA.....	43
FIGURA 16 – RESULTADO ESPERADO NO TESTE DE NINIDRINHA PARA AS FRAÇÕES POLISSACARÍDICAS.....	48
FIGURA 17 - RESULTADO DO TESTE DA NINHIDRINA.....	49
FIGURA 18 – RESULTADO DO TESTE DE NINHIDRINA PARA MISTURA FÍSICA.....	49
FIGURA 19 – ESPECTRO DE FT-IR DAS FRAÇÕES GBR1, GBR-A1, GBR-A2 E GBR-A3.....	51
FIGURA 20 - RMN NO ESTADO SÓLIDO DA FRAÇÃO NATIVA GBR1 E DA FRAÇÃO NATIVA AMINADA GBR-A2.....	52

FIGURA 21 – ALTERAÇÃO PROPOSTA PARA O DESENHO EXPERIMENTAL....	54
FIGURA 22 – DEGRADAÇÃO CONTROLADA DE SMITH DE GBR1.....	55
FIGURA 23 – CROMATOGRAMA OBTIDO POR HPSEC-MALLS-IR DA FRAÇÃO SUBMETIDA À DEGRADAÇÃO CONTROLADA DE SMITH (GBR-S).	57
FIGURA 24 - COMPARAÇÃO DO CROMATOGRAMA OBTIDO POR HPSEC-MALLS-IR DA FRAÇÃO GBR-S E DA FRAÇÃO GBR1.....	58
FIGURA 25 - ESPECTROS DE RMN DE ¹³ C DA FRAÇÃO NATIVA GBR1 E DA FRAÇÃO DEGRADADA DE SMITH GBR-S.	59
FIGURA 26 – ESPECTROS DE RMN DE ¹³ C DA REGIÃO DO ANEL DAS FRAÇÕES GBR1 E GBR-S.....	60
FIGURA 27 – ESPECTRO DE RMN DE ¹ H DAS FRAÇÕES (A) GBR1 E (B) GBR-S.	61
FIGURA 28 – ESPECTRO DE HSQC DA FRAÇÃO GBR-S.....	64
FIGURA 29 – AMPLIAÇÃO DA REGIÃO ANOMÉRICA NO HSQC DAS FRAÇÕES GBR1 E GBR-S.....	65
FIGURA 30 - COMPARAÇÃO DOS CROMATOGRAMAS OBTIDOS POR HPSEC-MALLS-IR DA FRAÇÃO GBR-S E DA FRAÇÃO DEGRADADA AMINADA GBR-SN.	68
FIGURA 31 - PERFIL DE ELUIÇÃO EM HPSEC-MALLS-IR DA FRAÇÃO DEGRADADA DE SMITH SUBMETIDA À AMINAÇÃO (GBR-SN).....	68
FIGURA 32 - ESPECTRO DE RMN DE ¹ H DAS FRAÇÕES (A) GBR-S E (B) GBR-SN.	69
FIGURA 33 – ESPECTRO DE HSQC EDITADO (¹ H- ¹³ C) DA FRAÇÃO GBR-SN....	71
FIGURA 34 – REGIÃO ANOMÉRICA DO ESPECTRO DE HSQC EDITADO (¹ H- ¹³ C) DAS FRAÇÕES (A) GBR-S E (B) GBR-SN COM DESTAQUE PARA NOVOS SINAIS OBTIDOS NESSA REGIÃO.	72
FIGURA 35 – REGIÃO DO ANEL NO HSQC DE GBR-SN.....	73

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS POLISSACARÍDEOS SULFATADOS OBTIDOS DE ALGAS VERDES.....	21
TABELA 2 – VARIÁVEIS DA REAÇÃO DE AMINAÇÃO DA FRAÇÃO POLISSACARÍDICA NATIVA GBR1.....	33
TABELA 3 – RENDIMENTOS E ANÁLISES QUÍMICAS GERAIS DA FRAÇÃO GBR1 OBTIDA DE <i>Gayralia brasiliensis</i>	37
TABELA 4 – COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DA FRAÇÃO GBR1 OBTIDA DE <i>G. brasiliensis</i>	37
TABELA 5 – BANDAS DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO (FTIR) OBSERVADAS NOS ESPECTROS DA FRAÇÃO NATIVA.....	39
TABELA 6 – DESLOCAMENTOS QUÍMICOS ATRIBUÍDOS AS UNIDADES DE RAMNOSE CONTITUÍNTES DA FRAÇÃO NATIVA GBR1 DA HETERORAMNANA DE <i>G. brasiliensis</i>	46
TABELA 7 – FUNCIONALIZAÇÃO DA FRAÇÃO NATIVA E OBTENÇÃO DE DERIVADOS AMINADOS.....	48
TABELA 8 – COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DA FRAÇÃO GBR1 OBTIDA DE <i>G. brasiliensis</i>	56
TABELA 9 – DESLOCAMENTOS QUÍMICOS ATRIBUÍDOS AS UNIDADES DE RAMNOSE CONTITUÍNTES DAS FRAÇÕES GBR1 E GBR-S.....	66
TABELA 10 – ESTUDO DE SINAIS PARA ASSINALAMENTO DO ESPECTRO DE HSQC DA FRAÇÃO GBR-SN.....	70
TABELA 11 – ASSINALAMENTOS ATRIBUÍDOS AS UNIDADES DE α -L-Rhap NA FRAÇÃO GBR-SN.....	74

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

GLC – cromatografia líquida gasosa

DPPH – 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo

HPSEC-MALLS-RI – cromatografia de exclusão estérica de alta resolução acoplada a detectores de índice de refração e espalhamento de luz

IC₅₀ – inibição de 50 % do radical formado

IR – índice de refração

IV – infravermelho

IS – índice de seletividade

ITS – região espaçadora transcrita

Mm/v – relação entre massa e massa

m/v – relação entre massa e volume

Mw – massa molecular ponderal média

ppm – partes por milhão

rDNA – DNA ribossomal

RMN – ressonância magnética nuclear

TFA – ácido trifluoracético

v/v – relação entre volume e volume

GBR1 e GBR2 – frações brutas obtidas por extrações aquosas a 80 °C (*G. brasiliensis*)

GRB-A – fração nativa GRB1 aminada

GBR-S – fração bruta degradada de Smith

GBR-SN – fração bruta degradada de Smith aminada

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	OBJETIVO	16
2.1	Objetivo Geral	16
2.2	Objetivos Específicos	16
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
3.1	Algas verdes (Chlorophytas)	17
3.2	Heteroramnanas sulfatadas derivadas do gênero <i>Gayralia</i>	18
3.3	Modificações químicas de polissacarídeos	21
3.4	Potenciais aplicações de polissacarídeos modificados	23
4	MATERIAIS E MÉTODOS	26
4.1	Materiais utilizados	26
4.1.1	Gayralia brasiliensis e posicionamento taxonômico da espécie	26
4.1.2	Coleta e processamento	26
4.1.3	Extração dos polissacarídeos da alga <i>Gayralia brasiliensis</i>	27
4.2	Métodos analíticos gerais	28
4.2.1	Dosagem de carboidratos totais	28
4.2.2	Dosagem de proteínas totais	28
4.2.3	Dosagem de ácidos urônicos.....	28
4.2.4	Dosagem de grupos O-sulfato	29
4.2.5	Teste da ninhidrina	29
4.2.6	Hidrólise ácida total para composição monossacarídica	29
4.3	Métodos espectroscópicos	30
4.3.1	Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	30
4.3.2	Espectroscopia na região do Infravermelho (IV)	31
4.4	Métodos cromatográficos	31
4.4.1	Cromatografia líquida-gasosa (GLC)	31
4.4.2	Cromatografia de Gel Permeação (HPSEC-MALLS).....	31
4.5	Modificações químicas dos polissacarídeos	32
4.5.1	Estratégia de modificações.....	32
4.5.2	Obtenção de derivados aminados	32
4.5.3	Degradação controlada de Smith	33

5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
5.1	Obtenção e análise das frações brutas de <i>G. brasiliensis</i>	35
5.1.1	Extração e obtenção dos polissacarídeos	35
5.1.2	Análises químicas da fração bruta GBR1	36
5.1.3	Composição monossacarídica da fração bruta GBR1	37
5.1.4	Espectroscopia na região do infravermelho (IV) da fração nativa GBR1	38
5.1.5	RMN de ¹³ C e HSQC da fração nativa GBR1	39
5.2	Modificação química da fração GBR1	47
5.2.1	Aminação da fração nativa GBR1 por reação de O-alkilação.....	47
5.2.2	Alteração no desenho experimental para obtenção de derivados aminados..	53
5.2.3	Degradada controlada de Smith de GBR-S	55
5.2.4	Reação de O-alkilação da fração da fração GBR-S	67
6	CONCLUSÕES.....	75
7	PERSPECTIVAS	76
	REFERÊNCIAS	77
	ANEXO I – PREDIÇÃO DE SINAIS DA TABELA 10.....	84
	ANEXO II – Espectro de HSQC de GBR1 com assinalamentos das unidades de α-L-Rhap	94
	ANEXO III – Espectro de HSQC de GBR-S com assinalamentos das unidades de α-L-Rhap.....	97

1 INTRODUÇÃO

Os polissacarídeos são produtos do processo natural de captura de carbono, a fotossíntese, seguida por rotas biossintéticas adicionais. Alguns são produzidos em grande escala na natureza e alguns têm relevância industrial como, por exemplo, aplicações farmacêuticas e em alimentos, seja em suas formas nativas ou quimicamente modificadas (CUMPSTEY, 2013). Ainda, são uma alternativa renovável em relação aos materiais de origem petroquímica para a síntese de materiais. Nesse contexto, polissacarídeos de algas marinhas representam uma importante fonte de recursos renováveis para obtenção de compostos com interesse medicinal e biotecnológico.

As macroalgas marinhas são uma fonte abundante de compostos bioativos, incluindo polissacarídeos, os quais apresentam grande diversidade estrutural com relação a composição monossacarídica e tipo de configuração anomérica das ligações glicosídicas, massa molecular e a presença e posicionamento de grupos funcionais. Nas algas, estes polissacarídeos podem ser funcionalmente componentes estruturais da parede celular ou atuar como reserva energética. Eles também apresentam diversas atividades biológicas (imunomodulação, antitumoral, anticoagulante, antiviral, entre outras), com alto potencial para aplicação em produtos farmacêuticos e biomédicos. A modificação química de polissacarídeos pode potencializar e/ou prover atividades biológicas com potencial aplicação em diferentes setores industriais.

Recentes avanços na semissíntese, caracterização e bioatividades de polissacarídeos sulfatados podem ampliar sua aplicação na indústria alimentícia ou farmacêutica (WANG et al., 2018). Os polissacarídeos sulfatados produzidos por algas marinhas apresentam uma grande variedade de atividades biológicas associadas à presença de diferentes monossacarídeos, teor e posicionamento de grupos sulfatos e massa molar. Dentre as atividades biológicas destacam-se: antiviral (DUARTE et al., 2001; DUARTE et al., 2004; CASSOLATO et al., 2008), anticoagulante (DE ARAÚJO et al., 2013; DE CARVALHO et al., 2018), imunomodulatória (LEIRO et al., 2007; TABARSA et al., 2012), antioxidante (QI et al., 2005), antitumoral (ROPELLATO et al., 2015), antiangiogênica (DIAS et al., 2005; YAO et al., 2014) e antihiperlipidêmica (PENGZHAN et al., 2003; QI et al., 2012).

Adicionalmente, existem estudos demonstrando que modificações químicas, tais como a produção de derivados aminados por modificação química dos

polissacarídeos β -glucana e quitosana, podem aumentar a atividade antimicrobiana destes polímeros (MOHY ELDIN et al., 2012; SHIN et al, 2005). A quitosana, que é um polissacarídeo obtido a partir da desacetilação da quitina, naturalmente aminada apresenta atividade antimicrobiana. Um incremento no teor de grupos aminas feito por Mohy Eldin et al. (2012) levou a um aumento na atividade antimicrobiana desse polissacarídeo. Destaca-se, no entanto, que na literatura há poucos estudos avaliando a atividade antimicrobiana de polissacarídeos sulfatados e nenhum demonstrando a atividade antimicrobiana de heteroramnanas sulfatadas de algas verdes em microrganismos patogênicos.

Desta forma, o presente trabalho busca a obtenção, caracterização de polissacarídeos sulfatados nativos e modificados quimicamente, por meio da inserção de grupos aminas, obtidos da alga verde *Gayralia brasiliensis* (Ulotrichales) para potencial aplicação biotecnológica.

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo Geral

O presente trabalho tem o objetivo geral de obtenção de polissacarídeos modificados derivados de heteroramnanas da macroalga marinha *Gayralia brasiliensis* por meio de reação de O-alkilação para inserção de grupos amina.

2.2 Objetivos Específicos

- Extrair e purificar os polissacarídeos solúveis em meio aquoso;
- Realizar reações O-alkilação para inserção de grupos amina nas frações polissacarídicas obtidas;
- Caracterizar quimicamente as frações nativa e modificadas;
- Caracterizar a estrutura química da fração polissacarídica nativa e modificada por métodos espectroscópicos: Ressonância Magnética Nuclear e Infravermelho;

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Algas verdes (Chlorophytas)

A maioria das algas conhecidas tradicionalmente como algas verdes pertence ao filo Chlorophyta. Esse filo é subdividido em três classes: Chlorophyceae, Pleurastrophyceae e Ulvophyceae. São representantes das algas verdes os gêneros *Ulva*, *Caulerpa*, *Codium*, *Enteromorpha*, *Monostroma* e *Gayralia* (LELIAERT et al., 2012; LEWIS; McCOURT, 2004).

A espécie de macroalga utilizada no presente trabalho, *Gayralia brasiliensis*, pertence à classe Ulvophyceae, ordem Ulotrichales, macroscopicamente similar à espécie *G. oxysperma*. A macroalga *G. brasiliensis* difere de *G. oxysperma* em seu habitat nas zonas entre marés de estuários da costa brasileira, maior tolerância à salinidade e em sua sequência de rDNA da região espaçadora transcrita (ITS). A espécie *G. oxysperma* tem sua localização geográfica limitada às costas da região sul e sudeste Brasil (FIGURA 1), enquanto a *G. brasiliensis* pode ser encontrada ao longo de toda a costa brasileira (PELLIZZARI et al., 2013). Vale ressaltar que, no Brasil, espécies do gênero *Gayralia* tem sido identificadas como *Monostroma oxyspermum* (Kützing) Doty e *Ulvaria oxysperma* (Kützing) Bliding (PELLIZZARI, OLIVEIRA e YOKOYA, 2008).

FIGURA 1 – DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DE *Gayralia brasiliensis* (SETA PRETA) E *G. oxysperma* (SETA BRANCA) AO LONGO DA COSTA BRASILEIRA.



SC, Santa Catarina (27°45'S, 48°30'W); PR, Paraná (25°33'S, 48°26'W); SP, São Paulo (23°55'S, 45°47'W); RJ, Rio de Janeiro (22°37'S, 41°44'W); ES, Espírito Santo (19°59'S, 40°04'W); BA, Bahia (13°38'S, 38°51'W); PE, Pernambuco (9°36'S, 35°42'W).

FONTE: PELLIZZARI et al. (2013).

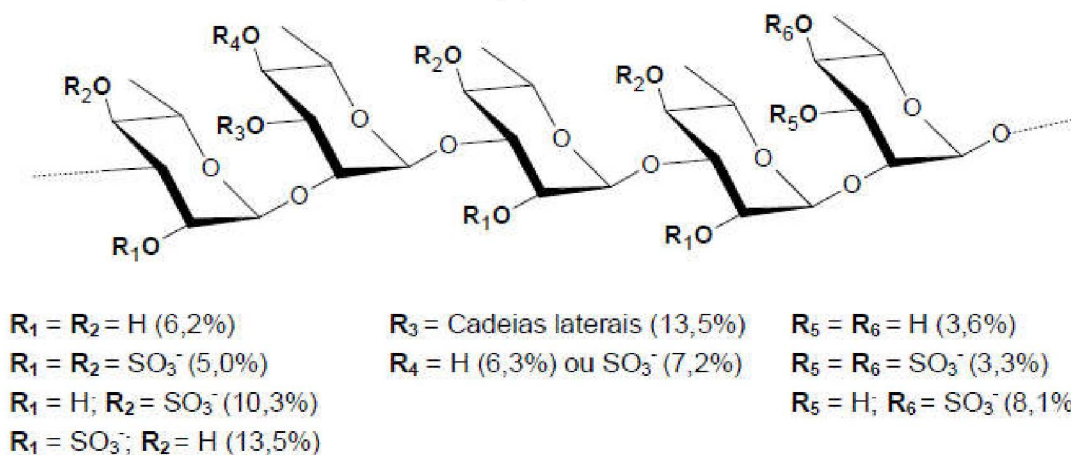
Vale ressaltar que espécies do gênero *Gayralia* podem ser cultivadas. Pelizzari e colaboradores (2007) realizaram o cultivo em escala piloto de *Gayralia* sp. na Baía de Paranaguá, utilizando um procedimento de maricultura que pode se tornar uma alternativa de renda para os moradores do litoral. Os resultados mostraram que o cultivo dessa espécie é tecnicamente viável, utilizando uma tecnologia muito simples e preservando os leitos naturais, que seriam mantidos como fonte de sementeira.

3.2 Heteroramnanas sulfatadas derivadas do gênero *Gayralia*

Polissacarídeos sulfatados, contendo como principal monossacarídeo constituinte a α -L-Rhap, foram isoladas das algas *Monostroma nitidum*, *M. latissinum*, *Gayralia oxysperma* e *G. brasiliensis* (Ulotrichales, Chlorophyta) (RAY, 2006; LEE et al., 1998; LEE et al., 2010; MAO et al., 2009; CASSOLATO, 2008; MAZEPA, 2017). Polissacarídeos similares, porém, em menor quantidade foram detectados na espécie *Bryopsis plumosa* (Bryopsidales, Chlorophyta) (CIANCIA et al., 2012).

As algas verdes do gênero *Gayralia* produzem polissacarídeos sulfatados que não apresentam padrão estrutural repetitivo de unidades monossacarídicas, denominados heteroramnanas sulfatadas. Estudos para determinação da estrutura dos polissacarídeos produzidos pela clorófito *G. oxysperma* foram conduzidos por Cassolato et al (2008) e Ropelatto et al (2015), levando a conclusão de que essa espécie sintetiza principalmente um polissacarídeo solúvel em meio aquoso. São constituídos majoritariamente por unidades de α -L-Rhap, as quais se encontram 2,3-dissubstituídas, 3- e 2-ligadas, na proporção de 0,38:1,0:0,43. As unidades de α -L-Rhap 3-ligadas estão sulfatadas em C-2 (38%) e C-4 (29%), enquanto aproximadamente 50% das unidades 2-ligadas e 2,3-dissubstituídas estão sulfatadas em C-4. Foi também identificada a presença de ácidos urônicos como constituintes da cadeia polissacarídica (terminais não redutores de ácidos glucurônico e galacturônico sulfatados em C-2, além de ácido glucurônico 4-ligado 2-sulfatado) e blocos de ramnose contendo a sequência: [\rightarrow 3)- α -L-Rhap-(1 \rightarrow 2)- α -L-Rhap-(1 \rightarrow], como mostra a FIGURA 2 (CASSOLATO, 2008).

FIGURA 2 – PRINCIPAIS UNIDADES DE RAMNOSE PRESENTES NA HETERORAMNANA SULFATADA OBTIDA DE *G. oxysperma*.

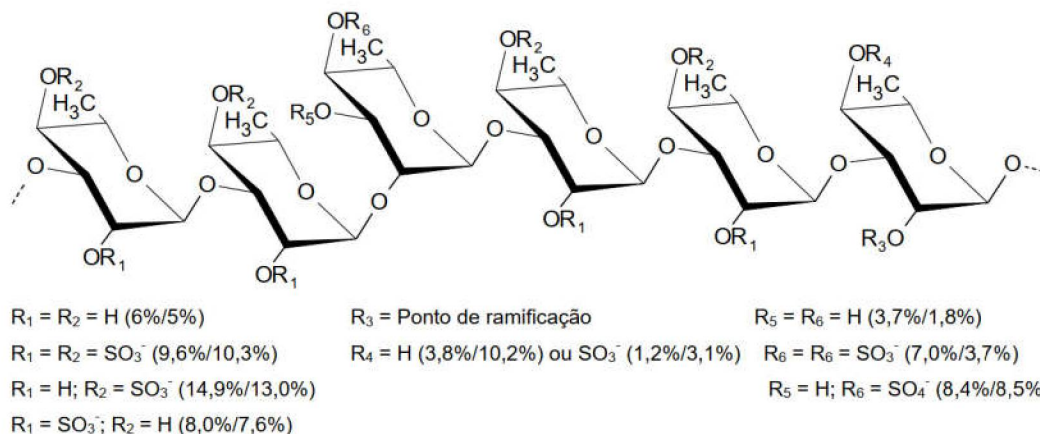


FONTE: CASSOLATO et al., 2008.

NOTA: % - mol %. Cadeias laterais contêm como terminais não redutores: Glcp 2-sulfato (5 mol %) ou GalAp 2-sulfato (4 mol %) ou Xylp (5 mol %).

Estudos para determinação da estrutura dos polissacarídeos produzidos pela clorófito *G. brasiliensis* foram conduzidos por Mazepa (2017). As heteroramnanas de *G. brasiliensis* são constituídas principalmente por unidades de α -L-Rhap 3- e 2-ligadas, as quais estão heterogeneamente distribuídas ao longo do polímero. Estas unidades são monossulfatadas, dissulfatadas ou não substituídas por grupos O-sulfato (FIGURA 3). São parcialmente ramificadas, apresentando um ponto de ramificação a cada doze unidades monossacarídicas. Além de unidades de α -L-Rhap, terminais não redutores de ácido β -D-GlcAp 2- e 2,4-sulfatados e também de ácidos β -D-GlcAp e β -D-GalAp não sulfatados, são constituintes das cadeias laterais, juntamente com terminais não redutores de β -D-Xylp, β -D-Galp e β -D-Glcp. A principal diferença entre as heteroramnanas sulfatadas produzidas por *G. brasiliensis* e *G. oxysperma* está nos padrões de substituição desses polímeros, pois ambos são constituídos pelos mesmos tipos de ligações glicosídicas, diferindo principalmente na distribuição de grupos sulfato ao longo da cadeia polissacarídica.

FIGURA 3 - ESTRUTURA ESQUEMÁTICA DAS UNIDADES DE RAMNOSE PRESENTES NAS HETERORAMNANAS SULFATADAS NATIVAS DE *G. brasiliensis*.



FONTE: MAZEPA (2017).

De modo diferente, as algas verdes pertencentes ao gênero *Ulva*, como *Ulva lactuca* e *U. fasciata*, sintetizam polissacarídeos denominados ulvanas constituídos principalmente pelo dissacarídeo: $[\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-D-GlcAp-(1}\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap-3-sulfato-(1}\rightarrow]$, denominado ulvanobiurônico 3-sulfato A (CASSOLATO, 2008). Já os polissacarídeos sulfatados extraídos de espécies do gênero *Monostroma*, diferem estruturalmente das ulvanas por apresentarem teores maiores de ramnose e menores de ácidos urônicos e xilose, além de apresentarem variações nos tipos de ligações glicosídicas (USOV; ZELINSKI, 2013).

Através da metodologia de degradação controlada de Smith, Ropellato (2011) obteve polissacarídeos derivados de heteroramnanas sulfatadas com menor massa molecular (OXS) e maior grau de sulfatação em relação às heteroramnanas sulfatadas de origem, que foi posteriormente fracionada por cromatografia de troca iônica gerando duas frações principais OXSb e OXSc. As duas frações apresentaram similaridade em relação à composição monossacarídica, sendo constituídas principalmente por ramnose.

A TABELA 1 resume a composição química de polissacarídeos sulfatados obtidos de diferentes espécies de algas verdes.

TABELA 1 – COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS POLISSACARÍDEOS SULFATADOS OBTIDOS DE ALGAS VERDES.

Espécie	Composição monossacarídica (%) ^b	Grupos sulfato (%)	Ácidos urônicos (%)	Massa molecular (Mw em g/mol)	Referência
<i>Monostroma latissimum</i>	85,4 Rha; 1,4 Ara; 5,2 Xyl; 1,3 Man; 4,7 Glc; 2,0 Gal	7,2	4	1,7 x 10 ⁵	Lee et al., 1998
<i>Gayralia oxysperma</i>	64,0 Rha; 13,0 Xyl; 12,3 GlcA; 6,7 Glc; 2,9 GalA; 1,1 Gal.	25,8	19	1,519 x 10 ⁶	Cassolato et al., 2008
<i>Gayralia oxysperma</i> (Fração OXSb)	89,6 Rha; 2,0 Xyl; 2,9 Glc; 5,5 GlcA.	33,5	5	1,093 x 10 ⁵	Ropellato et al., 2015)
<i>Gayralia oxysperma</i> (Fração OXSc)	87,8 Rha; 2,8 Xyl; 3,2 Glc; 6,2 GlcA.	41	7	2,511 x 10 ⁵	Ropellato et al., 2015
<i>Ulva fasciata</i>	49,0 Rha; 13,2 Xyl; 2,0 Gal; 5,7 Glc	21,2	30,2	n.d.	Colodi (2017)

^bRha = ramnose. Xyl = xylose. Glc = glucose. Gal = galactose. GlcA = ácido glucurônico. Ara = arabinose. Man = manose

3.3 Modificações químicas de polissacarídeos

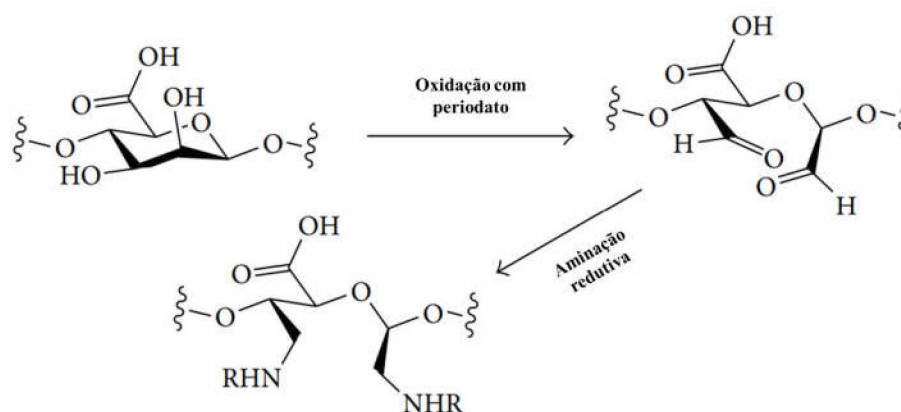
Os polissacarídeos possuem potencial para realização de modificações químicas, visando obter novos produtos com atividade biológica maior que os polissacarídeos de origem ou mesmo propiciar novas atividades biológicas. Sabe-se que existe uma estreita relação entre atividade biológica de polissacarídeos e a sua estrutura molecular (XIAO; JIANG, 2015; XIE et al., 2016).

Neste contexto, os polissacarídeos oferecem diferentes grupos funcionais para modificação química. São eles: ácidos carboxílicos, alvos de modificações nos polissacarídeos ácidos, como as pectinas, alginatos e ulvanas; grupos amino, nos polissacarídeos catiônicos constituídos por aminoaçúcares, como a quitosana; e as hidroxilas primárias e secundárias presentes em maior número em polissacarídeos neutros e pouco substituídos (CUMPSTEY, 2013).

Entre as modificações citadas acima, reações de aminação constituem um meio eficiente de conferir propriedades de valor comercial sobre os polissacarídeos

existentes. Uma das formas de introduzir grupos amina em polissacarídeos descrita por Cumpstey (2013) é através de reações de oxidação com periodato que quebram a ligação carbono-carbono entre hidroxilas vicinais e, na etapa subsequente, os aldeídos são ligados a alquil aminas de cadeia longa através de reações de aminação redutiva (FIGURA 4). O alginato foi submetido a oxidação da ligação entre C-2 e C-3 usando periodato, os aldeídos foram submetidos a aminação redutiva alquil aminas de cadeia longa para obtenção de derivados hidrofóbicos por acordo com o relatado por Yang e colaboradores (2011) (FIGURA 4).

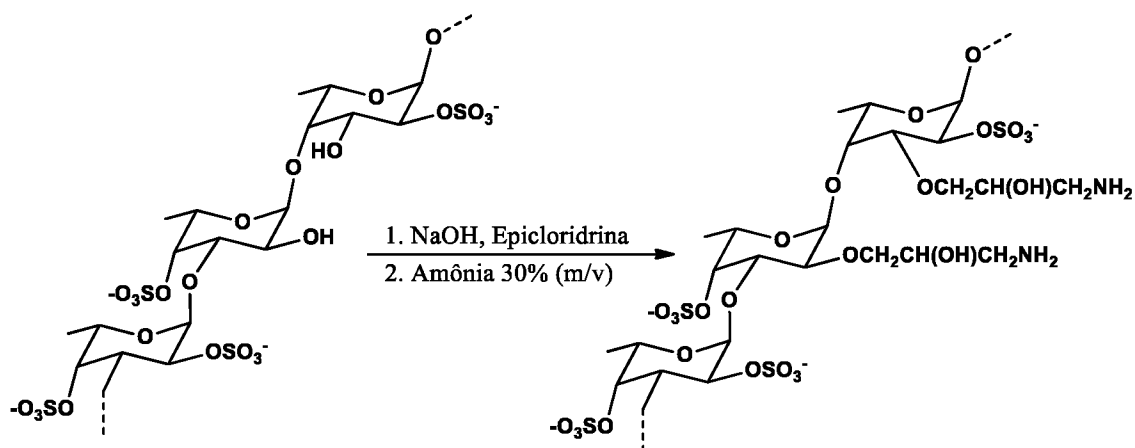
FIGURA 4 – ESQUEMA DA AMINAÇÃO REDUTIVA ÁPOS OXIDAÇÃO COM PERIODATO.



FONTE: Adaptado de CUMPSTEY (2013).

Outra maneira de produzir polissacarídeos aminados foi descrita por Soeda e colaboradores (1994). Inicialmente, a fucoidana sulfatada foi epóxi-ativada utilizando epiclorigrina em meio básico, seguida da aminação do produto intermediário por dissolução em solução de amônia a 30% (FIGURA 5). Fernando e colaboradores (2019) destaca que não é possível fazer a aminação direta da fucoidana devido à presença dos grupos sulfatos em diferentes posições, que podem levar ao impedimento estérico da reação. Assim, a introdução de molécula espaçadora (por exemplo, epiclorigrina) com um grupo funcional reativo é necessária para ativar o derivado em reações de aminação.

FIGURA 5 – AMINAÇÃO DA FUCOIDANA.



FONTE: Adaptada de FERNANDO et al. (2019) pelo autor.

Ainda, como forma de introduzir grupos amina em moléculas de polissacarídeos, outras moléculas contendo grupos amina podem ser utilizadas, como por exemplo, cloridrato de 3-cloropropilamina. A funcionalização de (1→3)- α -D-glucana por meio da reação de O-alkilação utilizando os reagentes cloridrato de 3-cloropropilamina e cloridrato de 2-cloroetilamina como agentes eterificantes foi reportada por Bao e colaboradores (2001) para obtenção do polissacarídeo com grupos amina em sua estrutura.

3.4 Potenciais aplicações de polissacarídeos modificados

Polissacarídeos sulfatados da alga verde *Enteromorpha prolifera* apresentam atividade antioxidante (LI et al., 2013). Estes polissacarídeos são constituídos por unidades de ramnose e glucose (1:1) com menores porcentagens de xilose, manose, galactose e fucose. Derivados de baixo peso molecular (3,1 kDa), produzidos por degradação do polissacarídeo original, tiveram efeito inibitório mais forte no radical hidroxila, IC₅₀ de 0,39 mg.ml⁻¹, em comparação com amostras de alto peso molecular, e seu efeito quelante foi de 77,3% a 5 mg.ml⁻¹, que foi duas vezes maior do que o polissacarídeo inicial.

Zhang e colaboradores (2011) reportaram a obtenção de derivados de polissacarídeos sulfatados de *Enteromorpha linza* com atividade antioxidante. Foram sintetizados derivados persulfatados e acetilados, investigados quanto ao efeito sequestrante dos radicais superóxido, hidroxila e DPPH. Os derivados tiveram atividade antioxidante superior ao polissacarídeo original podendo ser aplicados como

inibidores de radicais livres ou quelantes, agindo possivelmente como antioxidantes primários.

Os polissacarídeos sulfatados, nativos e modificados quimicamente têm sido explorados como potenciais agentes anticoagulantes e/ou antitrombóticos em substituição à heparina, anticoagulante de referência (DOS SANTOS-FIDENCIO et al., 2019; DE CARVALHO et al., 2018). Fucoídana, um polissacarídeo sulfatado obtido de algas pardas que possui atividade anticoagulante, foi modificado quimicamente por aminação por Soeda e colaboradores (1994). O derivado aminado mostrou-se mais potente que a fucoídana nativa como anticoagulante e a sua eficácia foi comparável à da fucoídana oversulfatada (SOEDA et al., 1994).

Polissacarídeos de algas marinhas, principalmente os sulfatados, como fucoídana e laminarina mostraram ter atividade antibacteriana contra *Escherichia coli* e espécies de *Staphylococcus*. A fucoídana da alga *Laminaria japonica* e alginato de sódio inibem *E. coli* aderindo à bactérias e matando esses microrganismos, mostrando assim propriedades bactericidas (KRAAN et al, 2012; LI et al, 2010; DE JESUS RAPOSO et al, 2015). Berri e colaboradores (2016) avaliaram o extrato aquoso de polissacarídeos sulfatados obtido da macroalga verde *Ulva armoricana* contra 42 cepas bacterianas e observaram que o crescimento de bactérias gram-positivas e gram-negativas foi afetado pela presença do extrato no meio de cultivo.

Pierre e colaboradores (2011) investigaram a atividade antimicrobiana *in vitro* dos polissacarídeos da alga verde marinha *Chaetomorpha aerea* contra bactérias gram-positivas, gram-negativas e um fungo. Os polissacarídeos foram denominados pelos autores de galactana sulfatada (58 % de galactose e menores porcentagens de arabinose e glucose) e exibiram atividade antibacteriana seletiva contra três bactérias gram-positivas incluindo *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). A concentração inibitória mínima de 40 mg.mL⁻¹ foi reportada para esta cepa. Além disso, oligossacarídeos de algas marrons demonstraram potencial antimicrobiano *in vivo* inibindo a colonização de *Salmonella enteritidis* em frangos de corte (YAN et al, 2011).

Polissacarídeos modificados podem ser uma alternativa como agentes antimicrobianos. Estudos de atividade antimicrobiana têm sido realizados especialmente com polissacarídeos aminados. Shin et al (2005) avaliaram a atividade antimicrobiana da β -glucana de aveia nativa e modificada por aminação contra *Escherichia coli* e *Bacillus subtilis*. O polissacarídeo modificado foi mais efetivo que o nativo, o que pode ser explicado pela natureza catiônica do polissacarídeo aminado.

Vários estudos relatam a atividade antimicrobiana da quitosana, obtida pela desacetilação parcial da quitina. A atividade antimicrobiana deste polissacarídeo de ambiente marinho é relacionada com o seu conteúdo do monossacarídeo aminado glucosamina. Mohy Eldin e colaboradores (2012) demonstraram em estudo que a inclusão de novos grupamentos aminas na quitosana aumenta a atividade antimicrobiana do polímero em comparação com a quitosana nativa. Nesse trabalho, a atividade antimicrobiana foi testada frente à *E. coli*, *B. cereus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*.

Polissacarídeos modificados também podem ser empregados como biomateriais. Nanopartículas magnéticas revestidas com polissacarídeos contendo grupos funcionais reativos são de grande interesse, especialmente como substratos para a imobilização de ligantes em biomedicina e catálise (ZIEGLER-BOROWSKA, 2019). O revestimento de nanopartículas magnéticas para essa finalidade foi realizado por Ziegler-Borowska (2019) com amido modificado por oxidação com periodato seguida de aminação com diamina. As nanopartículas revestidas foram efetivas na imobilização de albumina de soro humano, que permaneceu ativa. Isto possibilita o uso das nanopartículas magnéticas com biomoléculas imobilizadas para uso em diagnósticos.

Desta forma, a modificação química de polissacarídeos representa uma área de grande interesse biotecnológico para a obtenção de novos produtos com aplicação em diferentes setores, como biomédico.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais utilizados

4.1.1 *Gayralia brasiliensis* e posicionamento taxonômico da espécie

Super-Reino: Eucariota

Reino: Plantae

Sub-reino: Viridiplantae

Filo: Chlorophyta

Classe: Ulvophyceae

Ordem: Ulotrichales

Família: Gayraliaceae

Gênero: *Gayralia*

Espécie:

***Gayralia brasiliensis* Pellizzari, M.C.Oliveira & N.S.Yokoya**

4.1.2 Coleta e processamento

Os exemplares de *G. brasiliensis* (FIGURA 6) foram coletados em seu ambiente natural na baía de Paranaguá, no município de Paranaguá-PR, sendo identificadas e cedidas pela Dra. Franciane M. Pellizzari (Departamento de Ciências Biológicas - Faculdade Estadual de Filosofia, Ciências e Letras de Paranaguá).

FIGURA 6 - ASPECTO GERAL DA MACROALGA *G. brasiliensis*.



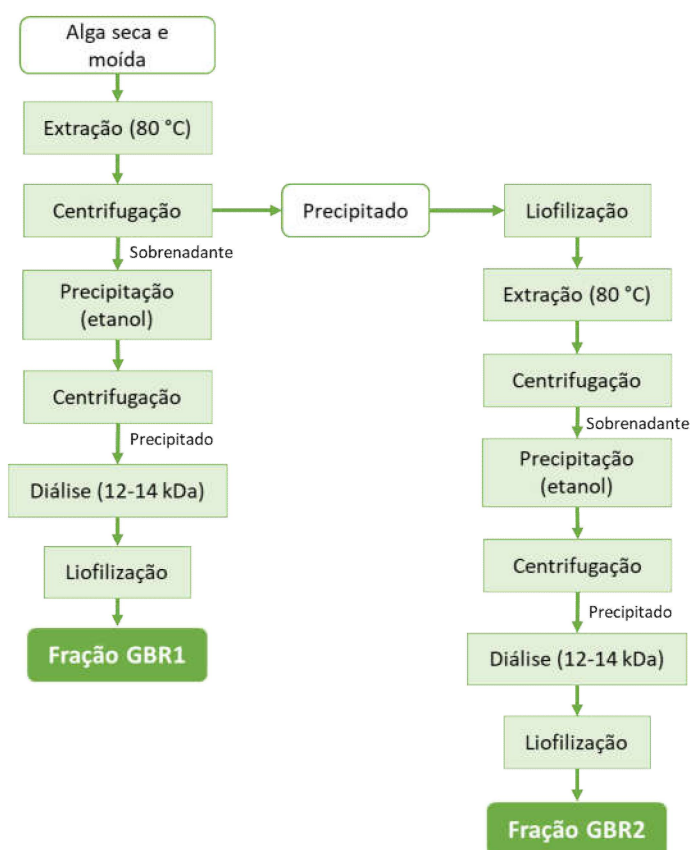
FONTE: PELLIZZARI et al., 2013.

A alga verde *G. brasiliensis* foi inicialmente lavada em água doce, seca em temperatura ambiente e moída em gral. Após esta etapa, a alga foi submetida ao processo de extração aquosa como descrito a seguir.

4.1.3 Extração dos polissacarídeos da alga *Gayralia brasiliensis*

Os exemplares da alga secos e moídos foram submetidos a duas extrações aquosas sequenciais em concentração 3% (p/v), temperatura de 80°C, sob agitação mecânica, por 5 h. Após cada etapa, os extratos foram tratados com etanol P.A. (3:1 v/v) e acetato de potássio (CH₃COOK) para precipitação dos polissacarídeos. Após a precipitação, o material obtido foi centrifugado (7700 x g, 20 minutos, 5°C) e os polissacarídeos foram ressolubilizados em água destilada. Em seguida, os polissacarídeos foram dialisados sequencialmente (membrana *cut off* de 12 a 14 kDa) contra água destilada, NaCl 1 M, e água destilada e, então, liofilizados (FIGURA 7).

FIGURA 7 – FLUXOGRAMA DA EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS.



FONTE: O autor (2019).

As frações polissacarídicas obtidas foram denominadas GBR1 e GBR2, referindo-se à espécie da alga a partir da qual foram obtidos (GBR = *Gayralia brasiliensis*) e à ordem de extrações realizadas (1 e 2). A biomassa residual de alga obtida na segunda extração foi liofilizada e armazenada a -20°C.

A fração GBR1 foi ressuspensa em água destilada e submetida a uma nova centrifugação (9000 RPM/20 minutos) para remoção de material insolúvel. A fração GBR1, de maior rendimento, foi utilizada para as modificações químicas no presente trabalho e a fração GBR2 foi reservada para estudos posteriores.

4.2 Métodos analíticos gerais

4.2.1 Dosagem de carboidratos totais

Para determinação do teor de carboidratos totais foi utilizado o método colorimétrico do fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS et al., 1956), utilizando padrão de ramnose na concentração inicial 1 mg.mL^{-1} , a partir do qual foram realizadas diluições para realização da curva-padrão, respeitando a linearidade do método (10-40 μg de ramnose). A leitura das absorbâncias foi realizada em espectrofotômetro modelo BEL Photonics SP 1105 no comprimento de onda de 480 nm.

4.2.2 Dosagem de proteínas totais

O teor de proteínas totais foi determinado de acordo com o método de Lowry et al. (1951), utilizando-se o reativo de Folin-Ciocalteu e padrão de albumina soro bovina (BSA) na concentração inicial de 1 mg.mL^{-1} , a partir da qual foram realizadas diluições para realização da curva-padrão, respeitando a linearidade do método (5–100 μg), em concentrações equivalentes a 10, 20, 40, 60 e 70 μg de proteína. A leitura das absorbâncias foi realizada em espectrofotômetro modelo BEL Photonics SP 1105 no comprimento de onda de 660 nm.

4.2.3 Dosagem de ácidos urônicos

O teor de ácidos urônicos foi determinado pelo método da *m*-hidroxibifenila (FILISSETTI-COZZI; CARPITA, 1991). Para realização da curva-padrão foi utilizado o ácido glucurônico na concentração $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$, respeitando a linearidade de 1-38 μg de ácido glucurônico em concentrações equivalentes a 2, 5, 10, 20 e 30 μg de ácido urônico. As amostras foram preparadas na concentração de 1 mg.mL^{-1} , sendo utilizados 100 μL da solução de amostra na dosagem. As amostras foram preparadas em triplicata e as leituras foram realizadas em espectrofotômetro BEL Photonics SP 1105 no comprimento de onda de 525 nm.

4.2.4 Dosagem de grupos O-sulfato

Os teores de grupos sulfato foram determinados utilizando como reagente a mistura gelatina-bário (DODGSON e PRICE, 1962). Inicialmente foi realizada a hidrólise total dos polissacarídeos (entre 2 a 4 mg de amostra) com HCl 1 mol.L⁻¹ por 5 horas, em temperatura de 105-110°C, que ocasiona a liberação dos grupamentos sulfato. Às amostras hidrolisadas, foi adicionado o reativo gelatina-bário. O sulfato em contato com o íon bário (solução como BaCl₂) forma um composto insolúvel, o BaSO₄, que se mantém suspenso na gelatina, resultando em turbidez, cuja absorbância foi avaliada em espectrofotômetro. Como padrão foi utilizada uma solução de sulfato de sódio (Na₂SO₄), diluída em HCl 1 mol.L⁻¹, na concentração 1 mg.mL⁻¹, respeitando a linearidade de 2 -200 µg de sulfato, nas concentrações equivalentes a 30, 60, 90, 150 e 190 µg de sulfato de sódio. A leitura das absorbâncias foi realizada em espectrofotômetro modelo BEL Photonics SP 1105 no comprimento de onda de 360 nm.

4.2.5 Teste da ninhidrina

O teste colorimétrico da ninhidrina, para avaliação da presença de nitrogênio, foi realizado através da adaptação do método descrito para detecção de aminoácido (YEMM; COCKING; RICKETTS, 1955). Para a realização do teste, foi preparada uma solução de polissacarídeo nativo (20 mg.mL⁻¹) para controle e uma solução de polissacarídeo modificado (20 mg.mL⁻¹) para teste qualitativo. Para a realização do teste uma alíquota de 100 µL da solução de polissacarídeo foi adicionada em tubo de ensaio, onde em seguida foram adicionados 2 mL de solução de ninhidrina (0,1% p/v) em tampão fosfato (0,01 M, pH=7). Para controle positivo foi utilizado uma solução de 1,7 mg/mL de glucosamina. Os tubos foram colocados em banho-maria fervente por 5 minutos. A coloração roxo/azulada representa positividade para o teste.

4.2.6 Hidrólise ácida total para composição monossacarídica

Para determinação da composição monossacarídica, as frações polissacarídicas (aproximadamente 1 mg) foram hidrolisadas com TFA 1 mol.L⁻¹ por 4 horas a 100 °C. Os monossacarídeos hidrolisados foram reduzidos com NaBH₄ por 15 horas a temperatura ambiente. Após, o excesso de NaBH₄ foi neutralizado com ácido acético (1:1 v/v) formando ácido bórico. As amostras foram co-destiladas com metanol

(3 x) para remoção do ácido bórico na forma de borato de metila. Os alditóis foram acetilados com 1 mL de anidrido acético (120 °C por 1 hora). Os acetatos de alditóis foram analisados por cromatografia líquida gasosa (GLG).

4.3 Métodos espectroscópicos

4.3.1 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

As análises de Ressonância Magnética Nuclear (RMN de ^{13}C , RMN de ^1H , $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ HSQC) foram realizadas no Centro de RMN da UFPR em espectrômetro da marca BRUKER, modelo DRX 400, série Avance, à temperatura de 70 °C, em tubos de 5 mm de diâmetro e aproximadamente 20 cm de comprimento. As amostras solubilizadas em D_2O tiveram seus deslocamentos químicos, expressos em ppm, determinados utilizando acetona como padrão interno tanto para as análises RMN de ^{13}C (31,45 ppm) como para ^1H (2,225 ppm).

Os espectros de RMN de ^{13}C foram obtidos utilizando a frequência base de 100,61 MHz, com intervalo de aquisição de sinal de 0,6 segundos, sendo feitas de 4.000–70.000 aquisições, utilizando-se um intervalo de 0,1 segundo entre os pulsos. Os espectros de RMN de ^1H foram obtidos na frequência base de 400,13 MHz, sendo necessário promover a troca dos hidrogênios das hidroxilas por deutério e a remoção completa das moléculas de água presentes, através da dissolução das frações em D_2O , congelamento e liofilização (sendo este processo repetido por 3 vezes), com a finalidade de diminuir a intensidade do sinal relativo ao hidrogênio ligado ao oxigênio da água, o qual prejudica a qualidade do espectro obtido.

Foram também obtidos espectros bidimensionais de HSQC (*Heteronuclear Single Quantum Correlation Spectroscopy*). As amostras foram preparadas seguindo mesmo protocolo para RMN de ^1H e ^{13}C .

Os espectros de RMN em estado sólido foram realizados a temperatura ambiente em espectrofotômetro Bruker AVANCE 400, observando o núcleo de ^{13}C a 100,6 MHz, equipado com uma sonda multinuclear de 4 mm, com giro no ângulo mágico (MAS). As amostras sólidas foram utilizadas na quantidade suficiente para preenchimento completo do rotor.

4.3.2 Espectroscopia na região do Infravermelho (IV)

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

4.4 Métodos cromatográficos

4.4.1 Cromatografia líquida-gasosa (GLC)

As análises por CLG para a avaliação da composição monossacarídica foram realizadas em Cromatógrafo a gás VARIAN, utilizando nitrogênio como gás de arraste e coluna capilar de sílica fundida (30 m X 0,25 mm d.i.), revestida com DB-225 (0,25 μm). As análises para acetatos de alditóis foram realizadas à 220 °C, com o injetor à 250 °C e detector de ionização de chama à 300 °C. A quantificação dos acetatos de alditóis foi realizada utilizando os fatores resposta para desoxihesoses (0,70), hexoses (0,89) e pentoses (0,75) (BIERMANN; MCGINNIS, 1989).

4.4.2 Cromatografia de Gel Permeação (HPSEC-MALLS)

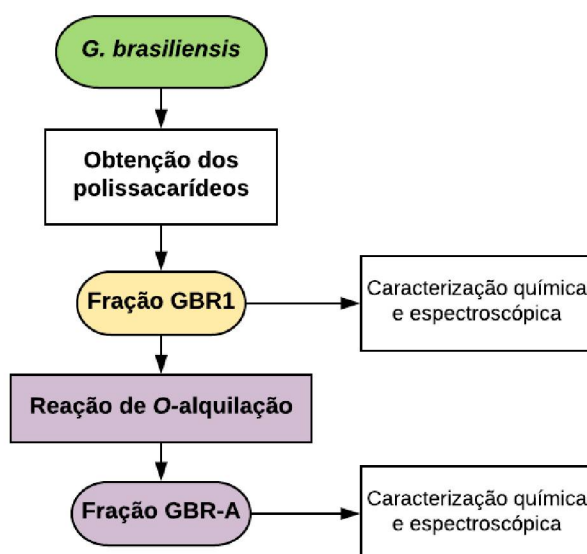
Os ensaios de homogeneidade foram realizados em cromatógrafo de exclusão estérica de alta pressão (HPSEC) conforme metodologia descrita por Cassolato (2008). Para análise de homogeneidade e de determinação da massa, as amostras foram solubilizadas em nitrito de sódio (NaNO_3 0,1 mol.L⁻¹) contendo azida de sódio (200 ppm) dissolvidas em água milliQ, para se obter uma solução polissacarídica com concentração final de 1 mg.mL⁻¹. As amostras foram filtradas em membranas MILLIPORE (acetato de celulose) de 0,22 μm . Os ensaios de homogeneidade foram realizados em cromatógrafo de exclusão estérica de alta pressão (HPSEC). Os resultados foram interpretados utilizando o software ASTRA.

4.5 Modificações químicas dos polissacarídeos

4.5.1 Estratégia de modificações

As modificações químicas foram realizadas com o objetivo de inserir grupos amina na estrutura do polissacarídeo extraído. Para isso, foi seguida a estratégia mostrada no fluxograma abaixo (FIGURA 8). Como não foram encontrados relatos na literatura da modificação química de polissacarídeos sulfatados utilizando o reagente cloridrato de 3-cloropropilamina, foi proposta sua utilização como forma de inserir grupos aminos na heteroramnana sulfatada obtida da macroalga *G. brasiliensis*.

FIGURA 8 – DESENHO EXPERIMENTAL.

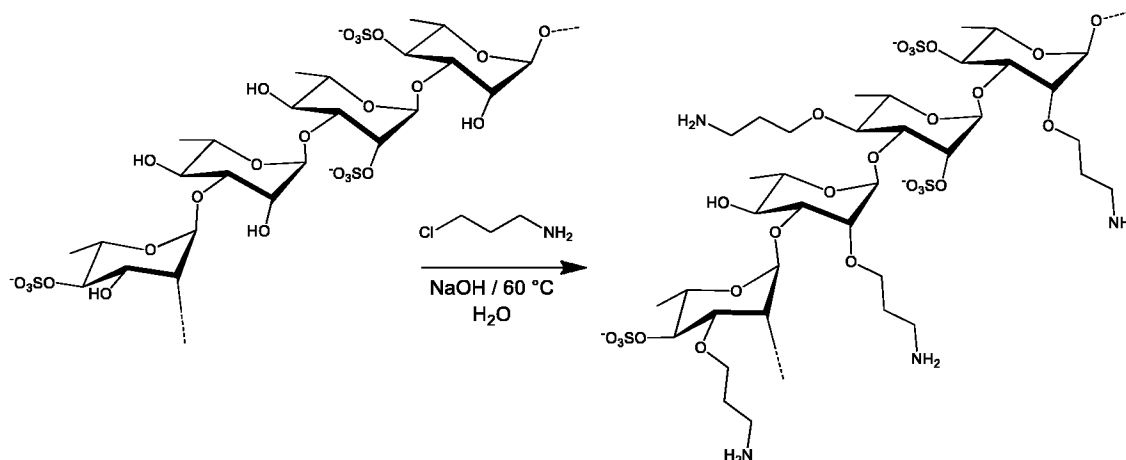


Fonte: O autor (2019).

4.5.2 Obtenção de derivados aminados

A proposta de funcionalização do polissacarídeo envolve a reação de O-alkilação com o reagente 3-cloropropilamina com o objetivo de inserir o radical propilamina ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$) na fração polissacarídica, seguindo metodologia proposta por Tarpanov et al. (1999) com modificações, esquematizada na FIGURA 9.

FIGURA 9 – ESQUEMA DA REAÇÃO ESPERADA ENTRE A FRAÇÃO GBR1 E 3-CLOROPROPILAMINA.



Fonte: O autor (2019).

Para a obtenção dos derivados aminados, as frações de interesse foram dissolvidas em água destilada, sendo adicionados em seguida hidróxido de sódio e 3-cloropropilamina. A mistura foi mantida na temperatura de 60°C por 2-6 horas e sob agitação magnética para reação. Depois de resfriado, o meio reacional foi dialisado contra água destilada (membrana de 6–8 kDa) para recuperação dos produtos de reação. As quantidades e condições reacionais para a funcionalização do polissacarídeo nativo estão listadas na TABELA 2.

TABELA 2 – VARIÁVEIS DA REAÇÃO DE AMINAÇÃO DA FRAÇÃO POLISSACARÍDICA NATIVA GBR1.

Entrada	GBR1 (mg)	Cl(CH ₂) ₃ NH ₂ (mg)	NaOH (mg)	Água (mL)	Temperatura (°C)	Tempo (h)
01	100	845	560	2	60	6
02	100	425	560	2	60	6
03	50	213	280	1	60	2

As frações obtidas da O-alkilação de GRB1 foram denominadas de GBR-A1, GBR-A2 e GBR-A3, respectivamente, de acordo com o número da entrada da reação.

4.5.3 Degradação controlada de Smith

Para realização da degradação controlada de Smith, a fração GBR1 (500 mg) foi solubilizada em 50 mL de água destilada, sendo adicionada posteriormente 50 mL da solução de *m*-NaIO₄ (metaperiodato de sódio) 0,1 mol.L⁻¹, obtendo-se uma

concentração final de 0,05 mol.L⁻¹. Essa solução foi mantida no escuro por 72 horas, sob agitação, a temperatura ambiente. Após esse período, a solução foi tratada com 40 mL de etilenoglicol (para consumir o excesso de *m*-NaIO₄), dialisada contra água destilada (membrana de 6–8 kDa) para retirada do sal formado, e concentrada (em evaporador rotatório sob pressão reduzida).

A amostra oxidada foi reduzida com 750 mg NaBH₄ por 20 horas a temperatura ambiente, neutralizada com ácido acético, dialisada e liofilizada (GOLDSTEIN et al., 1965).

Após a degradação controlada de Smith, a fração resultante foi submetida à hidrólise ácida parcial com TFA 1 mol.L⁻¹ (10 mg de polissacarídeo/mL de TFA 1 mol.L⁻¹) por 20 horas a temperatura ambiente, sob agitação. A amostra foi neutralizada, dialisada contra água destilada (membrana de 6–8 kDa) e liofilizada (FURNEAUX; STEVENSON, 1990). A fração resultante foi identificada com adição da letra “S” (Smith) ao nome da fração original (GBR-S).

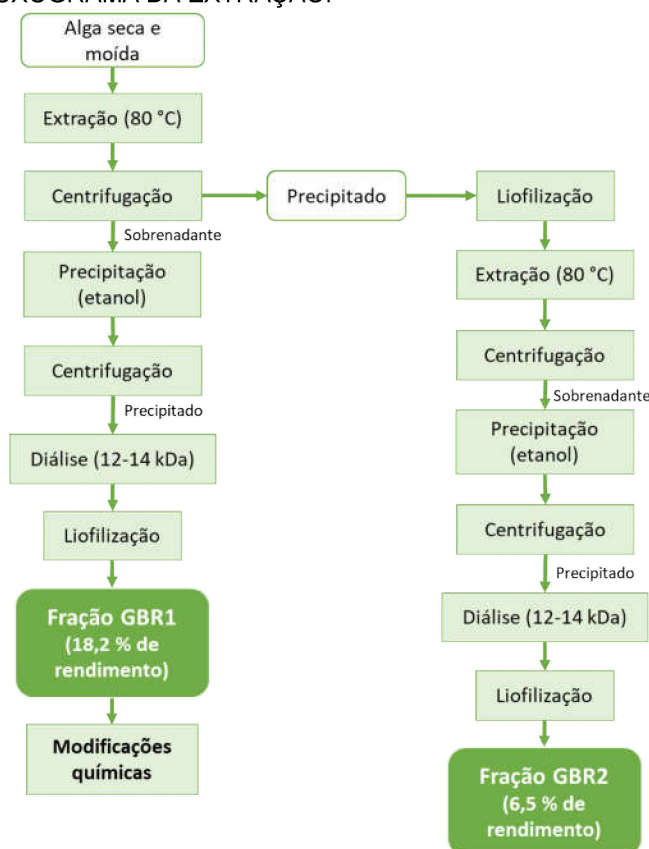
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Obtenção e análise das frações brutas de *G. brasiliensis*

5.1.1 Extração e obtenção dos polissacarídeos

A extração dos polissacarídeos da *Gayralia brasiliensis* foi realizada conforme procedimento descrito no item 4.1.3. Os exemplares da macroalga secos e moídos foram submetidas a duas extrações aquosas sequenciais em concentração 3% (p/v), temperatura de 80°C, sob agitação mecânica, por 5 h. Após cada etapa, os extratos foram tratados com etanol (3:1 v/v) e acetato de potássio (CH₃COOK) para precipitação dos polissacarídeos. Após a precipitação, o material obtido foi centrifugado (7700 x g, 20 minutos, 5°C) e os polissacarídeos foram ressolubilizados em água destilada. Em seguida, os polissacarídeos foram dialisados sequencialmente (membrana *cut off* de 12 a 14 kDa) contra água destilada, NaCl 1 M, e água destilada, e liofilizados conforme fluxograma da FIGURA 10.

FIGURA 10 – FLUXOGRAMA DA EXTRAÇÃO.



Fonte: O autor (2019).

O rendimento da extração para a fração GBR1 foi de 18,2% e de 6,5% para a fração GBR2, em relação à quantidade de biomassa seca utilizada no início da extração, totalizando 24,7% de polissacarídeos obtidos da espécie *G. brasiliensis*. Esses valores foram superiores aos obtidos por Ropellato (2011) e Cassolato et al. (2008) para as frações brutas de *G. oxysperma*. Ropellato (2011) obteve rendimentos que variaram de 1,3 a 7,4% por extração, sendo a fração majoritária a obtida pela segunda extração a quente, enquanto os rendimentos obtidos nas extrações a frio e a quente desta mesma alga por Cassolato et al. (2008) variaram de 0,6 a 13,8%. Entretanto, os rendimentos obtidos foram inferiores aos obtidos por Mazepa (2017) para frações brutas de *G. brasiliensis*, que foram de 33% na primeira extração a quente e de 7% na segunda. Vale ressaltar que Mazepa (2017) fez a moagem da macroalga para extração de maneira diferente utilizando um moinho (IKA® A11 Basic), obtendo, assim, um produto de menor granulometria quando comparado com a moagem em graal executada no presente trabalho. Dessa forma, moagem com granulometria menor pode favorecer a extração dos polissacarídeos, pois a superfície de contato é maior durante a extração quando se utiliza um pó mais fino.

A fração de maior rendimento (GBR1) foi selecionada para caracterização e modificação no presente trabalho, sendo a fração obtida na segunda extração (GBR2) reservada para estudos futuros.

5.1.2 Análises químicas da fração bruta GBR1

A fração polissacarídica GBR1 obtida de *G. brasiliensis* apresenta um alto teor de grupamentos O-sulfatos (25,2%). Esse valor foi semelhante aos encontrados para heteroramnanas de *G. oxysperma* por De Carvalho (2013), os quais foram de 21,2-30,7% e por Cassolato et al. (2008), os quais foram de 23,5-30,9%. Adicionalmente, esses valores também são semelhantes aos obtidos para heteroramnanas de *G. brasiliensis* por Mazepa (2017) que foram de 29-36,8% de grupamentos sulfatos.

TABELA 3 – RENDIMENTOS E ANÁLISES QUÍMICAS GERAIS DA FRAÇÃO GBR1 OBTIDA DE *Gayralia brasiliensis*.

Frações	Rendimento ^a (%)	Carboidrato total ^b (%)	Sulfato ^c (%)	Proteína ^d (%)	Urônicos ^e (%)
GBR1	18,5	51,9	25,2	2,9	10,2

^a Rendimento em relação ao peso seco da alga; ^b, ^c, ^d, ^e Determinações de acordo com os métodos de Dubois et al. (1956), Dodgson e Price (1962), Filisetti-Cozzi e Carpita (1991) e Lowry et al. (1951), respectivamente;

Na TABELA 3 podem-se observar os valores encontrados pela dosagem de ácidos urônicos (10,2%) na fração GBR1. Esses valores também são semelhantes obtidos por Mazepa (2017), os quais foram de 12 a 13,4%. Ainda, foi detectada a presença de proteínas (2,9%), relatado também por Mazepa (2017), De Carvalho (2013), Ropelatto et al. (2015) e Cassolato et al. (2008).

5.1.3 Composição monossacarídica da fração bruta GBR1

Para a determinação da composição monossacarídica na forma de monossacarídeos neutros (TABELA 4), a fração GBR1, foi submetida ao processo de hidrólise ácida total, redução e acetilação. Os acetatos de alditóis foram quantificados por cromatografia líquido-gasosa (GLC) utilizando os fatores resposta como descrito no item 4.4.1.

TABELA 4 – COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DA FRAÇÃO GBR1 OBTIDA DE *G. brasiliensis*.

Frações	Composição monossacarídica (mol %)						
	Rha ^a	Xyl	Glc	Gal	Ara	Man	Urônicos ^b
GBR1	54,5	20,4	16,1	2,7	4,9	1,3	10,2

^a Rha = ramnose, Xyl = xilose, Gal = galactose, Glc = glucose, Ara = arabinose, Man, = manose (carboidratos neutros determinados por GLC na forma de acetatos de alditol); ^b Porcentagem obtida da dosagem colorimétrica (Filisetti-Cozzi e Carpita, 1991).

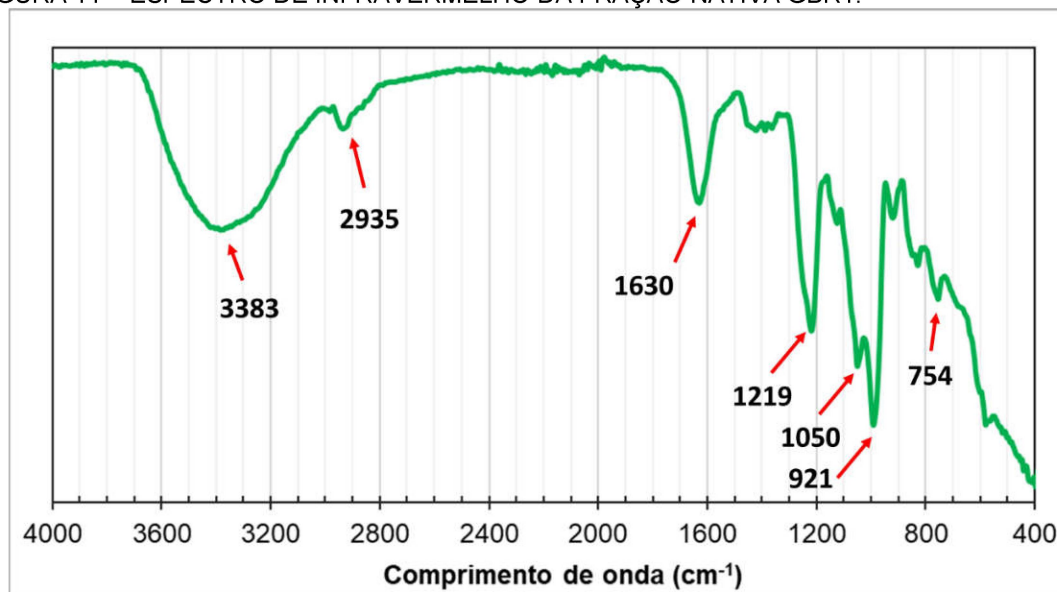
A fração GBR1 tem como monossacarídeo neutro majoritário a ramnose (54,5 mol%), além de xilose (20,4 mol%) e glucose (16,1 mol%) em menores porcentagens. Galactose, arabinose e manose representam 8,9 mol% dos monossacarídeos neutros. Esses resultados estão de acordo com o obtido por Mazepa (2017), que também identificou a ramnose (69,9 a 79,7 mol%) como principal monossacarídeo presente nas frações de *G. brasiliensis*, seguido de glucose (7,8 a 16,8 mol%), xilose (9,5 a 11,5 mol%), e menores teores de galactose (1,5 a 5,5 mol%). Os resultados também

foram similares aos encontrados por Cassolato et al. (2008) para as frações obtidas de *G. oxysperma*, que possui como principal monossacarídeo ramnose (56,0–88,6 mol%), e também, em diferentes proporções, xilose (3,9–10,4 mol%), glucose (2,8–21,0 mol%), galactose (2,1–6,2 mol%), arabinose (3,0–10,1 mol%) e manose (1,2–2,5 mol%).

5.1.4 Espectroscopia na região do infravermelho (IV) da fração nativa GBR1

A análise por espectroscopia no infravermelho permite determinar e classificar bandas relativas à estiramento e vibrações características de grupos funcionais. Duas bandas de maior intensidade em 3383 cm^{-1} e entre 990 e 1050 cm^{-1} , além das bandas em 2935 cm^{-1} , 1219 cm^{-1} , 921 cm^{-1} e 754 cm^{-1} estão presentes no espectro de infravermelho da fração polissacarídica GBR1 (FIGURA 11).

FIGURA 11 – ESPECTRO DE INFRAVERMELHO DA FRAÇÃO NATIVA GBR1.



FONTE: O autor (2019).

A banda em 3383 cm^{-1} refere-se ao estiramento da ligação O-H das hidroxilas (OH) e a outra banda observada entre 990 e 1050 cm^{-1} pode ser atribuída ao estiramento da ligação C-O-C. Esses valores estão de acordo os valores encontrados por Shin et al. (2005). A banda em aproximadamente 1630 cm^{-1} foi atribuída à vibração da ligação C=O presente nos ácidos urônicos (JAIN et al., 2009; PENGZHAN et al., 2003; TAKO et al., 2015). Absorções na região de 2935 cm^{-1} resultam do estiramento da ligação C-H (TAKO et al., 2015). Bandas próximas a 1220 cm^{-1} e 750 cm^{-1} indicam a presença de ésteres de sulfato como substituintes. A banda próxima a 1220 cm^{-1} foi

atribuída ao estiramento C-O-S (PENGZHAN et al., 2003; RAY; LAHAYE, 1995; TAKO et al., 2015). As bandas relacionadas a presença de grupos O-sulfato foram demonstradas por Ray e Lahaye (1995) para polissacarídeos obtidos da alga marinha *Ulva rígida*.

A TABELA 5 resume os principais assinalamento das bandas no espectro da fração polissacarídica nativa GBR1.

TABELA 5 – BANDAS DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO (FTIR) OBSERVADAS NOS ESPECTROS DA FRAÇÃO NATIVA.

Número de onda (cm ⁻¹)	Atribuição	Referências
GBR1		
3383	Estiramento da ligação O-H das hidroxilas	Shin et al. (2005) Tako et al. (2015)
2935	Estiramento C-H	Tako et al. (2015)
1630	Vibração da ligação C=O presente em ácidos urônicos.	Jain et al., 2009 Pengzhan et al. (2003) Tako et al. (2015)
1219	Estiramento da ligação C-O-S.	Pengzhan et al. (2003) Ray; Lahaye (1995) Tako et al. (2015)
990 – 1050	Estiramento da ligação C-O.	Shin et al. (2005) Pengzhan et al. (2003) Tako et al. (2015)
921	Não identificado.	-
754	Presença de ésteres de sulfato como substituintes.	Pengzhan et al. (2003) Ray; Lahaye (1995) Tako et al. (2015)

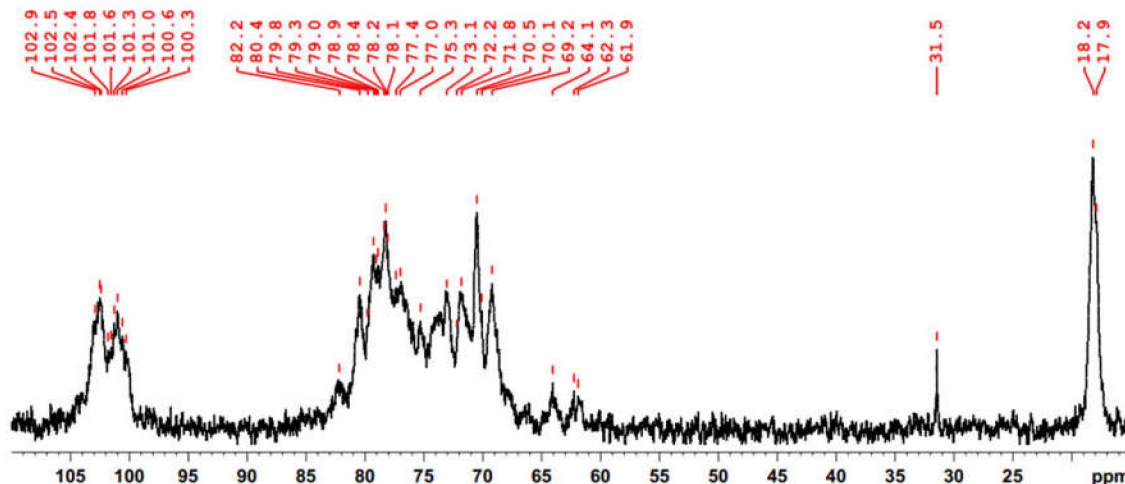
5.1.5 RMN de ¹³C e HSQC da fração nativa GBR1

As análises dos espectros de RMN de ¹³C e HSQC da fração polissacarídica GBR1 foram realizadas através de análise comparativa com assinalamentos descritos previamente por Mazepa (2017) para *G. brasiliensis* e, ainda, considerando os assinalamentos obtidos por Cassolato e colaboradores (2008) e por Ropellato e colaboradores (2015) para heteroramnanas de *G. oxysperma*.

O espectro de RMN de ¹³C da fração GBR1 (FIGURA 12), apresentou alto grau de complexidade. O grande número de sinais alargados está relacionado com os diferentes padrões de substituição. Os carbonos da região anomérica podem ser observados em 102,9-100,0 ppm com sinais alargados decorrentes da sobreposição

de sinais que ocorre nessa região. Os sinais em 18,2-17,9 ppm foram atribuídos ao carbono de grupo metila (CH₃) da α -L-Rhap, unidade cuja presença foi confirmada nas análises de composição monossacarídica (TABELA 4). Os sinais entre 82,2-69,2 ppm correspondem principalmente aos carbonos da região do anel das unidades de α -L-Rhap substituídas ou não por grupos O-sulfato.

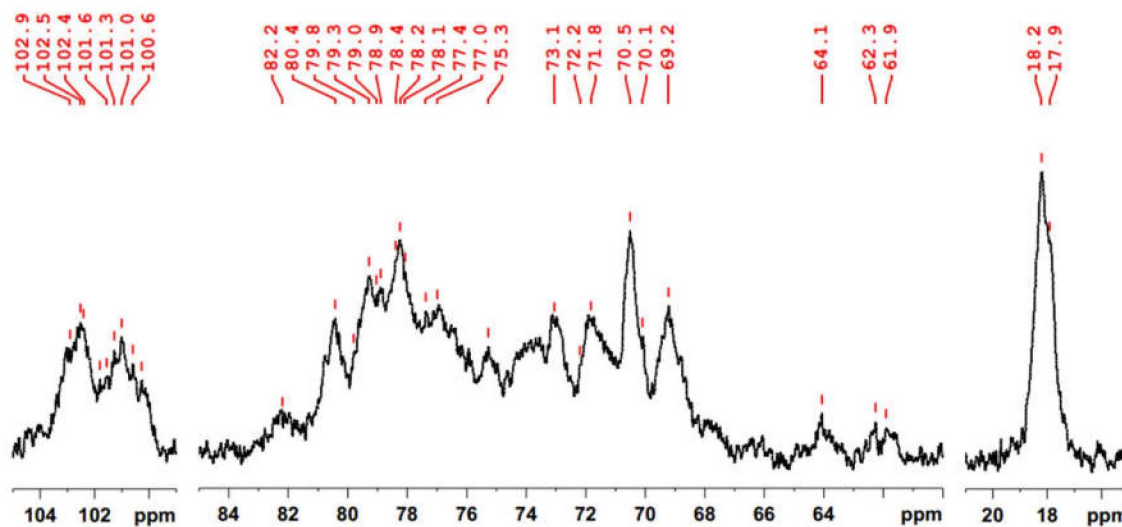
FIGURA 12 - ESPECTRO DE RMN DE ¹³C DA FRAÇÃO GBR1.



FONTE: O autor (2019).

NOTA: Solvente: D₂O. Temperatura: 70°C. N° de scans: 8192. Acetona como padrão interno: 31,45 ppm.

No espectro de RMN de ¹³C apresentado (FIGURA 13), os sinais de baixa intensidade em 61,9 e 62,3 ppm foram atribuídos à presença de C-6 livre de hexoses, e o sinal em 64,1 ppm, também de baixa intensidade, corresponde ao C-5 de unidades de Xylp 4-ligadas (FIGURA 12 e FIGURA 13). Estes assinalamentos estão de acordo com os previamente obtidos para as heteroramnanas sulfatadas da alga verde *G. oxysperma* (CASSOLATO et al., 2008; ROPELLATO et al., 2015) e de *G. brasiliensis* (MAZEPA, 2017).

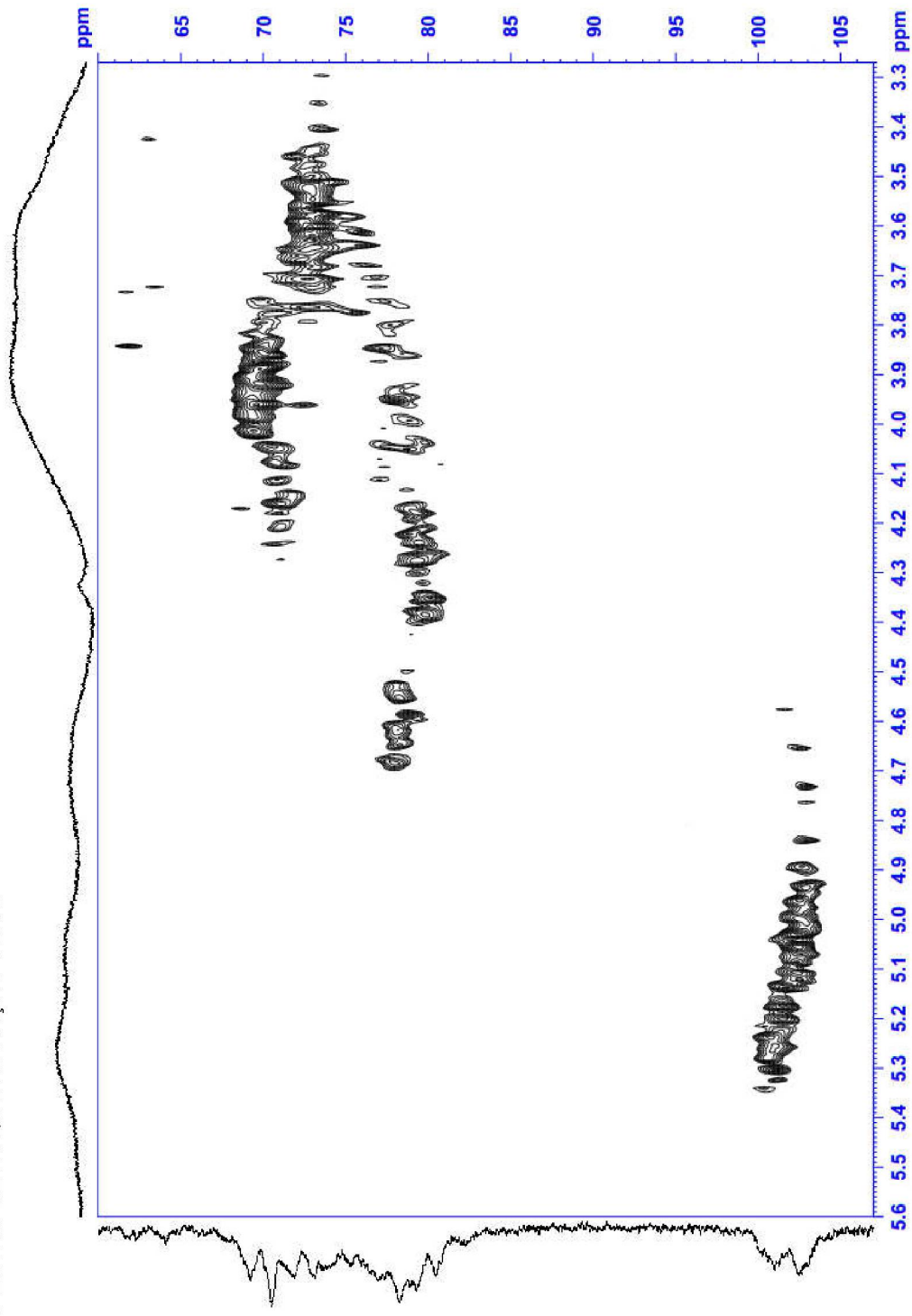
FIGURA 13 – ESPECTRO DE RMN de ^{13}C DA FRAÇÃO GBR1: AMPLIAÇÃO.

FONTES: O autor (2019).

NOTA: Solvente: D_2O . Temperatura: 70°C . N° de scans: 8192. Acetona como padrão interno: 31,45 ppm.

Assim como o espectro de RMN de ^{13}C , o espectro de HSQC da fração GBR1 (FIGURA 14) apresenta-se de complexa interpretação, com grande número de sinais relacionados com os diferentes padrões de substituição esperados para a molécula de heteroramnana. As correlações $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ obtidas foram analisadas levando em consideração os assinalamentos previamente reportados por Mazepa (2017), Ropellato et al (2015) e Cassolato et al (2008) para as heteroramnanas das clorófitas *G. brasiliensis* e *G. oxysperma*, respectivamente.

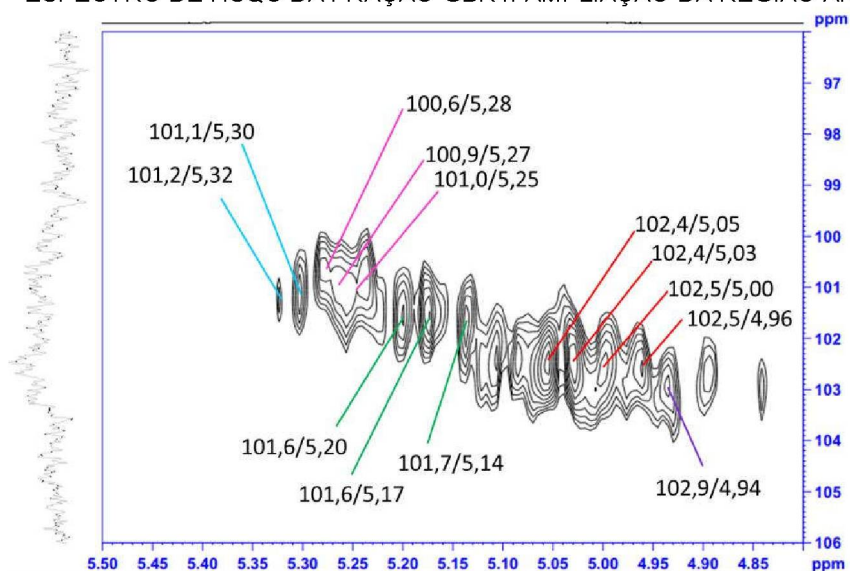
FIGURA 14 – ESPECTRO DE HSQC DA FRAÇÃO GBR1.



FONTE: O autor (2019).

NOTA: Solvente: D₂O. Temperatura: 70°C. N° de scans: 8. Acetona como padrão interno: 31,45/2,225 ppm.

FIGURA 15 – ESPECTRO DE HSQC DA FRAÇÃO GBR1: AMPLIAÇÃO DA REGIÃO ANOMÉRICA.



FONTES: O autor (2019).

NOTA: Solvente: D₂O. Temperatura: 70°C. N° de scans: 8. Acetona como padrão interno: 31,45/2,225 ppm.

A configuração α -anomérica das unidades de α -L-Rhap pôde ser determinada pelo sinal de H-5 em 3,86-4,04 ppm e de C-5 em 70,5 ppm. Os correspondentes sinais com a configuração β -anomérica (H-5 em 3,39 ppm e C-5 em 72,3–73,4 ppm) estão ausentes nos espectros de RMN da fração GBR1 (BACKINOWSKY et al., 1980; LIPKIND et al., 1988; JANSSON et al., 1989).

Na região anomérica do espectro de HSQC (FIGURA 15) a correlação em 102,9/4,94 ppm corresponde a unidades de α -L-Rhap 3-ligadas não sulfatadas. As correlações em 102,5-102,4/5,05-4,96 ppm foram atribuídas ao C-1 das unidades de α -L-Rhap 3-ligadas sulfatadas em C-4. As correlações em 101,7-101,6/5,20-5,14 ppm correspondem as unidades de α -L-Rhap 2-ligadas sulfatadas em C-4 e/ou sulfatadas em C-3 e C-4. As correlações em 101,0-100,6/5,28-5,25 ppm foram atribuídas as unidades de α -L-Rhap 2,3-ligadas não sulfatadas. As correlações em 101,2-101,0/5,32-5,30 ppm correspondem a unidades de α -L-Rhap 3-ligadas sulfatadas em C-2 e em ambos C-2 e C-4. Essas correlações (TABELA 6) estão de acordo com as relatadas na literatura (MAZEPA, 2017; ROPELLATO et al, 2015).

As unidades de α -L-Rhap 3-ligadas não substituídas também foram identificadas pelas correlações de C-2/H-2 em 71,8-71,1/4,16-4,14 ppm, de C-3/H-3 em 78,7/4,05 ppm, de C-4/H-4 em 72,2/3,67 ppm e de C-5/H-5 em 70,5/4,04 ppm (TABELA 6). As unidades de α -L-Rhap 3-ligadas 4-sulfatadas foram identificadas

pelos deslocamentos da correlação de C-4/H-4 em 82,2/4,23 ppm (efeito α da sulfatação de mais 10 ppm no deslocamento do C-4 em relação a unidades de α -L-Rhap 3-ligadas) e pela correlação de C-5/H-5 em 69,8-69,2/3,90-3,83 ppm (efeito β da sulfatação em C-5 de -0,7 ppm em relação a unidade de α -L-Rhap 3-ligadas).

As correlações para C-1/H-1 em 101,2-101,0/5,32-5,30 ppm correspondem às unidades de α -L-Rhap 3-ligadas sulfatadas em C-2 e em ambos C-2 e C-4. A correlação em C-2/H-2 em 78,0-78,3/4,68-4,65 ppm foram atribuídas às unidades de α -L-Rhap 3-ligadas 2-sulfatadas e 2,4-sulfatadas. O valor de C-2 em 78,0-78,3 ppm está de acordo com o efeito α , com mais 6,5-7,2 ppm quando comparado com o C-2 das unidades de α -L-Rhap 3-ligadas. As unidades de α -L-Rhap 3-ligadas dissulfatadas apresentam a de C-4/H-4 em 80,1-79,8/4,68-4,65 ppm (efeito α de mais 7,9 ppm em C-4) e seus deslocamentos de C-5/H-5 aparecem em 69,8-69,2/3,90-3,83 ppm (efeito β da sulfatação). Os assinalamentos referentes à correlação C-3/H-3 das unidades 3-ligadas sulfatadas em C-4 e em ambos C-2 e C-4 não puderam ser determinadas com os espectros obtidos.

Os sinais anoméricos em 101,6-101,7/5,20-5,14 ppm correspondem às unidades de α -L-Rhap 2-ligadas sulfatadas em C-4 e em ambos C-3 e C-4. Os sinais em 82,2 ppm e 78,9 ppm correspondem aos sinais de C-4 dessas unidades, respectivamente. As unidades de α -L-Rhap 2-ligadas 3,4-sulfatadas apresentaram as correlações de C-3/H-3 em 78,4/4,55 ppm. Sinais referentes a unidades de α -L-Rhap 2-ligadas não foram detectados nos espectros obtidos. Dados de literatura mostram que essas unidades apresentam as correlações de C-3/H-3 e C-4/H-4 em 71,8/3,94-3,97 ppm e 73,8/3,48-3,53 ppm, respectivamente (ROPELLATO et al., 2015). Dessa forma, os assinalamentos de C-3 e C-4 das unidades de α -L-Rhap 2-ligadas sulfatadas em C-4 e em ambos C-3 e C-4 estão de acordo com o efeito α da sulfatação.

As correlações das unidades de α -L-Rhap 2,3-ligadas estão descritas na TABELA 6. Essas unidades possuem os valores de deslocamento de C-1/H-1 em 100,6-101,0/5,28-5,25 ppm, as correlações de C-2/H-2 em 78,4/4,55 ppm, de C-3/H-3 em 79,0/4,59 ppm e de C-4/H-4 em 72,2/3,67 ppm.

Deste modo, a fração GBR1, isolada de *G. brasiliensis* foi caracterizada por métodos químicos e de RMN monodimensional e bidimensional. O padrão de substituição das unidades de α -L-Rhap estão de acordo com os previamente descritos

para esta mesma espécie por Mazepa (2017) em nosso grupo de pesquisa. A TABELA 6 resume os assinalamentos feitos para as unidades de α -L-Rhap da heteroramnana da macroalga *G. brasiliensis* obtidos no presente trabalho.

TABELA 6 – DESLOCAMENTOS QUÍMICOS ATRIBUÍDOS AS UNIDADES DE RAMNOSE CONTITUÍNTES DA FRAÇÃO NATIVA GBR1 DA HETERORAMNANA DE *G. brasiliensis*.

Unidades de ramnose	Deslocamento químico (ppm)												
	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6	
GBR1													
[→3)-α-L-Rhap-(1→]	102,9	71,1 71,8	78,7	72,2	70,5	18,2-17,9	4,94	4,16 4,14	4,05	3,67	4,04	1,42-1,25	
[→3)-α-L-Rhap-2S-(1→]	101,1 101,2	78,0 78,3	77,4	72,8-73,0	70,1 70,5	18,2-17,9	5,30 5,32	4,68 4,65	4,04	3,60-3,55	3,86 4,04	1,42-1,25	
[→3)-α-L-Rhap-4S-(1→]	102,5 102,4	71,1 71,8	-	80,1 79,8	69,8-69,2	18,2-17,9	5,00/4,96 5,06/5,03	4,16 4,14	-	4,35 4,38	3,92-3,83	1,42-1,25	
[→3)-α-L-Rhap-2,4S-(1→]	101,1 101,2	78,0 78,3	-	80,1 79,8	69,8-69,2	18,2-17,9	5,30 5,32	4,68 4,65	-	4,35 4,38	3,92-3,83	1,42-1,25	
[→2)-α-L-Rhap-4S-(1→]	101,6 101,7	79,3	70,7	82,2	69,8-69,2	18,2-17,9	5,17-5,20 5,14	4,18	4,07	4,23	3,92-3,83	1,42-1,25	
[→2)-α-L-Rhap-3,4S-(1→]	101,6 101,7	78,1	78,4	78,9	69,8-69,2	18,2-17,9	5,17-5,20 5,14	4,62	4,55	4,59	3,92-3,83	1,42-1,25	
[→2,3)-α-L-Rhap-(1→]	101,0 100,6 100,9	78,4	79,0	72,2	70,1 70,5	18,2-17,9	5,25 5,28 5,27	4,55	4,59	3,67	3,86 4,04	1,42-1,25	

5.2 Modificação química da fração GBR1

5.2.1 Aaminação da fração nativa GBR1 por reação de O-alquilação

Para O-alquilação da fração polissacarídica nativa GBR1 foi utilizado o procedimento descrito por Tarpanov (1999) com modificações. A reação de O-alquilação foi obtida pela reação do grupo hidroxila (OH) com o reagente 3-cloropropilamina. Foram realizados três experimentos distintos com para obtenção da heteroramnana aminada (TABELA 2). O primeiro experimento foi realizado em temperatura de 60°C por um período de reação de 6 horas (Entrada 01 - TABELA 2) originando a fração GBR-A1 que ficou insolúvel em água após a diálise.

Após a liofilização, tentativas de solubilizar GBR-A1 por meio de alteração de pH e utilização de outros solventes, como o DMSO, não foram eficazes. Ressalta-se que a solubilidade em água, tampões ou solventes como DMSO é fundamental quando se pretende avaliar diversas atividades biológicas de novas moléculas, como antimicrobiana, anticoagulante e antioxidante. Muitos experimentos assumem que há dissolução completa do composto a ser testado, pois estes precisam estar solúveis para passarem por processos farmacológicos *in vitro* ou *in vivo* como, por exemplo, permeação, metabolismo e ligação a alvos biológicos. Além disso, se um composto for apenas parcialmente dissolvido, seu potencial de aplicação pode ser inacurado (KERNES et al., 2008).

Partiu-se da suposição de que a insolubilidade de GBR-A1 ocorreu devido à presença amina em excesso, que poderia ter levado à um alto grau de substituição dos grupos hidroxila. Então, uma nova condição de reação foi testada, diminuindo-se a quantidade do reagente 3-cloropropilamina obtendo-se a fração GBR-A2 (Entrada 02 - TABELA 7). Porém, após a diálise, GBR-A2 também se apresentou insolúvel em meio aquoso. Diante disso, o tempo de reação foi reduzido de 6 horas para 2 horas e resultados semelhantes aos anteriores foram obtidos para a nova fração GBR-A3.

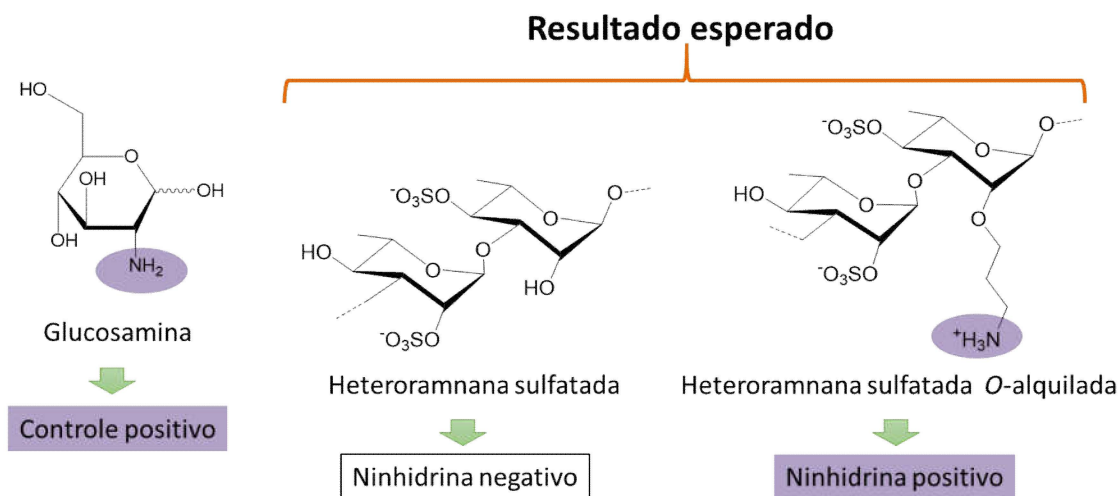
TABELA 7 – FUNCIONALIZAÇÃO DA FRAÇÃO NATIVA E OBTENÇÃO DE DERIVADOS AMINADOS.

Entrada	GBR1 (mg)	Amina (mg)	NaOH (mg)	Água (ml)	Tempo (h)	^a Rendimento (%)	Solubilidade	Teste da Ninhydrina
01	100	845	560	2	6	n.d.	Insolúvel	Positivo
02	100	425	560	2	6	94,7	Insolúvel	Positivo
03	50	213	280	1	2	90	Insolúvel	Positivo

^aRendimento expresso em relação a quantidade inicial de polissacarídeo utilizado;
n.d. = não determinado.

A mudança da solubilidade do material é um indício de modificação química do material inicial, porém a insolubilidade dificulta a caracterização do mesmo. Para avaliar a presença de grupos amina livres no material modificado, e obter informações preliminares sobre os produtos das reações, foi realizado o teste da ninhydrina. Trata-se de um método colorimétrico específico para identificação de grupos amina livres em um material, sendo que o desenvolvimento de coloração roxa evidencia a presença desses grupos numa molécula. A glucosamina foi utilizada como controle positivo no teste da ninhydrina. O resultado esperado para o teste com os produtos de reação insolúveis encontra-se na FIGURA 16.

FIGURA 16 – RESULTADO ESPERADO NO TESTE DE NINIDRINHA PARA AS FRAÇÕES POLISSACARÍDICAS.

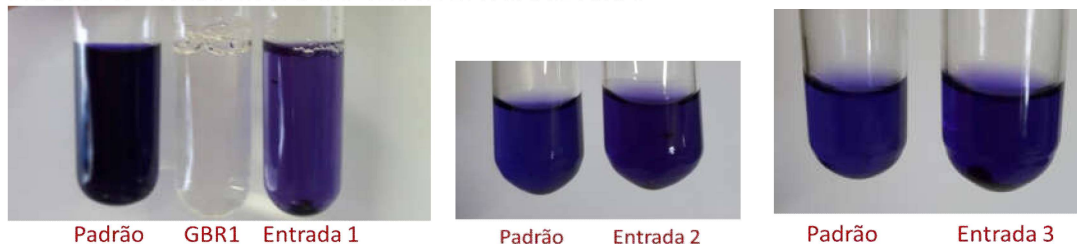


FONTE: O autor (2019).

As frações GBR-A1 a -A3 obtidas nas três entradas apresentadas na TABELA 7 foram submetidas ao teste da ninhydrina, bem como a fração nativa da heteroramnana sulfatada (GBR1). As três frações apresentaram resultado positivo, como esperado, e

a fração GBR1 apresentou resultado negativo para presença de grupos amina (FIGURA 17).

FIGURA 17 - RESULTADO DO TESTE DA NINHIDRINA.



FONTE: O autor (2019).

Dessa forma, sugere-se a presença de grupos aminas livres nas novas frações obtidas, porém não pode ser afirmada a ocorrência de ligação covalente entre a 3-cloropropilamina e o polissacarídeo GBR1. Ainda para obter informações a partir dos materiais insolúveis, foi realizado um teste de mistura física, onde a fração polissacarídica foi dissolvida em água e misturada com o reagente na mesma proporção da Entrada 3 e mantida sob agitação, sem temperatura e hidróxido de sódio, por 2 horas. Após esse período, a mistura foi dialisada contra água destilada, como nas reações anteriores. A água da diálise foi concentrada em evaporador rotatório. A fração dialisada e a água da diálise concentrada (para observar a presença ou não da 3-cloropropilamina não ligada) foram submetidas ao teste da ninhidrina. O resultado está representado na FIGURA 18.

FIGURA 18 – RESULTADO DO TESTE DE NINHIDRINA PARA MISTURA FÍSICA.



FONTE: O autor (2019).

Esse resultado demonstra que a 3-cloropropilamina, possivelmente, não foi adsorvida ou interagiu iônica com a fração polissacarídica, sendo que atravessou livremente a membrana de diálise (representado pela coloração roxa da água de diálise). Com isso, sugere-se que está ocorrendo a ligação covalente entre a 3-cloropropilamina e a fração polissacarídica nativa GBR1.

5.2.1.1 Caracterização dos derivados aminados da fração GBR1

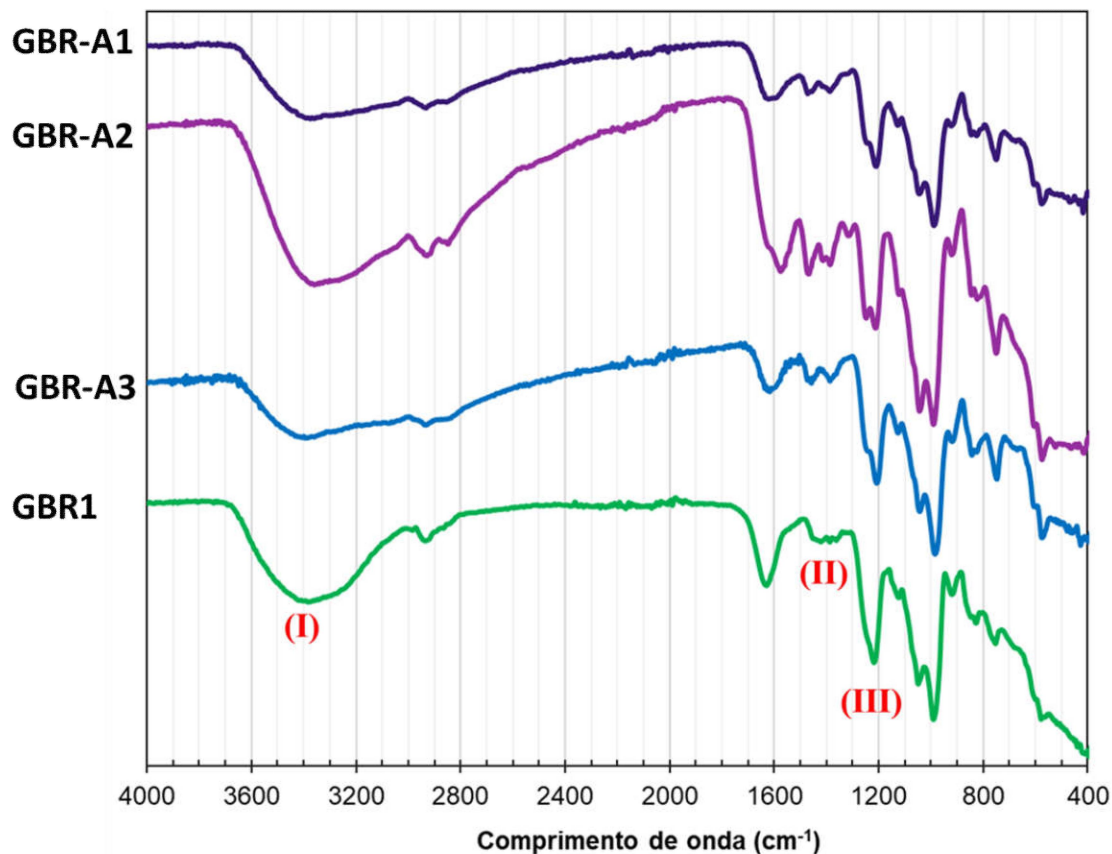
5.2.1.1.1 Espectroscopia na região do Infravermelho (IV) das frações GBR-A1, GBR-A2 e GBR-A3

Os produtos obtidos pela aminação direta da fração GBR1 foram analisados por espectroscopia de infravermelho. Os espectros obtidos foram analisados comparativamente com o espectro da fração nativa GBR1 (FIGURA 19). Na região espectral entre 3600 e 2800 cm^{-1} estão presentes duas bandas de absorção alargadas tipicamente exibidas por polissacarídeos: banda de estiramento da ligação O-H, entre 3700 e 3000 cm^{-1} , e banda de estiramento da ligação C-H, entre 3000 e 2800 cm^{-1} . A principal diferença entre os espectros de GBR-A1, GBR-A2 e GBR-A3, em comparação com o espectro da fração nativa GBR1, foi observada na banda em 3383 cm^{-1} (região I - FIGURA 19) referente ao estiramento da ligação O-H das hidroxilas, alvo da reação de O-alkilação para aminação da fração nativa. A banda característica de estiramento de aminas primárias ocorre entre 3500–3300 cm^{-1} , mesma região de estiramento da ligação O-H. Assim, pode-se inferir que a alteração nessa banda ocorre devido à sobreposição da banda característica de aminas primárias (-NH₂) com a banda referente às hidroxilas (O-H). Resultado semelhante foi descrito por Mohy Eldin et al. (2012) para derivados aminados produzidos a partir da quitosana.

Outra diferença que pôde ser observada para o espectro de IV das frações modificadas foi o aparecimento de uma nova banda em aproximadamente 1450 cm^{-1} , correspondente ao estiramento da ligação N-H como resultado da substituição por O-alkilação (região II da FIGURA 19). Resultado semelhante foi obtido por Bao e colaboradores (2001) para os espectros de IV de β -glucana modificada por aminação com o reagente 3-cloropropilamina.

Além disso, ainda pôde-se observar que não houve alteração na banda referente ao estiramento da ligação C-O-S próximo de 1200 cm^{-1} (região III - FIGURA 19), devido à presença de grupos sulfatos na molécula, sugerindo que a heteroramnana permanece sulfatada após a reação de aminação (PENGZHAN et al., 2003; RAY e LAHAYE, 1995; TAKO et al., 2015).

FIGURA 19 – ESPECTRO DE FT-IR DAS FRAÇÕES GBR1, GBR-A1, GBR-A2 E GBR-A3.



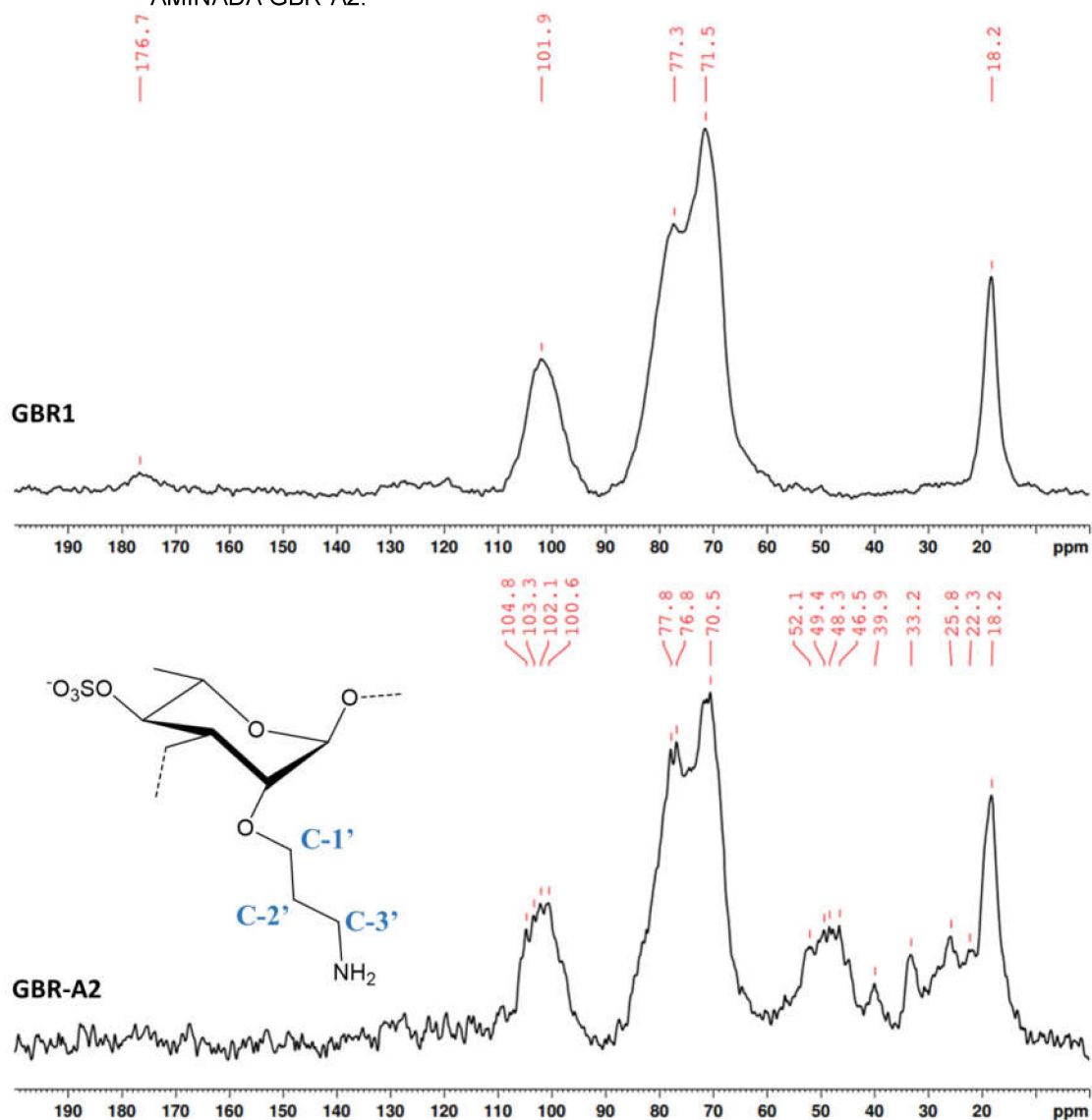
FONTE: O autor (2019).

5.2.1.1.2 Espectroscopia de RMN no estado sólido das frações nativa e aminada

Os espectros de RMN de ¹³C no estado sólido da fração nativa e da fração aminada foram realizados a temperatura ambiente, observando o núcleo de ¹³C. Essa análise foi realizada com a fração GBR-A2, obtida pela condição da entrada 02 da TABELA 7, escolhida pela maior disponibilidade de material para preenchimento completo do rotor. Os espectros em estado sólido foram calibrados utilizando o assinalamento do grupo metila (-CH₃) do espectro de RMN de ¹³C em estado líquido da fração nativa GBR1, que aparece em 18,2 ppm (FIGURA 13), para que pudesse ser feita a comparação de sinais entre a fração nativa e a modificada. Os espectros calibrados estão apresentados na FIGURA 20. O RMN no estado sólido da fração nativa apresentou poucos picos quando comparado com o em estado líquido (FIGURA 13). No entanto, há semelhança quanto a localização dos sinais. O sinal em 101,9 ppm é referente ao carbono anomérico, os sinais entre 77,3–71,5 ppm são

referentes aos carbonos do anel e o sinal em 18,2 ppm refere-se ao grupo metila da α -L-Rhap. Nesse espectro, ainda pôde ser observado um sinal de baixa intensidade em 176,7 ppm referente ao carbono carboxílico dos ácidos urônicos constituintes da fração GBR1.

FIGURA 20 - RMN NO ESTADO SÓLIDO DA FRAÇÃO NATIVA GBR1 E DA FRAÇÃO NATIVA AMINADA GBR-A2.



FONTE: O autor (2019).

O espectro de RMN de ^{13}C no estado sólido da fração nativa modificada por aminação, utilizando 3-cloropropilamina (GBR-A2), apresentou novos sinais em relação ao espectro da fração GBR1. Houve alteração dos sinais referentes aos carbonos do anel. Observa-se um deslocamento do sinal em 71,5 ppm (GBR1) para

70,5 ppm (GBR-A2), surgimento dos sinais em 77,8 e 76,8 ppm e desaparecimento do sinal em 77,3 ppm na fração GBR1. Houve alteração nos sinais na região anomérica, com novos sinais entre 104,8-100,6 ppm, não sendo mais observado o sinal em 101,9 ppm. O novo sinal em 100,6 ppm na região anomérica pode ser justificado pelo efeito resultante da substituição no C-2 que causa um efeito β de -1,3 ppm no deslocamento das unidades monossacarídicas que podem ter sido substituídas.

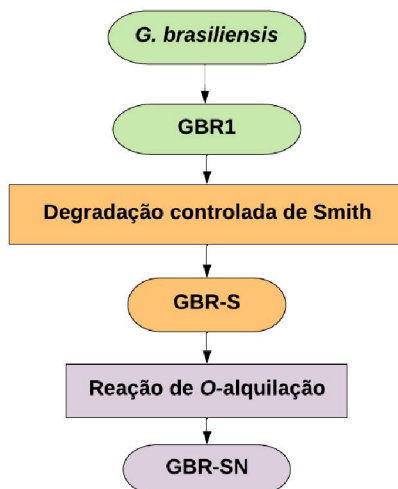
Os sinais que aparecem em 52,1–22,3 ppm podem ser atribuídos aos carbonos que compõe a cadeia alquílica da amina inserida na fração polissacarídica por reação de O-alkilação. Essas alterações sugerem que houve substituição do hidrogênio da hidroxila pelo radical aminopropil (-CH₂CH₂CH₂NH₂) como havia sido proposto no item 4.5.1, exemplificado na FIGURA 20 pela unidade de α -L-Rhap 3-ligada sulfatada em C-4 e substituída no C-2 pelo radical propilamina. O sinal em 39,9 ppm foi atribuído ao carbono do CH₂ ligado ao grupo amina (C-3' - FIGURA 20) e os sinais entre 46,5-52,1 ppm foram atribuídos ao carbono do CH₂ ligado ao oxigênio do polissacarídeo (C-1' - FIGURA 20) por O-alkilação.

Essas alterações no espectro da fração GBR1 aminada são similares ao que foi reportado por Bao e colaboradores (2011) para uma β -glucana aminada. Foram descritas alterações na região anomérica, surgimento de um novo sinal com menor valor em comparação com o produto original atribuído ao C-2 em algumas das unidades monossacarídicas, e o surgimento de novos sinais em 20–55 ppm, que foram atribuídos a presença do grupo propilamina ligado às unidades glicosídicas constituintes da β -glucana.

5.2.2 Alteração no desenho experimental para obtenção de derivados aminados

Diante da insolubilidade das frações aminadas obtidas, uma nova estratégia foi adotada para a modificação da heteroramnana nativa, incluindo uma etapa anterior à reação de O-alkilação, como tentativa de obterem-se derivados aminados solúveis. Assim, foi proposto a realização da degradação controlada de Smith antes da reação aminação (FIGURA 21).

FIGURA 21 – ALTERAÇÃO PROPOSTA PARA O DESENHO EXPERIMENTAL.



FONTE: O autor (2019).

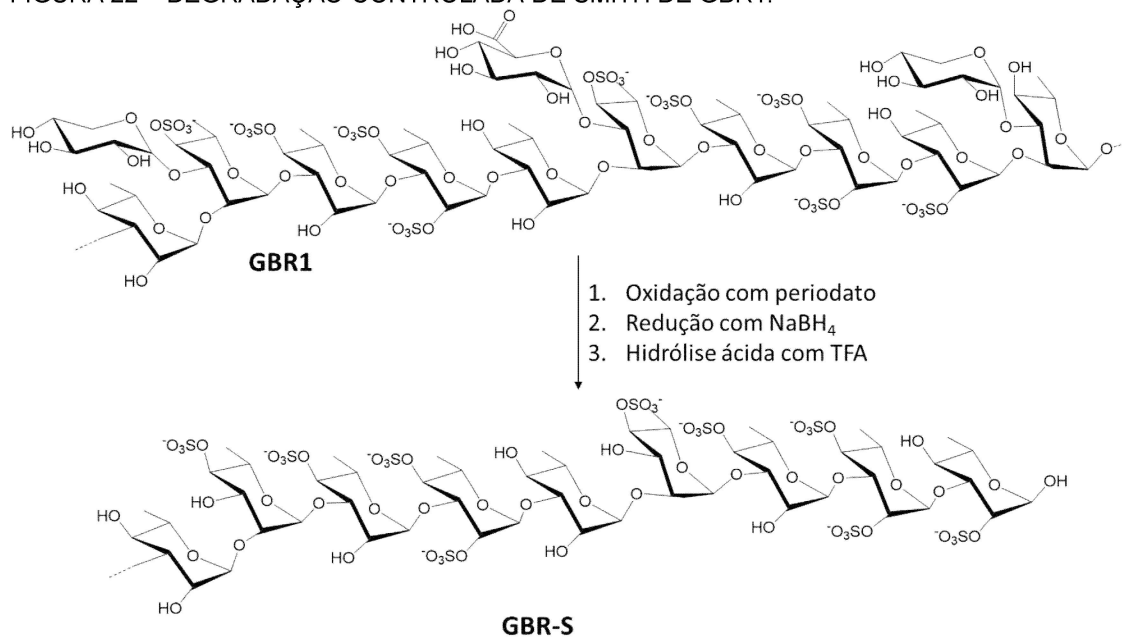
A degradação controlada de Smith envolve a redução do polissacarídeo oxidado pelo íon periodato com borohidreto, seguida por hidrólise ácida parcial. É importante ressaltar que apenas moléculas que possuem hidroxilas vicinais são susceptíveis a oxidação pelo íon periodato, com a clivagem específica de ligações C-C (BOBBITT, 1956; GOLDSTEIN et al., 1965; LINDBERG et al., 1975).

De acordo com estudos prévios (CASSOLATO et al., 2008 e ROPELLATO et al., 2015), durante o processo de degradação controlada de Smith de heteroramnanas da macroalga *Gayralia oxysperma*, as unidades correspondentes aos terminais não redutores de galactose, xilose e ácido glucurônico 2-sulfatados são oxidados, sendo que a maioria das unidades de ramnose não são susceptíveis a oxidação. O mesmo é esperado para a heteroramnana de *G. brasiliensis* utilizada no presente trabalho. Desse, modo esperava-se que a reação de aminação ocorresse preferencialmente nas unidades de α -L-Rhap 3-ligadas e 2-ligadas monossulfatadas e que com isso a heteroramnana degradada aminada permanecesse solúvel.

5.2.3 Degradação controlada de Smith de GBR-S

A fração GBR1 foi submetida ao processo de degradação controlada de Smith com o objetivo de obter-se uma nova fração que ao ser aminada permanecesse solúvel. A obtenção de fragmentos de menor massa molar, juntamente com a remoção de unidades susceptíveis à oxidação com periodato podem ser fatores positivos na produção de um derivado da heteroramnana solúvel em água. O polissacarídeo, inicialmente, foi submetido à oxidação com metaperiodato de sódio ($m\text{-NaIO}_4$) e redução com borohidreto de sódio (NaBH_4), apresentando rendimento de aproximadamente 50%. O material resultante foi submetido à hidrólise parcial com TFA $1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ a temperatura ambiente para a hidrólise das unidades oxidadas (FIGURA 22). O produto da degradação controlada de Smith apresentou um rendimento de aproximadamente 40%. O produto da degradação controlada de Smith foi denominado com o acréscimo da letra “S” ao final de seu nome original (GBR-S).

FIGURA 22 – DEGRADAÇÃO CONTROLADA DE SMITH DE GBR1.



Fonte: O autor (2019).

5.2.3.1 Composição monossacarídica da fração GBR-S e análises químicas

Para a determinação da composição monossacarídica, a fração GBR-S foi submetida ao processo de hidrólise ácida total, redução e acetilação. Os acetatos de alditóis obtidos foram analisados por cromatografia líquido-gasosa (GLC).

A fração GBR-S tem como monossacarídeo neutro majoritário a ramnose (~91 mol%), seguido por menores percentagens de glucose (4,1 mol%) e xilose (2,6 mol%). Baixas quantidades de arabinose, manose e galactose também foram detectadas (TABELA 8).

TABELA 8 – COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DA FRAÇÃO GBR1 OBTIDA DE *G. brasiliensis*.

Frações	Composição monossacarídica (mol %)						Sulfato ^b (%)
	Rha ^a	Xyl	Glc	Gal	Ara	Man	
GBR1	54,5	20,4	16,1	2,7	4,9	1,3	25,1
GBR-S	90,9	2,6	4,1	0,2	1,7	0,4	38,4

^a Rha = ramnose, Xyl = xilose, Gal = galactose, Glc = glucose, Ara = arabinose, Man, = manose (carboidratos neutros determinados por GLC na forma de acetatos de alditol); ^b Porcentagem obtida usando dosagem pelo método de Dodgson e Price (1962).

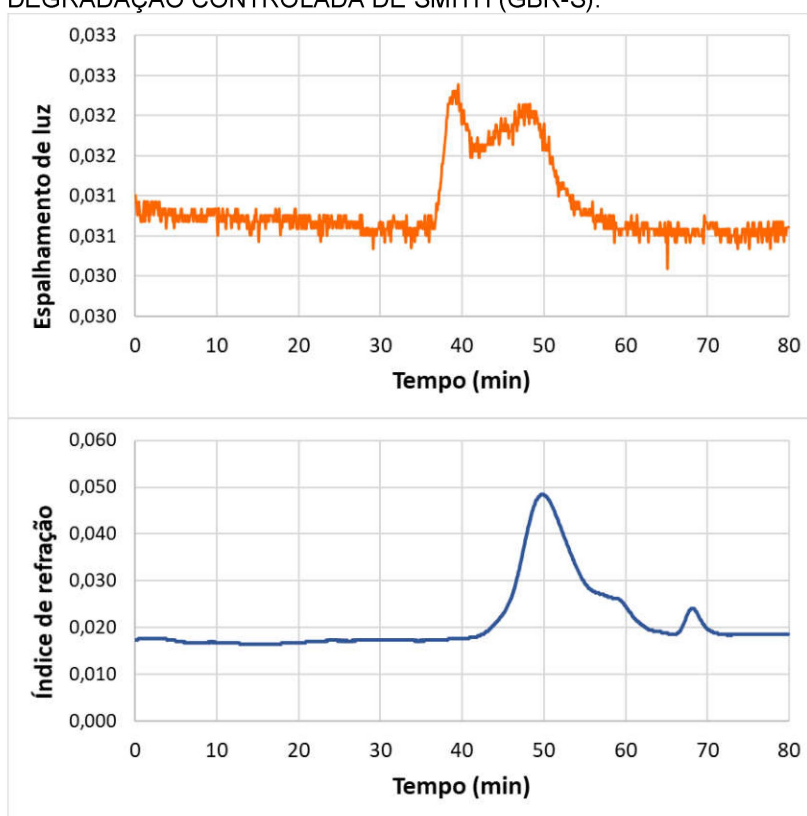
Após a degradação controlada de Smith, a fração GBR-S, em relação a fração polissacarídica GBR1, apresentou um aumento significativo no teor de ramnose (54,4 → 90,9 mol%), diminuição nos teores de xilose (20,4 → 2,6 mol%), glucose (16,1 → 4,1 mol%), galactose (2,7 → 0,2 mol%), arabinose (4,9 → 1,7 mol%) e manose (1,3 → 0,4 mol%). Ainda, em relação a fração de origem, a fração GBR-S teve um aumento significativo no teor de grupos O-sulfato (25,1 → 38,4 %).

Resultados semelhantes foram descritos por Cassolato e colaboradores (2008) para o produto de degradação controlada de Smith (Go3r-S) obtido a partir da fração homogênea da heteroramnana nativa (Go3r) da espécie *G. oxysperma*: oxidação significativa das unidades de xilose, glucose, oxidação total das unidades de galactose e enriquecimentos nos teores de ramnose (77,0 → 94,0 mol%). Em comparação aos resultados obtidos para a fração nativa (OX-6) dessa espécie, submetida à degradação controlada de Smith (OX-6S) por Ropelatto e colaboradores (2011), também observa-se aumento no teor de grupos O-sulfatos (25,7 → 34,3%), diminuição nos teores de ácidos urônicos (17,4 → 7,3%) e aumento nos teores de ramnose (de 75,0 para 88,8 mol%), devido à diminuição relativa dos outros monossacarídeos presentes na fração.

5.2.3.2 Análise de homogeneidade da fração GBR-S

A fração GBR-S foi submetida à análise de homogeneidade por cromatografia de exclusão estérica de alta resolução acoplada a detectores de espalhamento de luz e de índice de refração (HPSEC-MALLS-IR). A análise do cromatograma obtido pelo detector de espalhamento de luz apresentou um perfil assimétrico indicando heterogeneidade da amostra (FIGURA 23). A comparação entre os perfis de eluição das frações GBR1 e GBR-S está apresentado na FIGURA 24. Como pode ser observado, o tempo de eluição da fração GBR-S foi maior que o da fração polissacarídica de origem (GBR1), indicando que o processo de degradação controlada de Smith originou um produto de menor massa molar. Essa diminuição é decorrente da remoção das unidades susceptíveis a oxidação com *m*-NaIO₄.

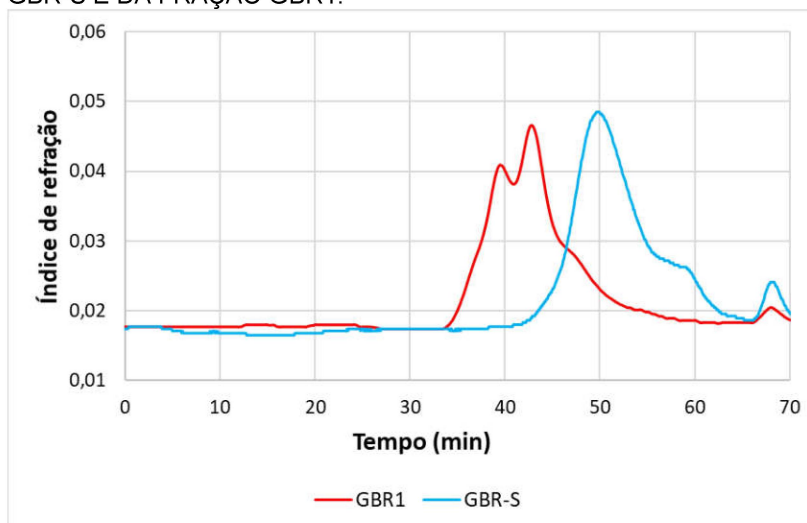
FIGURA 23 – CROMATOGRAMA OBTIDO POR HPSEC-MALLS-IR DA FRAÇÃO SUBMETIDA À DEGRADAÇÃO CONTROLADA DE SMITH (GBR-S).



FONTE: O autor (2019).

Nota: Picos após 65 minutos são correspondentes a presença de sais.

FIGURA 24 - COMPARAÇÃO DO CROMATOGRAMA OBTIDO POR HPSEC-MALLS-IR DA FRAÇÃO GBR-S E DA FRAÇÃO GBR1.



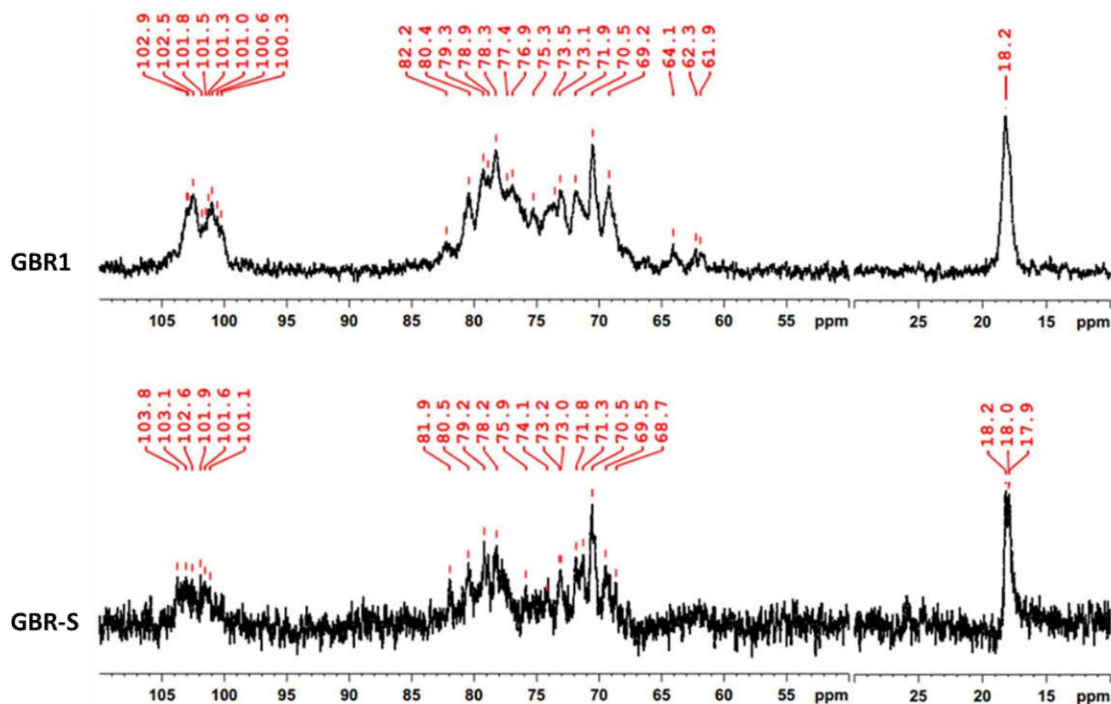
FONTE: O autor (2019).

Nota: Picos após 65 minutos são correspondentes a presença de sais.

5.2.3.3 Análise de RMN de ^{13}C e de ^1H da fração GBR-S

O espectro de RMN de ^{13}C da fração GBR-S está representado na FIGURA 25 juntamente com a da fração GBR1 para fins de comparação. Embora o espectro da GBR-S apresente uma baixa resolução sinal/ruído é possível definir na região anomérica sinais em 103-101,1 ppm atribuídos às unidades de α -L-Rhap e em 103,8 ppm correspondente a unidades monossacarídicas em configuração β -anomérica. Os sinais de alta intensidade em 17,9–18,2 ppm correspondem ao C-6 das unidades de α -L-Rhap, o que está de acordo com a composição monossacarídica, onde este desoxiaçúcar é o principal monossacarídeo observado (TABELA 8).

FIGURA 25 - ESPECTROS DE RMN DE ^{13}C DA FRAÇÃO NATIVA GBR1 E DA FRAÇÃO DEGRADADA DE SMITH GBR-S.

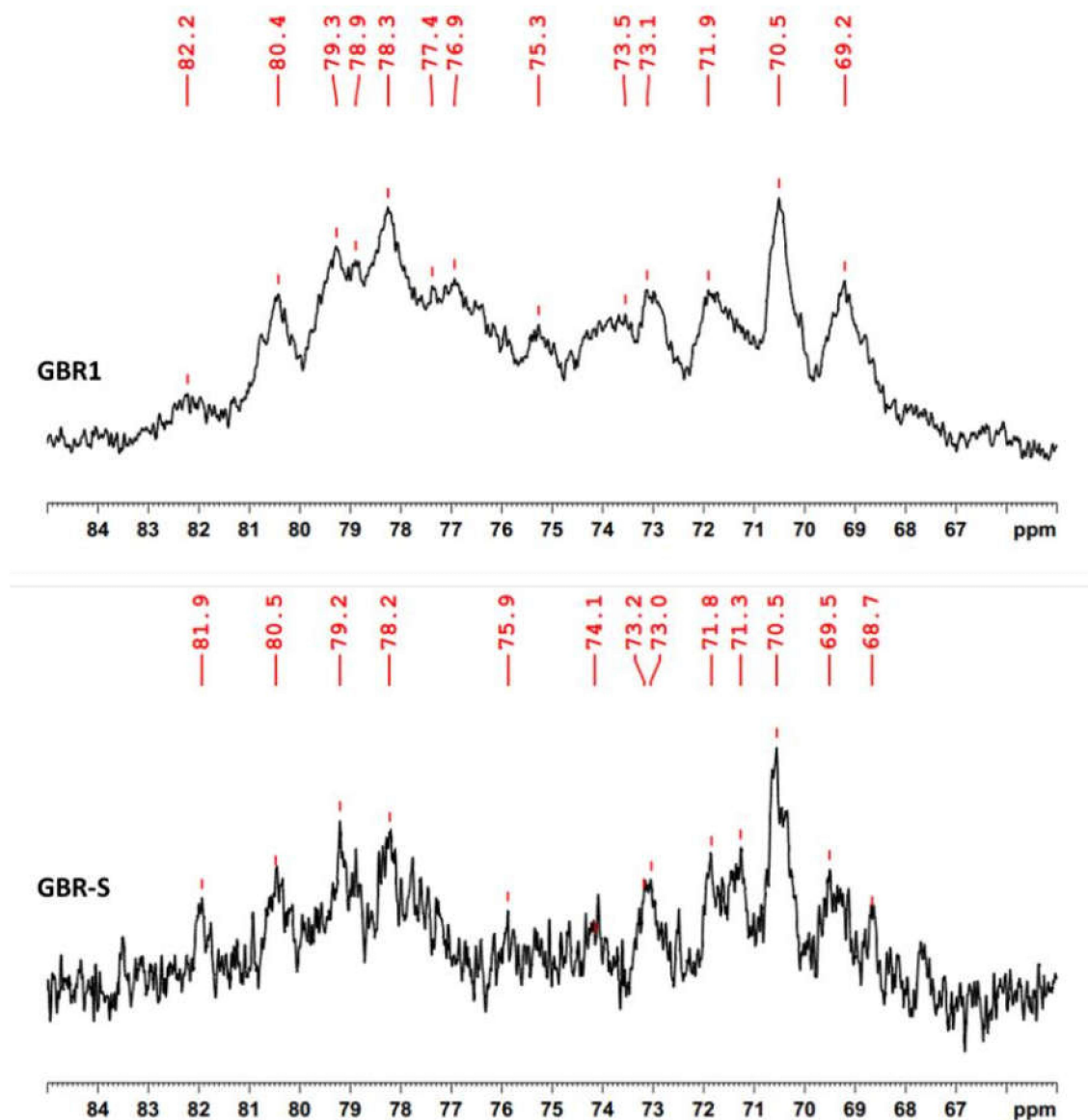


FONTES: O autor (2019).

NOTA: Solvente: D_2O . Temperatura: 70°C . N° de scans: 8192 (GBR1) e 4096 (GBR-S). Acetona como padrão interno: 31,45 ppm.

Na região do anel (FIGURA 26), o sinal em 81,9 ppm observado para o produto de degradação de Smith apresenta maior intensidade quando comparado ao respectivo sinal na fração GBR1. Este sinal corresponde ao C-4 de unidades de $\alpha\text{-L-Rhap}$ 2-ligadas 4-sulfatadas demonstrando que o produto GBR-S foi enriquecido neste tipo de unidade quando comparado com a fração GBR1. Adicionalmente, o sinal em 80,5 ppm presente no espectro de GBR-S demonstra que esta fração, assim como a GBR1, é constituída por unidades de $\alpha\text{-L-Rhap}$ sulfatadas em C-4 e/ou dissulfatadas.

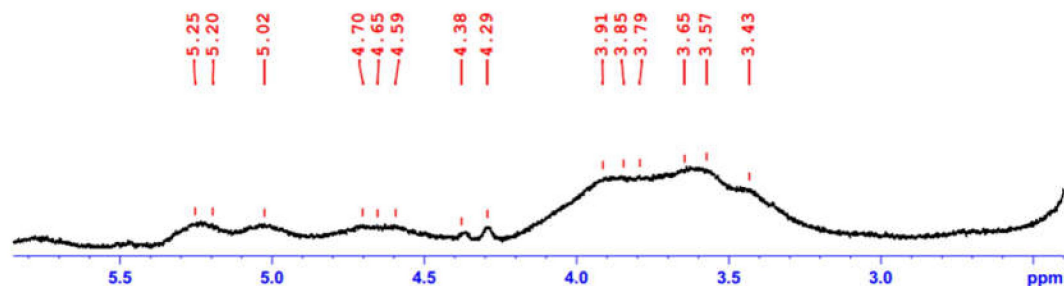
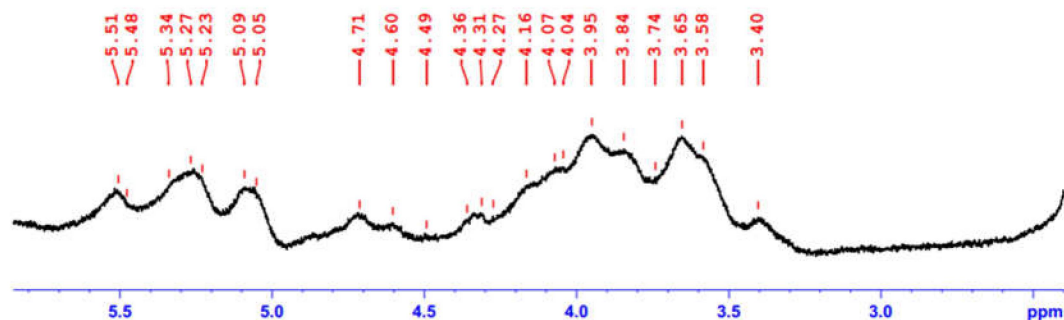
FIGURA 26 – ESPECTROS DE RMN DE ^{13}C DA REGIÃO DO ANEL DAS FRAÇÕES GBR1 E GBR-S.



FONTE: O autor (2019).

NOTA: Solvente: D_2O . Temperatura: 70°C . N° de scans: 8192 (GBR1) e 4096 (GBR-S). Acetona como padrão interno: 31,45 ppm.

A análise do espectro RMN de ^1H da fração GBR-S demonstrou sinais na região anomérica de 5,06–5,50 ppm, atribuídos ao C-1 de unidades de α -L-ramnose (FIGURA 27). O sinal de alta intensidade em 1,38 ppm foi atribuído aos hidrogênios do C-6 das unidades de ramnose (não apresentado). Além disso, o espectro de RMN de ^1H da fração GBR-S apresenta maior número e intensidade de sinais na região de 4,70–3,40 ppm quando comparado com o da fração GBR1.

FIGURA 27 – ESPECTRO DE RMN DE ^1H DAS FRAÇÕES (A) GBR1 E (B) GBR-S.**(A) GBR1****(B) GBR-S**

FONTES: O autor (2019).

NOTA: Solvente: D_2O . Temperatura: 70°C . Acetona como padrão interno: 2,225 ppm.

A análise do espectro de HSQC de GBR-S permitiu a confirmação da presença das unidades de $\alpha\text{-L-Rhap}$ 2-ligadas e 3-ligadas sulfatadas em C-4 e de outras unidades monossacarídicas como será discutido a seguir.

5.2.3.1 Análise de HSQC de $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ da fração GBR-S

O espectro de HSQC da fração GBR-S está representado na FIGURA 28. As correlações $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ foram analisadas levando em consideração os assinalamentos de literatura para heteroramnanas sulfatadas (MAZEPA, 2017, ROPELLATO et al., 2015 e CASSOLATO et al., 2008).

Na região anomérica do espectro de HSQC da fração GBR-S (FIGURA 29), a correlação em 103,1/5,04 ppm foi atribuída a unidades de $\alpha\text{-L-Rhap}$ 3-ligadas não sulfatadas (C-2/H-2 e C-3/H-3 em 71,4/4,17 e 79,0/3,95 ppm, respectivamente). A presença de unidades $\alpha\text{-L-Rhap}$ 3-ligadas sulfatadas em C-4 foi confirmada pela presença dos sinais anoméricos em 102,9-102,5/5,07-5,10 ppm (C-2/H-2 e C-4/H-4 em 71,4/4,17 e 80,0-80,5/4,36 ppm, respectivamente). Adicionalmente, unidades de $\alpha\text{-L-Rhap}$ 3-ligadas na fração GBR-S com sinais anoméricos em 100,0-100,3/5,48-

5,34 são dissulfatadas (C-2/H2 e C-4/H-4 em 78,4/4,64 e 80,0-80,5/4,36 ppm, respectivamente) ou monossulfatadas em C-2 (C-2/H2 e C-4/H-4 em 73,0/3,56 e 80,0-80,5/4,36 ppm, respectivamente). As correlações anoméricas em 101,3/5,21-5,23 foram atribuídas as unidades de α -L-Rhap 2-ligadas sulfatadas em C-4 e dissulfatadas em C-3 e C-4. A presença das correlações no espectro de HSQC de GBR-S em 81,7/4,27 ppm confirmaram a presença de unidades de α -L-Rhap 2-ligadas sulfatadas em C-4 (C-3/H-3 em 70,4/4,06 ppm). GBR-S apresenta ainda unidades de α -L-Rhap 2-ligadas substituídas por grupos O-sulfato em ambos C-3 e C-4 (C-4/H-4 em 79,7/4,60 ppm) com correlações anoméricas em 101,3/5,21-5,23 ppm.

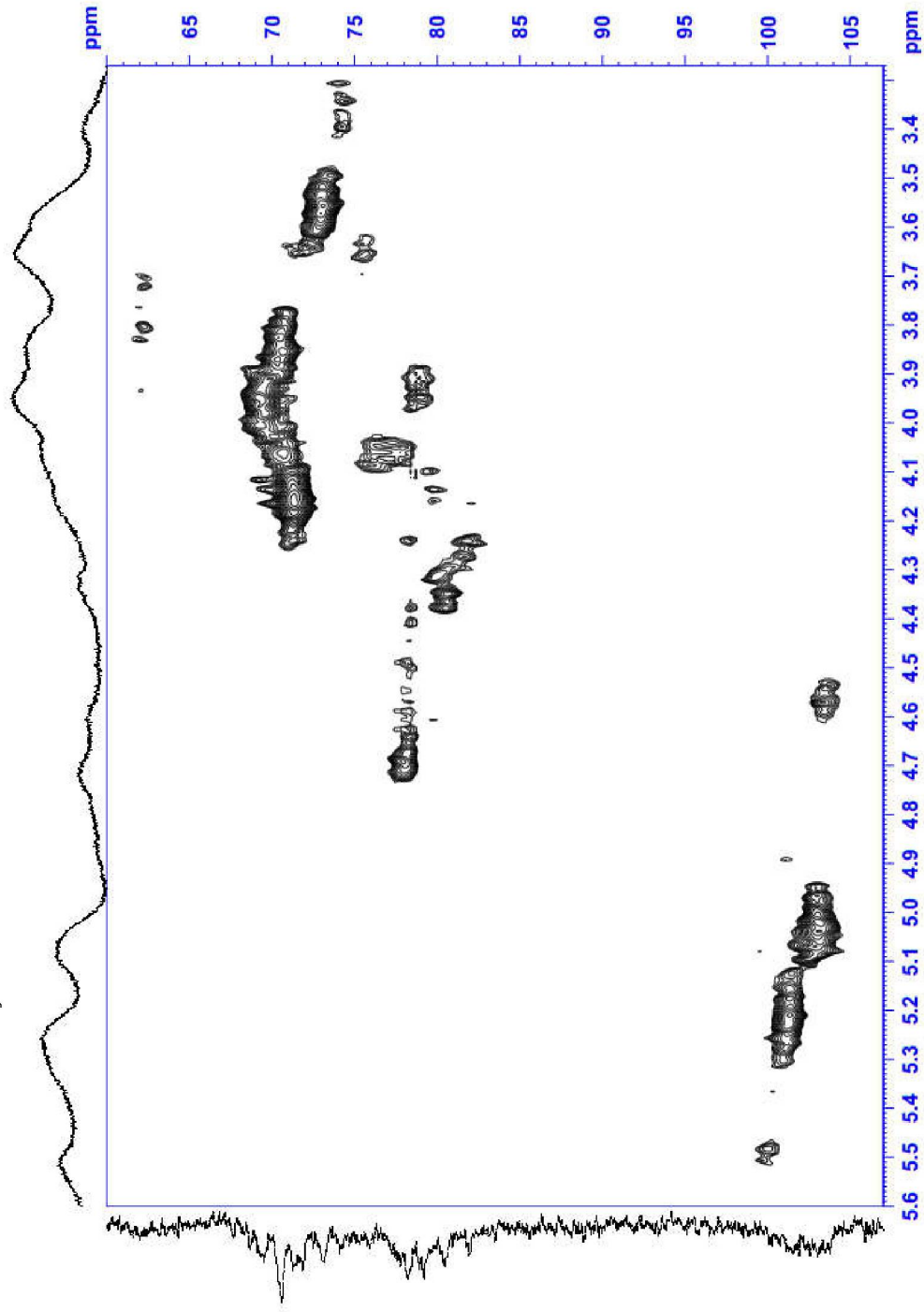
A correlação anomérica em 100,9/5,28 ppm foi atribuída as unidades de α -L-Rhap 2,3-ligadas não sulfatadas. Essas correlações estão de acordo com as relatadas na literatura (MAZEPA, 2017; ROPELLATO et al, 2015).

No espectro de HSQC de GBR-S ainda é possível observar sinais anoméricos em configuração β em 103,7/4,54 ppm atribuídos à presença de $[\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-D-GlcpA-(1}\rightarrow]$ e em 103,3/4,57 atribuídos à terminais não redutores de GlcpA-2,4-sulfato (DANTAS et al., 1994; HAHNE et al., 1991). A presença desses sinais indica que houve uma resistência dessas unidades à clivagem oxidativa pela ação do periodato. Resultado semelhante foi observado por De Carvalho e colaboradores (2017) para a oxidação com periodato de ulvanas, em que as unidades de β -D-ácido glucurônico se mostraram, pelo menos em parte, resistentes à clivagem oxidativa, mesmo que estas unidades apresentem hidroxilas vicinais, que são requisitos para que esta reação ocorra. Ainda em um trabalho de Fransson (1974) em que foi realizado a oxidação com periodato do dermatan sulfato aproximadamente 30% dos ácidos urônicos presentes foram resistentes à clivagem oxidativa. Essa resistência foi explicada pela possibilidade de formação de ligações de hidrogênio entre os grupos carboxila em C-6 e os grupos hidroxil em C-2 ou C-3, o que levaria a uma resistência a oxidação com periodato.

Resultados prévios mostram que a degradação de Smith realizada com a heteroramnana da *G. oxysperma* conduz a produtos com teor, posicionamento de grupos O-sulfatos e massa molecular diferenciados entre si, bem como em relação ao polímero nativo (CASSOLATO et al., 2008 e ROPELLATO et al., 2015). No presente trabalho, análises químicas e espectroscópicas do produto de degradação controlada de Smith da fração GBR1 da heteroramnana sulfatada de *G. brasiliensis* permitiu determinar que o “pool” de produtos de degradação controlada de Smith apresentam

diminuição de unidades monossacarídicas susceptíveis a oxidação com periodato, como xilose, glucose, etc.; aumento no teor de sulfato; enriquecimento das unidades de α -L-Rhap 3-ligadas 4-sulfatadas. Ressalta-se que a fração GBR-S é solúvel em água, o que permite avaliar sua atividade biológica.

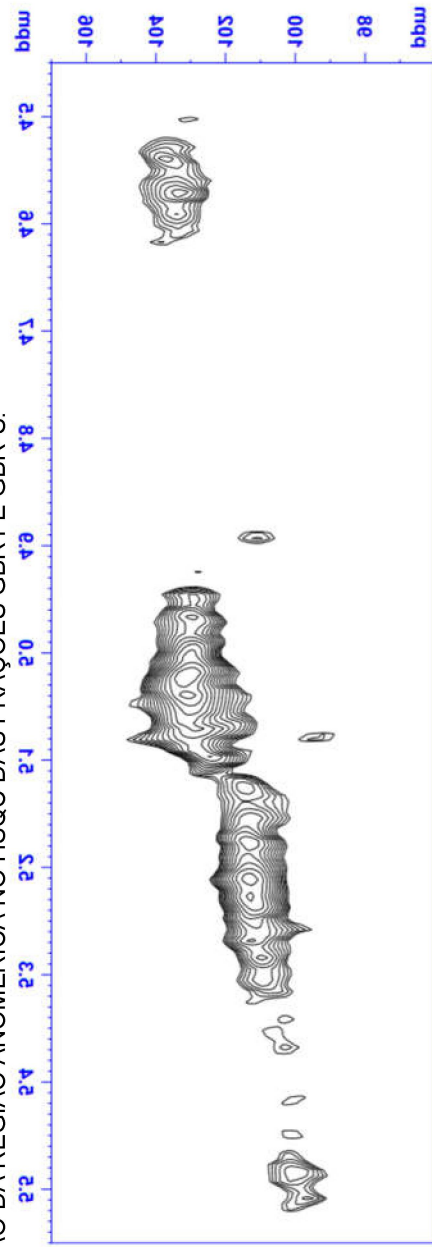
FIGURA 28 – ESPECTRO DE HSQC DA FRAÇÃO GBR-S.



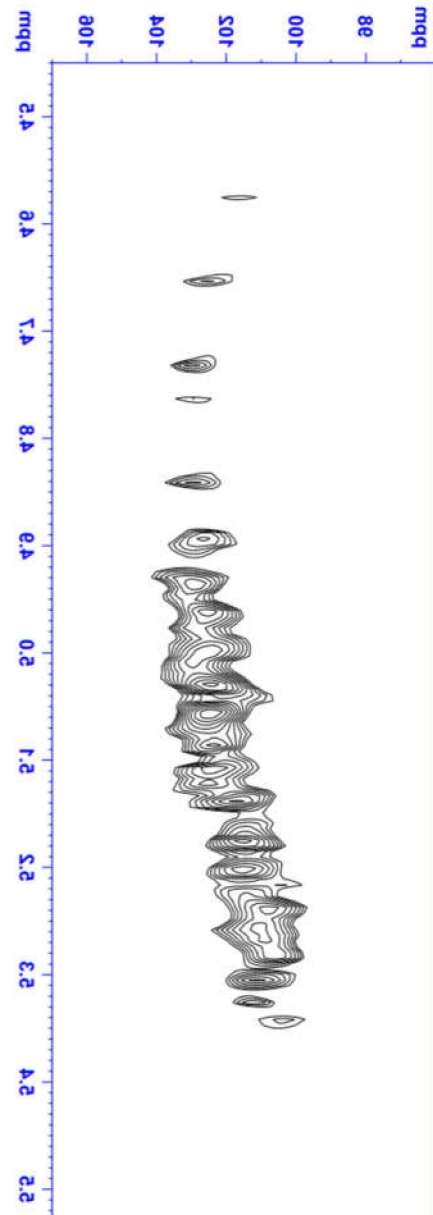
FONTE: O autor (2019).

NOTA: Solvente: D₂O. Temperatura: 70°C. Acetona como padrão interno: 31,45/2,225 ppm.

FIGURA 29 – AMPLIAÇÃO DA REGIÃO ANOMÉRICA NO HSQC DAS FRAÇÕES GBR1 E GBR-S.



(B) GBR-S



(A) GBR1

FONTE: O autor (2019).

NOTA: Solvente: D₂O. Temperatura: 70°C. Acetona como padrão interno: 31,45/2,225 ppm.

5.2.4 Reação de O-alkilação da fração da fração GBR-S

5.2.4.1 Obtenção da fração GBR-SN

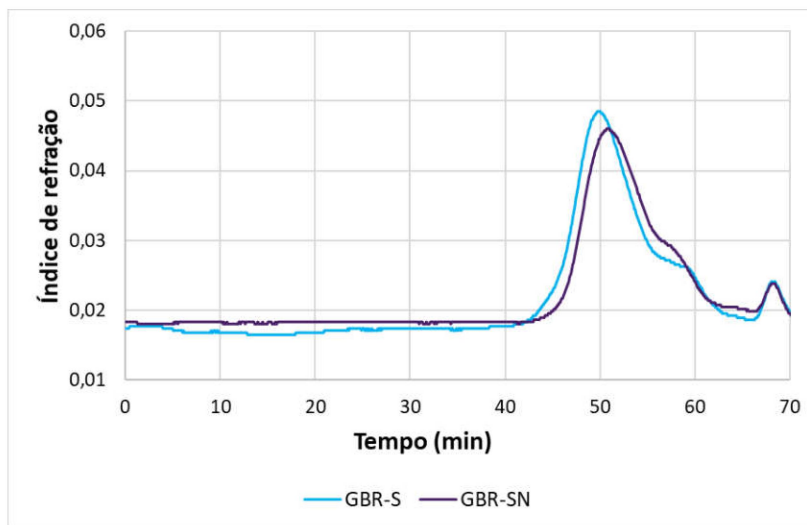
A fração degradada de Smith GBR-S foi O-alkilada para inserção de grupos aminas. Para esta reação, foi utilizada a mesma condição da aminação da fração GBR1 com o reativo 3-cloproliamina (entrada 03 - TABELA 7). A reação foi conduzida em temperatura de 60°C por 2 horas. O material obtido foi dialisado contra água destilada permanecendo solúvel após este procedimento, ao contrário do que foi observado para as frações aminadas derivadas de GBR1.

A fração GBR-SN apresentou 26,4 % de grupos O-sulfatos determinados por meio análise colorimétrica (DODGSON e PRICE, 1962). Em comparação com a fração de origem (GBR-S) houve diminuição no teor de sulfato (38,4 % na GBR-S). A diminuição no teor de sulfato é esperada, uma vez que ao introduzir a cadeia alquílica no polissacarídeo aumenta-se sua massa molecular.

5.2.4.2 Análise de homogeneidade do produto de aminação da fração degradada de Smith GBR-SN

A fração GBR-SN foi submetida à análise de homogeneidade por cromatografia de exclusão estérica de alta resolução acoplada a detectores de espalhamento de luz e de índice de refração (HPSEC-MALLS-IR). O tempo de eluição da fração GBR-SN foi similar ao da fração polissacarídica de origem GBR-S (FIGURA 30), indicando que o processo de aminação originou um produto de raio hidrodinâmico semelhante ao da fração de origem. A análise do cromatograma obtido pelo detector de espalhamento de luz apresentou um perfil assimétrico, indicando heterogeneidade da amostra (FIGURA 31).

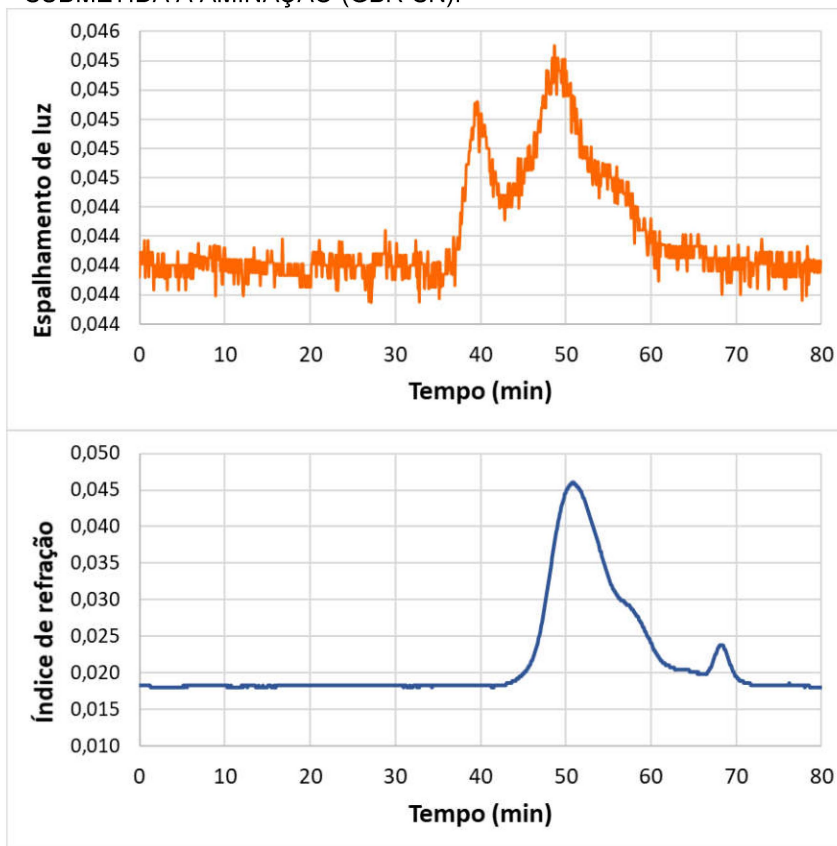
FIGURA 30 - COMPARAÇÃO DOS CROMATOGRAMAS OBTIDOS POR HPSEC-MALLS-IR DA FRAÇÃO GBR-S E DA FRAÇÃO DEGRADADA AMINADA GBR-SN.



FONTE: O autor (2019).

Nota: Picos após 65 minutos são correspondentes a presença de sais.

FIGURA 31 - PERFIL DE ELUIÇÃO EM HPSEC-MALLS-IR DA FRAÇÃO DEGRADADA DE SMITH SUBMETIDA À AMINAÇÃO (GBR-SN).



FONTE: O autor (2019).

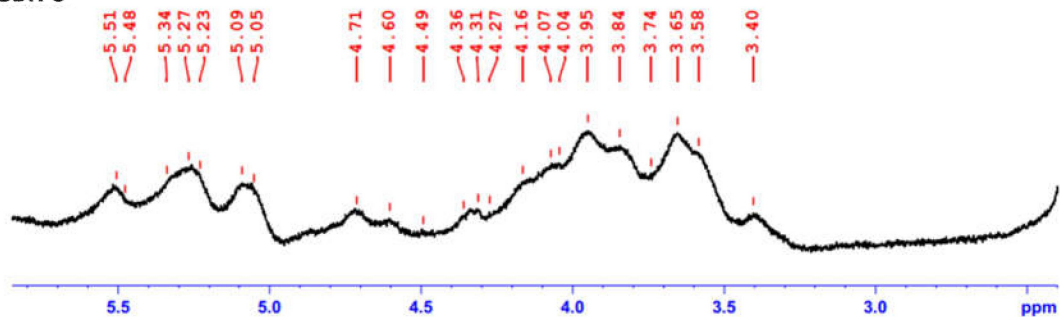
Nota: Picos após 65 minutos são correspondentes a presença de sais.

5.2.4.3 Espectroscopia de RMN de ^1H e ^{13}C da fração GBR-SN

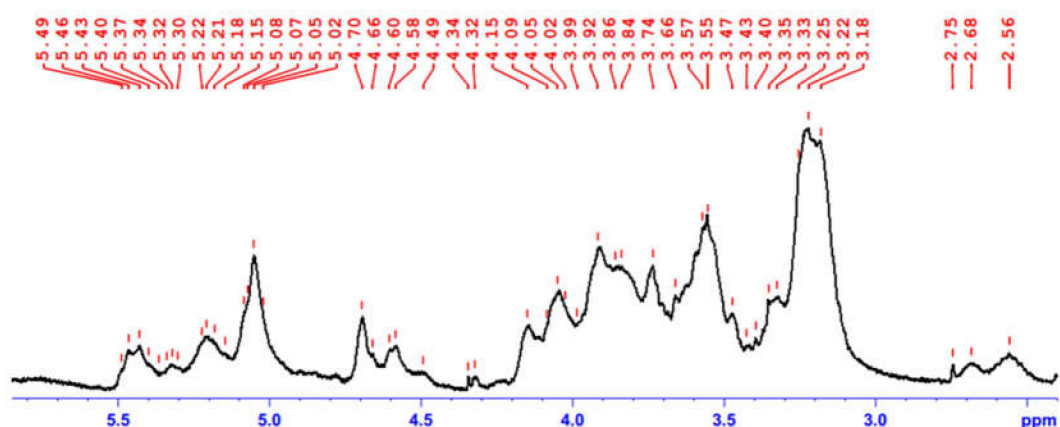
A análise de RMN de ^1H da fração degradada de Smith aminada (GBR-SN) apresentou espectro com sinais diferenciados em relação ao espectro da fração original GBR-S, representado juntamente com o espectro da fração GBR-SN para fins comparativos (FIGURA 32). Os sinais de alta intensidade em 1,37-1,32 ppm são correspondes aos hidrogênios do C-6 das unidades de $\alpha\text{-L-Rhap}$ (não apresentado). Além disso, o espectro de RMN de ^1H da fração GBR-SN apresenta novos sinais na região de 3,33-2,56 ppm quando comparado com o da fração GBR-S que podem ser atribuídos aos hidrogênios de CH_2 da cadeia alquílica do reativo 3-cloropropilamina. Há novos sinais na região de 3,35-4,70 ppm e na região anomérica de 5,49-5,02 ppm, aumentando a complexidade do espectro.

FIGURA 32 - ESPECTRO DE RMN DE ^1H DAS FRAÇÕES (A) GBR-S E (B) GBR-SN.

(A) GBR-S



(B) GBR-SN



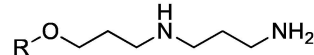


FONTE: O autor (2019).

NOTA: Solvente: D_2O . Temperatura: 70°C . N° de scans: 8. Acetona como padrão interno: 2,225 ppm.

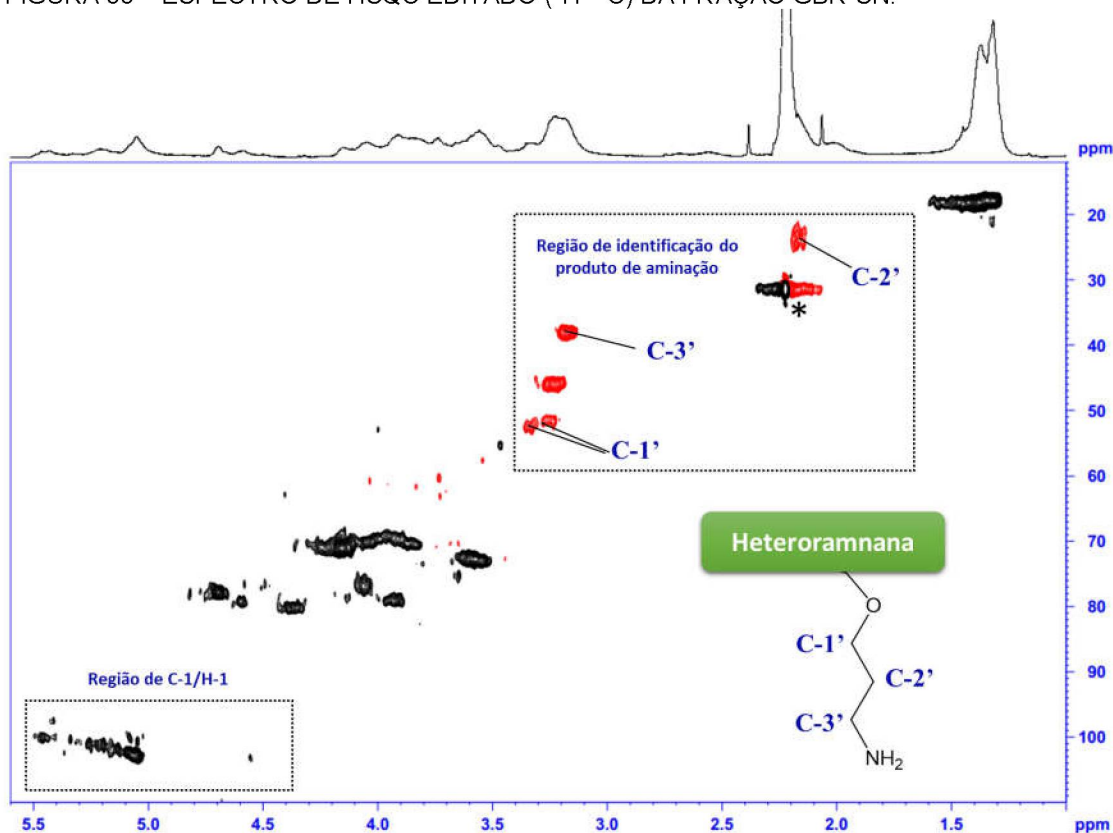
O espectro de HSQC da fração GBR-SN está representado na FIGURA 33. Os assinalamentos foram comparados com sinais da literatura, com sinais gerados pela ferramenta de predição do software ChemDraw Ultra e, ainda, levando em consideração a possibilidade de polimerização do reagente, resultando na formação de amins secundárias, anteriormente relatado na literatura (TABELA 10). Sua análise confirmou a presença das correlações de C-1'/H-1' e C-3'/H-3' da cadeia alquílica 3'-aminopropil derivada da 3-cloropropilamina em 52,5-51,6/3,35-3,26 e 38,1/3,17 ppm, respectivamente. A correlação em 24,5/2,18 ppm foi atribuída ao C-2'/H-2'. A correlação em 45,9/3,24 ppm sugere a polimerização da amina como uma reação paralela a reação de O-alkilação, pois o grupo haleto do reagente pode reagir com a amina primária previamente ligada ou não ao polissacarídeo como relatado por De Nooy e colaboradores (2000).

TABELA 10 – ESTUDO DE SINAIS PARA ASSINALAMENTO DO ESPECTRO DE HSQC DA FRAÇÃO GBR-SN.

Possíveis estruturas	Preditor de sinais* ¹³ C / ¹ H (ppm)	Sinais de Referência ¹³ C / ¹ H (ppm)	GBR1-SN ¹³ C / ¹ H (ppm)
	41,8 / 3,68	41,9 / 3,61 ¹	-
	67,9 / 3,37	20-55 / - ²	52,5-51,6/3,35-3,26
	46,0 / 2,55	47,8 / 3,10-3,22 ³	45,9 / 3,24

¹Hallett et al. (2009); ²Bao et al. (2001); ³Houen et al. (1994). *Os assinalamentos foram obtidos utilizando a ferramenta *NMR Predictor* do software ChemDraw Ultra.

A região anomérica do espectro de HSQC da fração GBR-SN está representado na FIGURA 34 juntamente com a fração GBR-S para fins comparativos. A análise da região anomérica do espectro de HSQC da fração GBR-SN permitiu identificar novas correlações anoméricas atribuídas a unidades α -L-Rhap que foram O-substituídas e a confirmação de unidades que permaneceram inalteradas. Há ainda desaparecimento da correlação anomérica em 102,9/4,97 ppm no espectro de GBR-SN atribuída a unidades de α -L-Rhap 3-ligadas, que sugere a substituição no C-2 dessas unidades tendo como consequência um efeito β no C-1 das unidades das α -L-Rhap 3-ligadas.

FIGURA 33 – ESPECTRO DE HSQC EDITADO (^1H - ^{13}C) DA FRAÇÃO GBR-SN.

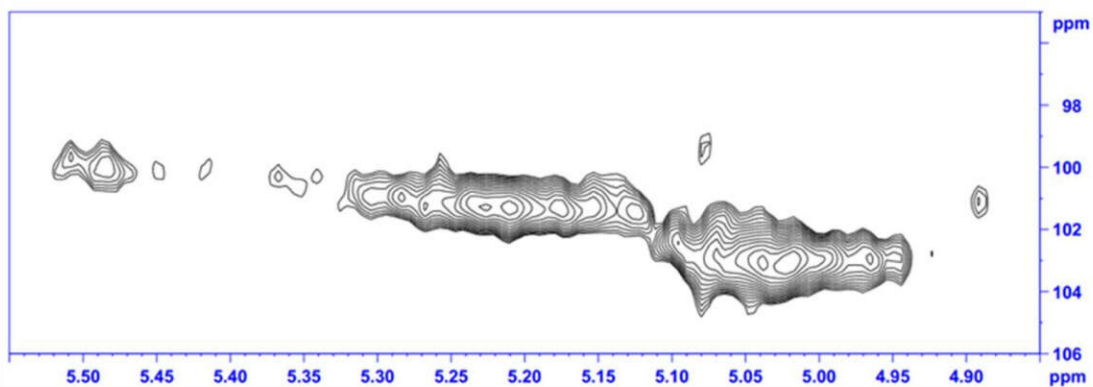
FONTE: O autor (2019).

NOTA: Solvente: D_2O . Temperatura: 70°C . *Acetona como padrão interno: 31,45/2,225 ppm.

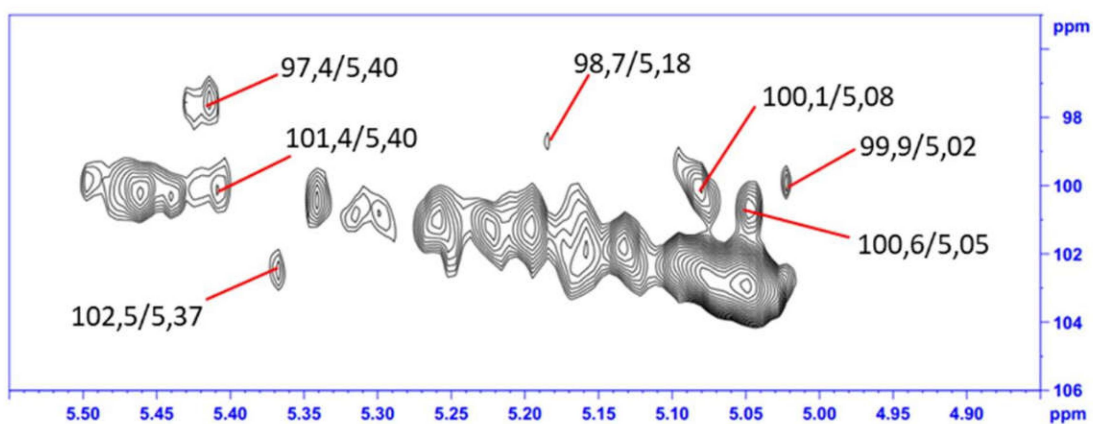
Portanto, os estudos de RMN da fração GBR-SN sugerem a obtenção de um derivado aminado através de reação de *O*-alquilação. A fração GBR-S apresenta diversos pontos susceptíveis a reação de *O*-alquilação para a produção de derivados aminados. São eles as unidades de α -L-Rhap 3-ligadas, sulfatadas ou não em C-2 ou C-4 e unidades de α -L-Rhap 2-ligadas sulfatadas em C-4. Alterações no espectro de HSQC de GBR-SN na região em que aparecem os sinais de C-2 a C-5 das unidades de α -L-Rhap também são perceptíveis em relação ao espectro de GBR-S (FIGURA 35). Ainda, o estudo do espectro de GBR-SN sugere a presença de unidades de α -L-Rhap não modificadas por *O*-alquilação pela presença dos assinalamentos descritos na TABELA 11.

FIGURA 34 – REGIÃO ANOMÉRICA DO ESPECTRO DE HSQC EDITADO (^1H - ^{13}C) DAS FRAÇÕES (A) GBR-S E (B) GBR-SN COM DESTAQUE PARA NOVOS SINAIS OBTIDOS NESTA REGIÃO.

(A) GBR-S



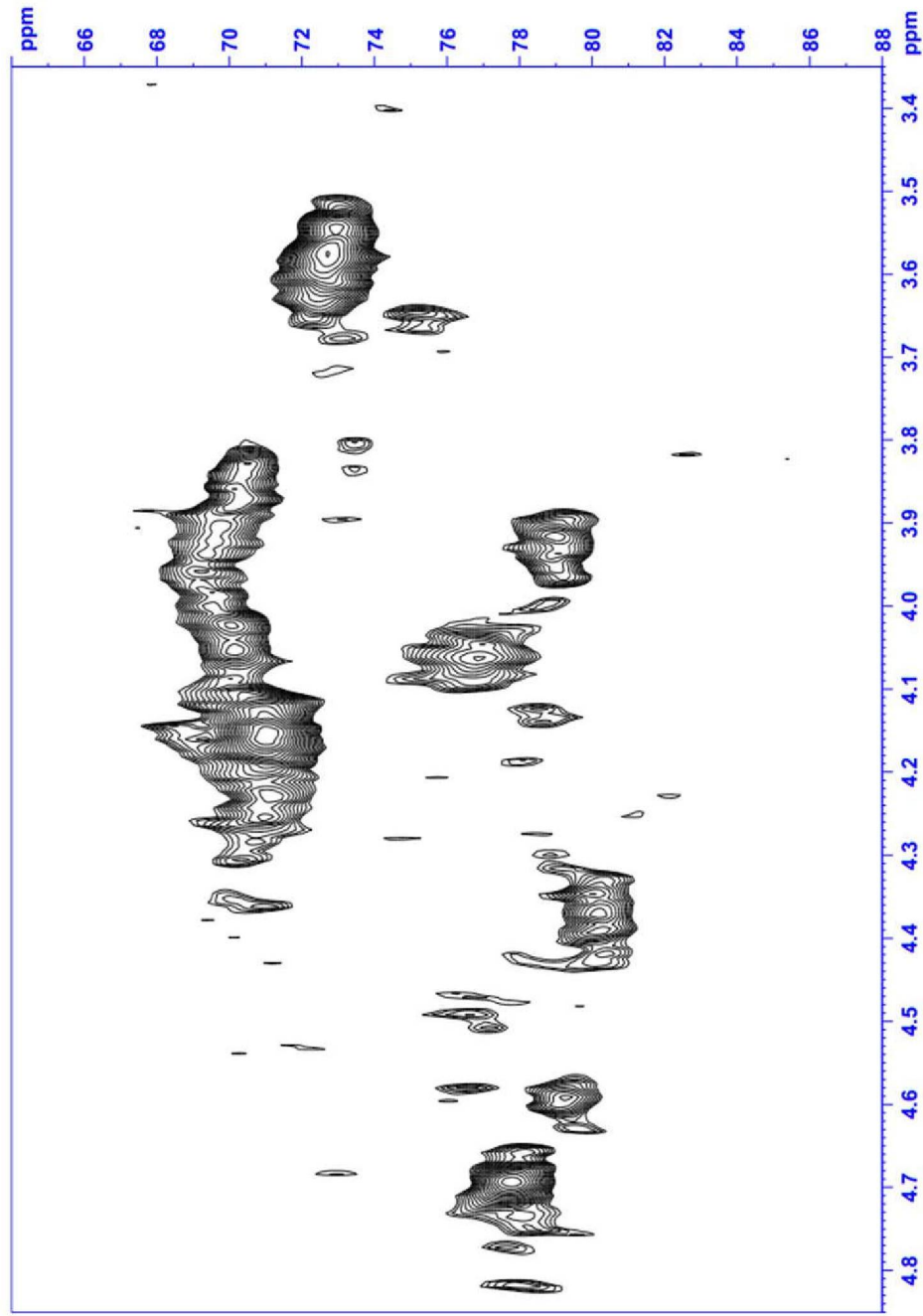
(B) GBR-SN



FONTE: O autor (2019).

NOTA: Solvente: D_2O . Temperatura: 70°C . Acetona como padrão interno: 31,45/2,225 ppm.

FIGURA 35 – REGIÃO DO ANEL NO HSQC DE GBR-SN.



FONTE: O autor (2019).

NOTA: Solvente: D₂O. Temperatura: 70°C. Acetona como padrão interno: 31,45/2,225 ppm.

TABELA 11 – ASSINALAMENTOS ATRIBUÍDOS AS UNIDADES DE α -L-Rhap NA FRAÇÃO GBR-SN.

Unidades de ramnose	Deslocamento químico (ppm)											
	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6
GBR-S												
[\rightarrow 3)- α -L-Rhap-(1 \rightarrow)]	103,1	71,4	79,0	72,4	70,6	18,2-17,9	5,04	4,16	3,95	3,65	4,04	1,35-1,22
[\rightarrow 3)- α -L-Rhap-2S-(1 \rightarrow)]	100,0 100,3	78,4	77,4	73,0	70,4 70,6	18,2-17,9	5,48 5,34	4,64	4,04	3,58	3,83 3,84	1,35-1,22
[\rightarrow 3)- α -L-Rhap-4S-(1 \rightarrow)]	102,5 102,9	71,4	76,1 76,8	80,5 80,0	69,1-69,9	18,2-17,9	5,10 5,07	4,16	4,07	4,36	3,91-4,00	1,35-1,22
[\rightarrow 3)- α -L-Rhap-2,4S-(1 \rightarrow)]	100,0 100,3	78,4	76,1 76,8	80,5 80,0	69,1-69,9	18,2-17,9	5,48 5,34	4,64	4,07	4,36	3,91-4,00	1,35-1,22
[\rightarrow 2)- α -L-Rhap-4S-(1 \rightarrow)]	101,3	79,7	70,4	81,7	69,1-69,9	18,2-17,9	5,21-5,23	4,14-4,16	4,06	4,27	3,91-4,00	1,35-1,22
[\rightarrow 2)- α -L-Rhap-3,4S-(1 \rightarrow)]	101,3	78,4	78,4	79,7	69,1-69,9	18,2-17,9	5,21-5,23	4,60	4,49	4,60	3,91-4,00	1,35-1,22
[\rightarrow 2,3)- α -L-Rhap-(1 \rightarrow)]	100,9	78,4	79,7	71,9	70,6	18,2-17,9	5,28	4,49	4,60	3,66	3,85	1,35-1,22
GBR-SN												
[\rightarrow 3)- α -L-Rhap-(1 \rightarrow)]	102,9	71,1	79,0	72,7	70,2	18,3-17,9	5,05	4,15	3,91	3,57	4,05	1,45-1,32
[\rightarrow 3)- α -L-Rhap-2S-(1 \rightarrow)]	100,3 100,8 100,6	78,5	77,0 77,1	73,0	70,2 70,5	18,3-17,9	5,46-5,44 5,32 5,34	4,75	4,06 4,05	3,54	3,84-3,86	1,45-1,32
[\rightarrow 3)- α -L-Rhap-4S-(1 \rightarrow)]	102,7	71,1	76,7	80,2	69,3-69,6	18,3-17,9	5,07	4,15	4,09	4,37	3,93-3,96	1,45-1,32
[\rightarrow 3)- α -L-Rhap-2,4S-(1 \rightarrow)]	100,3 100,8 100,6	77,8 78,1	76,7	80,2	69,3-69,6	18,3-17,9	5,46-5,44 5,32 5,34	4,70 4,66	4,09	4,37	3,93-3,96	1,45-1,32
[\rightarrow 2)- α -L-Rhap-4S-(1 \rightarrow)]	101,3	-	70,2	82,2	69,3-69,6	18,3-17,9	5,21-5,23	-	4,05	4,23	3,93-3,96	1,45-1,32
[\rightarrow 2)- α -L-Rhap-3,4S-(1 \rightarrow)]	101,1 101,8	-	78,4	79,3	69,3-69,6	18,3-17,9	5,18 5,15	-	4,43	4,59	3,93-3,96	1,45-1,32
[\rightarrow 2,3)- α -L-Rhap-(1 \rightarrow)]	101,0 100,9	78,4	79,3	-	70,4	18,3-17,9	5,26 5,30	4,43	4,59	-	3,84	1,45-1,32

6 CONCLUSÕES

No presente trabalho, análises químicas e espectroscópicas confirmaram que a alga verde *Gayralia brasiliensis* sintetiza heteroramnanas sulfatadas como principal polissacarídeo solúvel em meio aquoso. As heteroramnanas de *G. brasiliensis* são constituídas principalmente por unidades de α -L-ramnose 3- e 2-ligadas, as quais estão majoritariamente monossulfatadas e dissulfatadas. Outros monossacarídeos neutros (xilose, galactose e glucose), assim como ácidos urônicos são constituintes destes polissacarídeos sulfatados.

A heteroramnana sulfatada nativa, denominada GBR1, foi modificada quimicamente através de reação de O-alquilação com o reagente 3-cloropropilamina gerando uma fração aminada insolúvel. A fração nativa GBR1 foi submetida ao processo de degradação controlada de Smith gerando uma fração com maior teor de ramnose e grupos O-sulfato (GBR-S) em relação a fração de origem. GBR-S foi modificada quimicamente através de reação de O-alquilação com o reagente 3-cloropropilamina gerando uma heteroramnana aminada e solúvel em meio aquoso (GBR-SN).

Dessa forma, as modificações químicas da heteroramnana de *G. brasiliensis* geraram novos produtos aminados com potencial aplicação em diversas áreas biotecnológicas.

7 PERSPECTIVAS

A fim de complementar e melhor entender a estrutura do polissacarídeo modificado, serão testadas outras condições de reação de O-alkilação e seus respectivos produtos serão caracterizados.

Devido ao potencial de aplicação biológica dos compostos obtidos, na sequência, têm-se como objetivo a avaliação da atividade antioxidante das frações obtidas, assim como da heteroramnana nativa. Ainda, será avaliada a atividade anticoagulante dos compostos, sendo que o polissacarídeo apresenta grupos sulfatos, os quais influenciam diretamente na atividade proposta.

Em virtude da presença dos grupos amina na molécula modificada, no momento está sendo avaliada a atividade antimicrobiana dos compostos obtidos (GBR1, GBR-S e GBR-SN), utilizando os microrganismos patogênicos *Staphylococcus aureus* ATCC 23923, *Escherichia coli* NTC 9001 e *Salmonella typhimurium* ATCC 14028. A possibilidade de cationização das aminas primárias através de reações de metilação está sendo considerada para que, possivelmente, haja melhora na atividade antimicrobiana.

REFERÊNCIAS

DE ARAÚJO, C. A.; NOSEDA, M. D.; CIPRIANI, T. R.; et al. Selective sulfation of carrageenans and the influence of sulfate regiochemistry on anticoagulant properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 91, n. 2, p. 483–491, 2013.

BACKINOWSKY, L. V.; BALAN, N. F.; SHASHKOV, A. S.; KOCHETKOV, N. K. Synthesis and ¹³C-n.m.r. spectra of β-l-rhamnopyranosides. **Carbohydrate Research**, v. 84, n. 2, p. 225–235, 1980.

BAO, X.; DUAN, J.; FANG, X.; FANG, J. Chemical modifications of the (1→3)-α-d-glucan from spores of *Ganoderma lucidum* and investigation of their physicochemical properties and immunological activity. **Carbohydrate Research**, v. 336, n. 2, p. 127–140, 2001.

BERRI, M.; SLUGOCKI, C.; OLIVIER, M.; et al. Marine-sulfated polysaccharides extract of *Ulva armoricana* green algae exhibits an antimicrobial activity and stimulates cytokine expression by intestinal epithelial cells. **Journal of Applied Phycology**, v. 28, n. 5, p. 2999–3008, 2016.

BIERMANN, C. J.; MCGINNIS, G. D. (ORGS.). **Analysis of carbohydrates by GLC and MS**. Boca Raton, Fla: CRC Press, 1989.

BOBBITT, J. M. Periodate Oxidation of Carbohydrates. **Advances in Carbohydrate Chemistry**. v. 11, p.1–41, 1956. Elsevier.

CARPITA, N. C. e SHEA, E. Linkage structure of carbohydrates by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) of partially mutilated alditol acetates. In: BIERMANN, C. J. e MCGINNIS, G. D. *Analysis of carbohydrates by GLC and MS*, 2 ed., CRC Press, Boca Raton, Florida, p. 157-216, 1990.

DE CARVALHO, M. M. **Heteroramnanas sulfatadas obtidas de *Gayralia oxysperma*: investigação do mecanismo de atividade antitumoral e caracterização química dos produtos de degradação parcial**. Dissertação (Mestrado em Ciências-Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

DE CARVALHO, M. M. **Oxidação via periodato/clorito de ulvanas de *Ulva fasciata*: atividade anticoagulante e propriedades físico-químicas**. Tese (Doutorado em Ciências-Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2017.

DE CARVALHO, M. M.; DE FREITAS, R. A.; DUCATTI, D. R. B.; et al. Modification of ulvans via periodate-chlorite oxidation: Chemical characterization and anticoagulant activity. **Carbohydrate Polymers**, v. 197, p. 631–640, 2018.

CASSOLATO, J. E. F. **Determinação da estrutura química e atividade biológica de heteroramnanas sulfatadas obtidas de macroalgas verdes (Ulvaes-Chlorophyta)**. 172 f. Tese (Doutorado em Ciências-Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

CASSOLATO, J. E. F.; NOSEDA, M. D.; PUJOL, C. A.; et al. Chemical structure and antiviral activity of the sulfated heteroramnan isolated from the green seaweed *Gayralia oxysperma*. **Carbohydrate Research**, v. 343, n. 18, p. 3085–3095, 2008.

CIANCIA, M.; ALBERGHINA, J.; ARATA, P. X.; et al. Characterization of cell wall polysaccharides of the coenocytic green seaweed *Bryopsis plumosa* (Bryopsidaceae, Chlorophyta) from the argentine coast. **Journal of Phycology**, v. 48, n. 2, p. 326–335, 2012.

COLODI, Franciely Grose. Ulvanas modificadas via amidação e aminação redutiva: semissíntese de híbridos ulvana-kappa-carrabiose e atividades biológicas. 2017. 236 f. Tese (Doutorado) - Curso de Pós-graduação em Ciências-bioquímica, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2017.

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

DANTAS, L.; COURTOIS, J.; COURTOIS, B.; et al. NMR spectroscopic investigation of oligoglucuronates prepared by enzymic hydrolysis of a (1 → 4)- β -d-glucuronan. **Carbohydrate Research**, v. 265, n. 2, p. 303–310, 1994.

DIAS, P. F.; SIQUEIRA, J. M.; VENDRUSCOLO, L. F.; et al. Antiangiogenic and antitumoral properties of a polysaccharide isolated from the seaweed *Sargassum stenophyllum*. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 56, n. 4, p. 436–446, 2005.

DODGSON, K. S.; PRICE, R. G. A note on the determination of the ester sulphate content of sulphated polysaccharides. **The Biochemical Journal**, v. 84, p. 106–110, 1962.

DUARTE, M. E. R.; CAUDURO, J. P.; NOSEDA, D. G.; et al. The structure of the agaran sulfate from *Acanthophora spicifera* (Rhodomelaceae, Ceramiales) and its antiviral activity. Relation between structure and antiviral activity in agarans. **Carbohydrate Research**, v. 339, n. 2, p. 335–347, 2004.

DUARTE, M. E. R.; NOSEDA, D. G.; NOSEDA, M. D.; et al. Inhibitory effect of sulfated galactans from the marine alga *Bostrychia montagnei* on herpes simplex virus replication in vitro. **Phytomedicine**, v. 8, n. 1, p. 53–58, 2001.

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

FERNANDO, I. P. S.; KIM, D.; NAH, J.-W.; JEON, Y.-J. Advances in functionalizing fucoidans and alginates (bio)polymers by structural modifications: A review. **Chemical Engineering Journal**, v. 355, p. 33–48, 2019.

FILISSETTI-COZZI, T. M.; CARPITA, N. C. Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars. **Analytical Biochemistry**, v. 197, n. 1, p. 157–162, 1991.

FRANSSON, L. A. Periodate oxidation of L-iduronic acid residues in dermatan sulphate. **Carbohydrate Research**, v. 36, n. 2, p. 339–348, 1974.

FURNEAUX, R. H.; STEVENSON, T. T. The xylogalactan sulfate from *Chondria macrocarpa* (Ceramiales, Rhodophyta). **Hydrobiologia**, v. 204–205, n. 1, p. 615–620, 1990.

GOLDSTEIN, I. J.; HAY, G. W.; LEWIS, B. A.; SMITH, F. Controlled degradation of polysaccharides by periodate oxidation, reduction and hydrolysis. In: WHISTLER, R. L.; WOLFROM, M. L. (Eds.). *Methods in Carbohydrate Chemistry*. Academic Press, New York, v. 5, p. 361–369, 1965.

HAHNE, M.; JANN, B.; JANN, K. Structure of the capsular polysaccharide (K98 antigen) of *E. coli* O7:K98:H6. **Carbohydrate Research**, v. 222, p. 245–253, 1991.

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

HOUEN, G.; BOCK, K.; JENSEN, A. L. HPLC and NMR investigation of the serum amine oxidase catalyzed oxidation of polyamines. **Acta Chemica Scandinavica (Copenhagen, Denmark: 1989)**, v. 48, n. 1, p. 52–60, 1994.

JAIN, A. K.; DUBEY, V.; MEHRA, N. K.; et al. Carbohydrate-conjugated multiwalled carbon nanotubes: development and characterization. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 5, n. 4, p. 432–442, 2009.

JANSSON, P.-E.; KENNE, L.; WIDMALM, G. Computer-assisted structural analysis of polysaccharides with an extended version of casper using ¹H- and ¹³C-n.m.r. data. **Carbohydrate Research**, v. 188, p. 169–191, 1989.

DE JESUS RAPOSO, M.; DE MORAIS, A.; DE MORAIS, R. Marine Polysaccharides from Algae with Potential Biomedical Applications. **Marine Drugs**, v. 13, n. 5, p. 2967–3028, 2015.

KERNS, E.; DI, L.; CARTER, G. In Vitro Solubility Assays in Drug Discovery. **Current Drug Metabolism**, v. 9, n. 9, p. 879–885, 2008.

KRAAN, S. Algal Polysaccharides, Novel Applications and Outlook. In: C.-F. Chang (Org.); **Carbohydrates - Comprehensive Studies on Glycobiology and Glycotechnology**, 2012. InTech.

LEE, J.-B.; KOIZUMI, S.; HAYASHI, K.; HAYASHI, T. Structure of rhamnan sulfate from the green alga *Monostroma nitidum* and its anti-herpetic effect. **Carbohydrate Polymers**, v. 81, n. 3, p. 572–577, 2010.

LEE, J.-B.; YAMAGAKI, T.; MAEDA, M.; NAKANISHI, H. Rhamnan sulfate from cell walls of *monostroma latissimum*. **Phytochemistry**, v. 48, n. 6, p. 921–925, 1998.

LEIRO, J. M.; CASTRO, R.; ARRANZ, J. A.; LAMAS, J. Immunomodulating activities of acidic sulphated polysaccharides obtained from the seaweed *Ulva rigida* C. Agardh. **International Immunopharmacology**, v. 7, n. 7, p. 879–888, 2007.

LELIAERT, F.; SMITH, D. R.; MOREAU, H.; et al. Phylogeny and Molecular Evolution of the Green Algae. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 31, n. 1, p. 1–46, 2012.

LEWIS, L. A.; MCCOURT, R. M. Green algae and the origin of land plants. **American Journal of Botany**, v. 91, n. 10, p. 1535–1556, 2004.

LI, B.; LIU, S.; XING, R.; et al. Degradation of sulfated polysaccharides from *Enteromorpha prolifera* and their antioxidant activities. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, n. 2, p. 1991–1996, 2013.

LI, L.-Y.; LI, L.-Q.; GUO, C.-H. Evaluation of in vitro antioxidant and antibacterial activities of *Laminaria japonica* polysaccharides. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 4, n. 21, p. 2194–2198, 2010.

LINDBERG, B.; LÖNNGREN, J.; SVENSSON, S. Specific Degradation of Polysaccharides. **Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry**. v. 31, p.185–240, 1975. Elsevier.

LIPKIND, G. M.; SHASHKOV, A. S.; KNIREL, Y. A.; VINOGRADOV, E. V.; KOCHETKOV, N. K. A computer-assisted structural analysis of regular polysaccharides on the basis of ^{13}C -n.m.r. data. **Carbohydrate Research**, v. 175, n. 1, p. 59–75, 1988.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265–275, 1951.

MAO, W.; LI, H.; LI, Y.; et al. Chemical characteristic and anticoagulant activity of the sulfated polysaccharide isolated from *Monostroma latissimum* (Chlorophyta). **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 44, n. 1, p. 70–74, 2009.

MAZEPA, E. **Estrutura química e atividade antitumoral de heteroramnanas sulfatadas nativas e modificadas quimicamente obtidas da alga verde *Gayralia brasiliensis***. 2017. 213 f. Tese (Doutorado) - Curso de Pós-graduação em Bioquímica, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2017.

MOHY ELDIN, M. S.; SOLIMAN, E. A.; HASHEM, A. I.; TAMER, T. M. Antimicrobial activity of novel aminated chitosan derivatives for biomedical applications. **Advances in Polymer Technology**, v. 31, n. 4, p. 414–428, 2012.

DE NOOY, A. E. J.; RORI, V.; MASCI, G.; DENTINI, M.; CRESCENZI, V. Synthesis and preliminary characterisation of charged derivatives and hydrogels from scleroglucan. **Carbohydrate Research**, v. 324, n. 2, p. 116–126, 2000.

PELLIZZARI, F. M.; ABSHER, T.; YOKOYA, N. S.; OLIVEIRA, E. C. Cultivation of the edible green seaweed *Gayralia* (Chlorophyta) in southern Brazil. **Journal of Applied Phycology**, v. 19, n. 1, p. 63–69, 2007.

PELLIZZARI, F.; OLIVEIRA, E. C.; YOKOYA, N. S. Life-history, thallus ontogeny, and the effects of temperature, irradiance and salinity on growth of the edible green seaweed *Gayralia* spp. (Chlorophyta) from Southern Brazil. **Journal of Applied Phycology**, v. 20, n. 1, p. 75–82, 2008.

PELLIZZARI, F.; OLIVEIRA, M. C.; DA SILVA MEDEIROS, A.; YOKOYA, N. S.; OLIVEIRA, E. C. Morphology, ontogeny, and phylogenetic position of *Gayralia brasiliensis* sp. nov. (Ulotrichales, Chlorophyta) from the southern coast of Brazil. **Botanica Marina**, v. 56, n. 2, 2013.

PENGZHAN, Y.; QUANBIN, Z.; NING, L.; ZUHONG, X.; YANMEI, W. Polysaccharides from *Ulva pertusa* (Chlorophyta) and preliminary studies on their antihyperlipidemia activity. **Journal of Applied Phycology**, v. 15, n. 1, p. 21–27, 2003.

PIERRE, G.; SOPENA, V.; JUIN, C.; et al. Antibacterial activity of a sulfated galactan extracted from the marine alga *Chaetomorpha aerea* against *Staphylococcus aureus*. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 16, n. 5, p. 937–945, 2011.

QI, H.; HUANG, L.; LIU, X.; et al. Antihyperlipidemic activity of high sulfate content derivative of polysaccharide extracted from *Ulva pertusa* (Chlorophyta). **Carbohydrate Polymers**, v. 87, n. 2, p. 1637–1640, 2012.

QI, H.; ZHANG, Q.; ZHAO, T.; et al. Antioxidant activity of different sulfate content derivatives of polysaccharide extracted from *Ulva pertusa* (Chlorophyta) in vitro. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 37, n. 4, p. 195–199, 2005.

RAY, B. Polysaccharides from *Enteromorpha compressa*: Isolation, purification and structural features. **Carbohydrate Polymers**, v. 66, n. 3, p. 408–416, 2006.

RAY, B.; LAHAYE, M. Cell-wall polysaccharides from the marine green alga *Ulva "rigida"* (Ulvales, Chlorophyta). Chemical structure of ulvan. **Carbohydrate Research**, v. 274, p. 313–318, 1995.

ROPELLATO, J.; CARVALHO, M. M.; FERREIRA, L. G.; et al. Sulfated heterorhamnans from the green seaweed *Gayralia oxysperma*: partial depolymerization, chemical structure and antitumor activity. **Carbohydrate Polymers**, v. 117, p. 476–485, 2015.

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.

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

SOEDA, S.; OHMAGARI, Y.; SHIMENO, H.; NAGAMATSU, A. Preparation of Aminated Fucoidan and Its Evaluation as an Antithrombotic and Antilipemic Agent. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 17, n. 6, p. 784–788, 1994.

TABARSA, M.; LEE, S.-J.; YOU, S. Structural analysis of immunostimulating sulfated polysaccharides from *Ulva pertusa*. **Carbohydrate Research**, v. 361, p. 141–147, 2012.

TAKO, M.; TAMANAHA, M.; TAMASHIRO, Y.; UECHI, S. Structure of Ulvan Isolated from the Edible Green Seaweed, *Ulva pertusa*. **Advances in Bioscience and Biotechnology**, v. 06, n. 10, p. 645–655, 2015.

TARPANOV, V.; VLAHOV, R.; PENKOV, M.; et al. A New Synthesis of Roxatidine Acetate. **Synthetic Communications**, v. 29, n. 1, p. 15–20, 1999.

USOV, A. I.; ZELINSKY, N. D. Chemical structures of algal polysaccharides. **Functional Ingredients from Algae for Foods and Nutraceuticals**, Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition. p.23–86, 2013. Elsevier.

WANG, Z.; XIE, J.; SHEN, M.; NIE, S.; XIE, M. Sulfated modification of polysaccharides: Synthesis, characterization and bioactivities. **Trends in Food Science & Technology**, v. 74, p. 147–157, 2018.

XIAO, J. B.; JIANG, H. A Review on the Structure-Function Relationship Aspect of Polysaccharides from Tea Materials. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 55, n. 7, p. 930–938, 2015.

XIE, J.-H.; JIN, M.-L.; MORRIS, G. A.; et al. Advances on bioactive polysaccharides from medicinal plants. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 56, n. sup1, p. S60–S84, 2016.

YAN, G. L.; GUO, Y. M.; YUAN, J. M.; LIU, D.; ZHANG, B. K. Sodium alginate oligosaccharides from brown algae inhibit Salmonella Enteritidis colonization in broiler chickens. **Poultry Science**, v. 90, n. 7, p. 1441–1448, 2011.

YAO, Z.; WU, H.; ZHANG, S.; DU, Y. Enzymatic preparation of κ -carrageenan oligosaccharides and their anti-angiogenic activity. **Carbohydrate Polymers**, v. 101, p. 359–367, 2014.

YEMM, E. W.; COCKING, E. C.; RICKETTS, R. E. The determination of amino-acids with ninhydrin. **The Analyst**, v. 80, n. 948, p. 209, 1955.

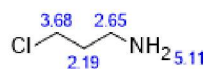
ZHANG, Z.; WANG, X.; YU, S.; et al. Synthesized oversulfated and acetylated derivatives of polysaccharide extracted from *Enteromorpha linza* and their potential antioxidant activity. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 49, n. 5, p. 1012–1015, 2011.

ZIEGLER-BOROWSKA, M. Magnetic nanoparticles coated with aminated starch for HSA immobilization- simple and fast polymer surface functionalization. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 136, p. 106–114, 2019.

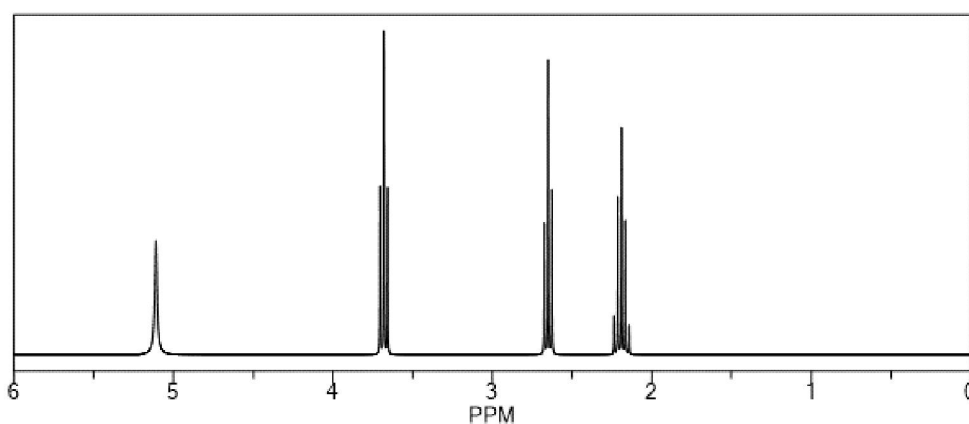
ANEXO I – PREDIÇÃO DE SINAIS DA TABELA 10

- 3-cloropropilamina

ChemNMR ^1H Estimation



Estimation quality is indicated by color: **good**, **medium**, **rough**



Protocol of the H-1 NMR Prediction:

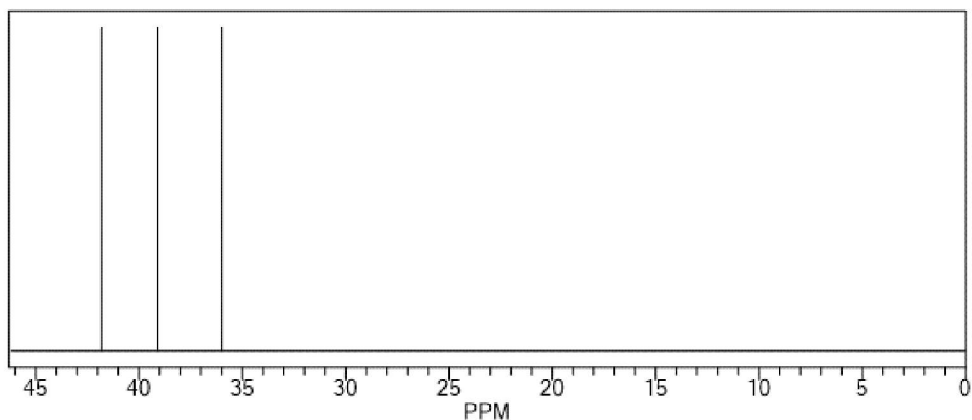
Node	Shift	Base + Inc.	Comment (ppm rel. to TMS)
NH2 5,11		2,00	amine
		3,11	general corrections
CH2 3,68		1,37	methylene
		2,05	1 alpha -Cl
		-0,04	1 beta -C
		0,30	general corrections
CH2 2,65		1,37	methylene
		1,32	1 alpha -N
		-0,04	1 beta -C
CH2 2,19		1,37	methylene
		0,24	1 beta -Cl
		0,22	1 beta -N
		0,36	general corrections

^1H NMR Coupling Constant Prediction

shift	atom index	coupling partner.	constant and vector
5,11	5		
3,68	2	3	7,1 H-CH-CH-H
2,65	4	3	7,1 H-CH-CH-H
2,19	3	2	7,1 H-CH-CH-H
		4	7,1 H-CH-CH-H

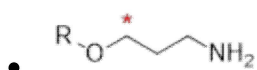
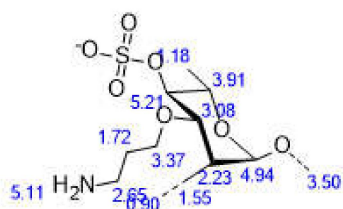
ChemNMR ^{13}C Estimation

Estimation quality is indicated by color: **good**, **medium**, **rough**

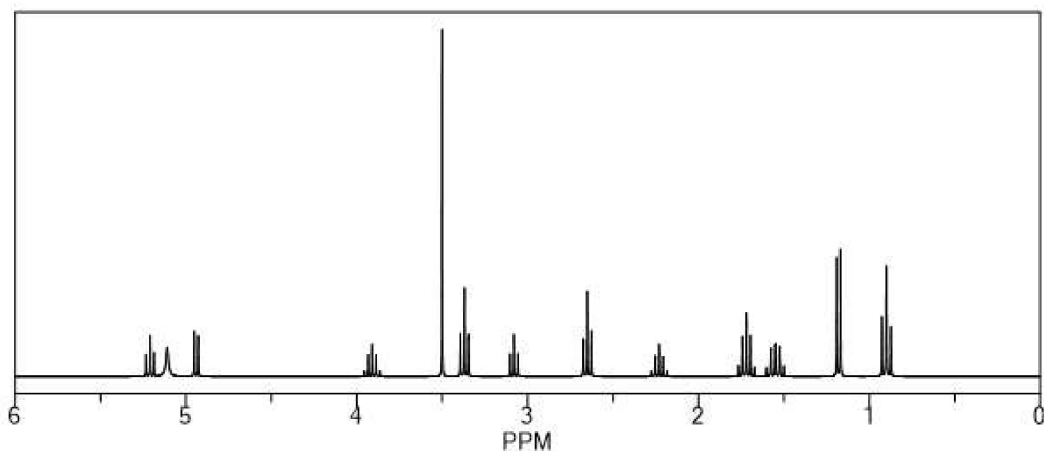


Protocol of the C-13 NMR Prediction:

Node	Shift	Base + Inc.	Comment (ppm rel. to TMS)
CH2 41,8		-2,3	aliphatic
		9,1	1 alpha -C
		31,0	1 alpha -Cl
		9,4	1 beta -C
		-5,1	1 gamma -N
		-0,3	general corrections
CH2 39,1		-2,3	aliphatic
		9,1	1 alpha -C
		28,3	1 alpha -N
		9,4	1 beta -C
		-5,1	1 gamma -Cl
		-0,3	general corrections
CH2 36,0		-2,3	aliphatic
		18,2	2 alpha -C
		10,0	1 beta -Cl
		11,3	1 beta -N
		-1,2	general corrections

ChemNMR ^1H Estimation

Estimation quality is indicated by color: good, medium, rough



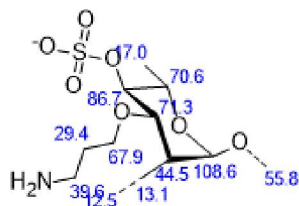
Protocol of the H-1 NMR Prediction:

Node	Shift	Base + Inc.	Comment (ppm rel. to TMS)
NH ₂	5,11	2,00	amine
		3,11	general corrections
CH	4,94	3,60	tetrahydropyran
		1,35	1 alpha -O-C from methine
		-0,01	1 beta -C from methine
CH	3,91	3,60	tetrahydropyran
		0,17	1 alpha -C from methine
		0,14	1 beta -O-S=O from methine
CH	5,21	1,60	tetrahydropyran
		3,30	1 alpha -O-S=O from methine
		-0,01	1 beta -C from methine
		0,32	1 beta -O-C from methine
CH	3,08	1,60	tetrahydropyran
		1,35	1 alpha -O-C from methine
		0,14	1 beta -O-S=O from methine
		-0,01	1 beta -C from methine
		0,32	1 beta -O-C from methine
CH	2,23	1,60	tetrahydropyran
		0,32	1 beta -O-C from methine
		0,32	1 beta -O-C from methine
		-0,01	1 beta -C from methine

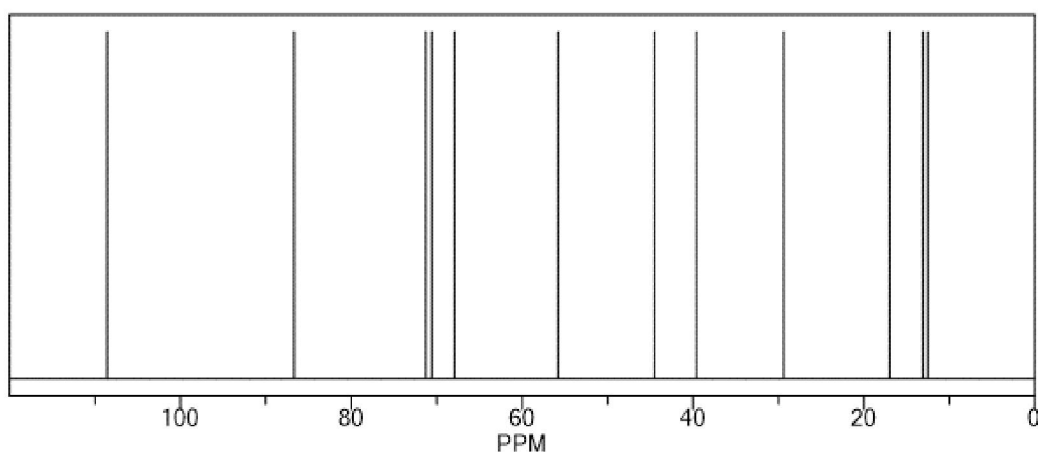
CH2 3,37	1,37	methylene
	2,04	1 alpha -O-C
	-0,04	1 beta -C
CH3 3,50	0,86	methyl
	2,38	1 alpha -O-C
	0,26	general corrections
CH2 2,65	1,37	methylene
	1,32	1 alpha -N
	-0,04	1 beta -C
CH2 1,55	1,37	methylene
	0,00	1 alpha -C
	-0,08	2 beta -C
	0,26	general corrections
CH3 1,18	0,86	methyl
	0,25	1 beta -O-C
	0,10	1 beta -C-R
	-0,03	general corrections
CH2 1,72	1,37	methylene
	0,13	1 beta -O-C
	0,22	1 beta -N
CH3 0,90	0,86	methyl
	0,10	1 beta -C-R
	-0,06	general corrections

¹H NMR Coupling Constant Prediction

shift	atom index	coupling partner.	constant and vector
5,11	15		
4,94	3		
		8 7,0	H-C-C-H
3,91	1		
		2 7,0	H-C-C-H
		9 6,8	H-C-CH ₂ -H
5,21	2		
		1 7,0	H-C-C-H
		7 7,0	H-C-C-H
3,08	7		
		2 7,0	H-C-C-H
		8 7,0	H-C-C-H
2,23	8		
		3 7,0	H-C-C-H
		7 7,0	H-C-C-H
		6 7,0	H-C-CH-H
3,37	12		
		13 7,1	H-CH-CH-H
3,50	16		
2,65	14		
		13 7,1	H-CH-CH-H
1,55	6		
		8 7,0	H-CH-C-H
		10 8,0	H-CH-CH ₂ -H
1,18	9		
		1 6,8	H-CH ₂ -C-H
1,72	13		
		12 7,1	H-CH-CH-H
		14 7,1	H-CH-CH-H
0,90	10		
		6 8,0	H-CH ₂ -CH-H

ChemNMR ^{13}C Estimation

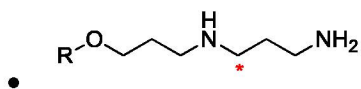
Estimation quality is indicated by color: **good**, **medium**, **rough**



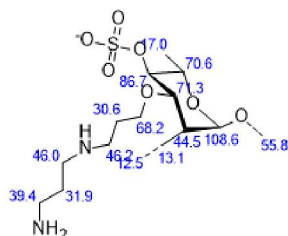
Protocol of the C-13 NMR Prediction:

Node	Shift	Base + Inc.	Comment (ppm rel. to TMS)		
CH	108,6	-4,9	tetrahydropyran		
		9,1	1 alpha -C from aliphatic		
		98,0	2 alpha -O from aliphatic		
		37,6	4 beta -C from aliphatic		
		-7,5	3 gamma -C from aliphatic		
		-6,2	1 gamma -O from aliphatic		
		0,3	1 delta -C from aliphatic		
		0,3	1 delta -O from aliphatic		
		-18,1	general corrections		
		CH	70,6	-4,9	tetrahydropyran
				18,2	2 alpha -C from aliphatic
49,0	1 alpha -O from aliphatic				
18,8	2 beta -C from aliphatic				
10,1	1 beta -O from aliphatic				
-2,5	1 gamma -C from aliphatic				
-12,4	2 gamma -O from aliphatic				
-3,9	1 gamma -S(=O)=O from aliphatic				
0,9	3 delta -C from aliphatic				
?	1 unknown delta substituent(s) from aliphatic				
-2,7	general corrections				
CH	86,7	-7,5	tetrahydropyran		
		18,2	2 alpha -C from aliphatic		
		49,0	1 alpha -O from aliphatic		
		18,8	2 beta -C from aliphatic		
		20,2	2 beta -O from aliphatic		
		1,0	1 beta -S(=O)=O from aliphatic		
		-7,5	3 gamma -C from aliphatic		
		?	1 unknown gamma substituent(s) from aliphatic		
		0,6	2 delta -C from aliphatic		
		0,3	1 delta -O from aliphatic		
		-6,4	general corrections		

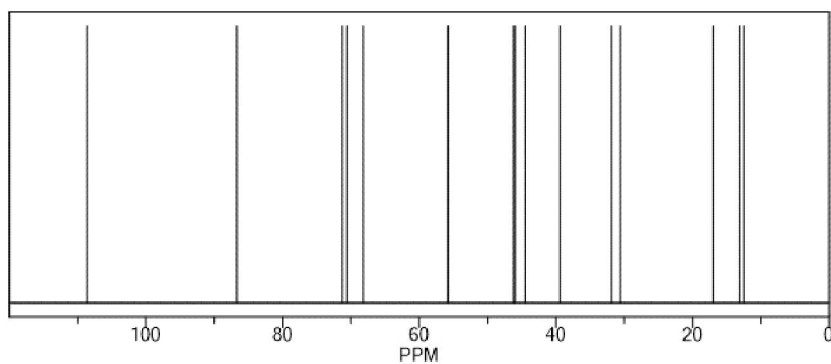
CH 71,3	-5,9	tetrahydropyran
	18,2	2 alpha -C from aliphatic
	49,0	1 alpha -O from aliphatic
	37,6	4 beta -C from aliphatic
	10,1	1 beta -O from aliphatic
	-7,5	3 gamma -C from aliphatic
	-12,4	2 gamma -O from aliphatic
	-3,9	1 gamma -S(=O)=O from aliphatic
	0,6	2 delta -C from aliphatic
	?	1 unknown delta substituent(s) from aliphatic
	-14,5	general corrections
CH 44,5	-7,5	tetrahydropyran
	27,3	3 alpha -C from aliphatic
	18,8	2 beta -C from aliphatic
	30,3	3 beta -O from aliphatic
	-7,5	3 gamma -C from aliphatic
	-6,2	1 gamma -O from aliphatic
	0,6	2 delta -C from aliphatic
	0,0	1 delta -S(=O)=O from aliphatic
	-11,3	general corrections
CH2 67,9	-2,3	aliphatic
	9,1	1 alpha -C
	49,0	1 alpha -O
	18,8	2 beta -C
	-5,0	2 gamma -C
	-5,1	1 gamma -N
	0,9	3 delta -C
	0,3	1 delta -O
	2,2	general corrections
CH3 55,8	-2,3	aliphatic
	49,0	1 alpha -O
	9,4	1 beta -C
	-2,5	1 gamma -C
	-6,2	1 gamma -O
	0,9	3 delta -C
	7,5	general corrections
CH2 39,6	-2,3	aliphatic
	9,1	1 alpha -C
	28,3	1 alpha -N
	9,4	1 beta -C
	-6,2	1 gamma -O
	0,3	1 delta -C
	1,0	general corrections
CH2 13,1	-2,3	aliphatic
	18,2	2 alpha -C
	18,8	2 beta -C
	-2,5	1 gamma -C
	-18,6	3 gamma -O
	0,9	3 delta -C
	0,3	1 delta -O
	-1,7	general corrections
CH3 17,0	-2,3	aliphatic
	9,1	1 alpha -C
	9,4	1 beta -C
	10,1	1 beta -O
	-5,0	2 gamma -C
	-6,2	1 gamma -O
	0,3	1 delta -C
	0,6	2 delta -O
	0,0	1 delta -S(=O)=O
	1,0	general corrections
CH2 29,4	-2,3	aliphatic
	18,2	2 alpha -C
	10,1	1 beta -O
	11,3	1 beta -N
	-2,5	1 gamma -C
	0,6	2 delta -C
	-6,0	general corrections
CH3 12,5	-2,3	aliphatic
	9,1	1 alpha -C
	9,4	1 beta -C
	-5,0	2 gamma -C
	0,3	1 delta -C
	0,9	3 delta -O
	0,1	general corrections



ChemNMR ^{13}C Estimation



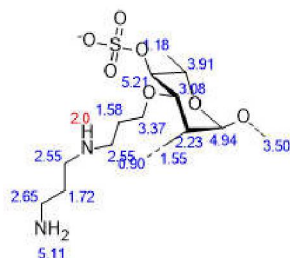
Estimation quality is indicated by color: **good**, **medium**, **rough**



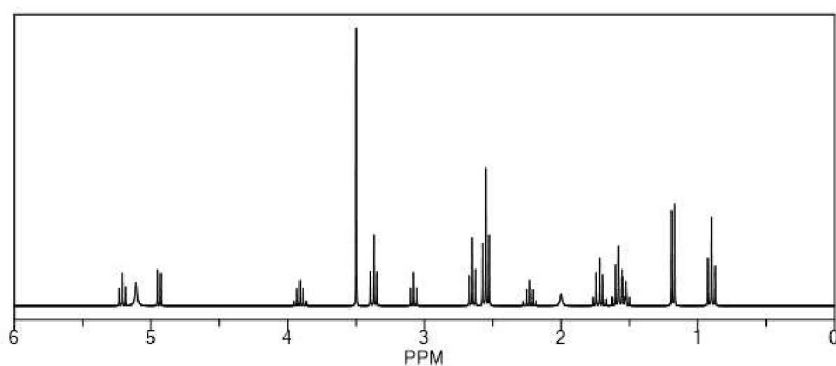
Protocol of the C-13 NMR Prediction:

Node	Shift	Base + Inc.	Comment (ppm rel. to TMS)	
CH 108,6	-4,9		tetrahydropyran	
	9,1		1 alpha -C from aliphatic	
	98,0		2 alpha -O from aliphatic	
	37,6		4 beta -C from aliphatic	
	-7,5		3 gamma -C from aliphatic	
	-6,2		1 gamma -O from aliphatic	
	0,3		1 delta -C from aliphatic	
	0,3		1 delta -O from aliphatic	
	-18,1		general corrections	
	CH 70,6	-4,9		tetrahydropyran
		18,2		2 alpha -C from aliphatic
49,0			1 alpha -O from aliphatic	
18,8			2 beta -C from aliphatic	
10,1			1 beta -O from aliphatic	
-2,5			1 gamma -C from aliphatic	
-12,4			2 gamma -O from aliphatic	
-3,9			1 gamma -S(=O)=O from aliphatic	
0,9			3 delta -C from aliphatic	
?			1 unknown delta substituent(s) from aliphatic	
-2,7			general corrections	
CH 86,7	-7,5		tetrahydropyran	
	18,2		2 alpha -C from aliphatic	
	49,0		1 alpha -O from aliphatic	
	18,8		2 beta -C from aliphatic	
	20,2		2 beta -O from aliphatic	
	1,0		1 beta -S(=O)=O from aliphatic	
	-7,5		3 gamma -C from aliphatic	
	?		1 unknown gamma substituent(s) from aliphatic	
	0,6		2 delta -C from aliphatic	
	0,3		1 delta -O from aliphatic	
	-6,4		general corrections	

CH 71,3	-5,9	tetrahydropyran
	18,2	2 alpha -C from aliphatic
	49,0	1 alpha -O from aliphatic
	37,6	4 beta -C from aliphatic
	10,1	1 beta -O from aliphatic
	-7,5	3 gamma -C from aliphatic
	-12,4	2 gamma -O from aliphatic
	-3,9	1 gamma -S(=O)=O from aliphatic
	0,6	2 delta -C from aliphatic
	?	1 unknown delta substituent(s) from aliphatic
	-14,5	general corrections
CH 44,5	-7,5	tetrahydropyran
	27,3	3 alpha -C from aliphatic
	18,8	2 beta -C from aliphatic
	30,3	3 beta -O from aliphatic
	-7,5	3 gamma -C from aliphatic
	-6,2	1 gamma -O from aliphatic
	0,6	2 delta -C from aliphatic
	0,0	1 delta -S(=O)=O from aliphatic
	-11,3	general corrections
CH2 68,2	-2,3	aliphatic
	9,1	1 alpha -C
	49,0	1 alpha -O
	18,8	2 beta -C
	-5,0	2 gamma -C
	-5,1	1 gamma -N
	1,2	4 delta -C
	0,3	1 delta -O
	2,2	general corrections
CH3 55,8	-2,3	aliphatic
	49,0	1 alpha -O
	9,4	1 beta -C
	-2,5	1 gamma -C
	-6,2	1 gamma -O
	0,9	3 delta -C
	7,5	general corrections
CH2 46,2	-2,3	aliphatic
	9,1	1 alpha -C
	28,3	1 alpha -N
	18,8	2 beta -C
	-2,5	1 gamma -C
	-6,2	1 gamma -O
	0,6	2 delta -C
	0,4	general corrections
CH2 46,0	-2,3	aliphatic
	9,1	1 alpha -C
	28,3	1 alpha -N
	18,8	2 beta -C
	-2,5	1 gamma -C
	-5,1	1 gamma -N
	0,3	1 delta -C
	-0,6	general corrections
CH2 39,4	-2,3	aliphatic
	9,1	1 alpha -C
	28,3	1 alpha -N
	9,4	1 beta -C
	-5,1	1 gamma -N
	0,3	1 delta -C
	-0,3	general corrections
CH2 13,1	-2,3	aliphatic
	18,2	2 alpha -C
	18,8	2 beta -C
	-2,5	1 gamma -C
	-18,6	3 gamma -O
	0,9	3 delta -C
	0,3	1 delta -O
	-1,7	general corrections
CH3 17,0	-2,3	aliphatic
	9,1	1 alpha -C
	9,4	1 beta -C
	10,1	1 beta -O
	-5,0	2 gamma -C
	-6,2	1 gamma -O
	0,3	1 delta -C
	0,6	2 delta -O
	0,0	1 delta -S(=O)=O
	1,0	general corrections
CH2 30,6	-2,3	aliphatic
	18,2	2 alpha -C
	10,1	1 beta -O
	11,3	1 beta -N
	-5,0	2 gamma -C
	0,9	3 delta -C
	-2,6	general corrections
CH2 31,9	-2,3	aliphatic
	18,2	2 alpha -C
	22,6	2 beta -N
	-2,5	1 gamma -C
	0,3	1 delta -C
	-4,4	general corrections
CH3 12,5	-2,3	aliphatic
	9,1	1 alpha -C
	9,4	1 beta -C
	-5,0	2 gamma -C
	0,3	1 delta -C
	0,9	3 delta -O
	0,1	general corrections

ChemNMR ^1H Estimation

Estimation quality is indicated by color: **good**, **medium**, **rough**



Protocol of the H-1 NMR Prediction:

Node	Shift	Base + Inc.	Comment (ppm rel. to TMS)
NH	2,0	2,00	amine
NH2	5,11	2,00	amine
		3,11	general corrections
CH	4,94	3,60	tetrahydropyran
		1,35	1 alpha -O-C from methine
		-0,01	1 beta -C from methine
CH	3,91	3,60	tetrahydropyran
		0,17	1 alpha -C from methine
		0,14	1 beta -O-S=O from methine
CH	5,21	1,60	tetrahydropyran
		3,30	1 alpha -O-S=O from methine
		-0,01	1 beta -C from methine
		0,32	1 beta -O-C from methine
CH	3,08	1,60	tetrahydropyran
		1,35	1 alpha -O-C from methine
		0,14	1 beta -O-S=O from methine
		-0,01	1 beta -C from methine
CH	2,23	1,60	tetrahydropyran
		0,32	1 beta -O-C from methine
		0,32	1 beta -O-C from methine
		-0,01	1 beta -C from methine
CH2	3,37	1,37	methylene
		2,04	1 alpha -O-C
		-0,04	1 beta -C
CH3	3,50	0,86	methyl
		2,38	1 alpha -O-C
		0,26	general corrections
CH2	2,55	1,37	methylene
		1,22	1 alpha -N-C
		-0,04	1 beta -C
CH2	2,55	1,37	methylene
		1,22	1 alpha -N-C
		-0,04	1 beta -C
CH2	2,65	1,37	methylene
		1,32	1 alpha -N
		-0,04	1 beta -C
CH2	1,55	1,37	methylene
		0,00	1 alpha -C
		-0,08	2 beta -C
		0,26	general corrections
CH3	1,18	0,86	methyl
		0,25	1 beta -O-C
		0,10	1 beta -C-R
		-0,03	general corrections

CH2 1,58	1,37	methylene
	0,13	1 beta -O-C
	0,08	1 beta -N-C
CH2 1,72	1,37	methylene
	0,08	1 beta -N-C
	0,22	1 beta -N
	0,05	general corrections
CH3 0,90	0,86	methyl
	0,10	1 beta -C-R
	-0,06	general corrections

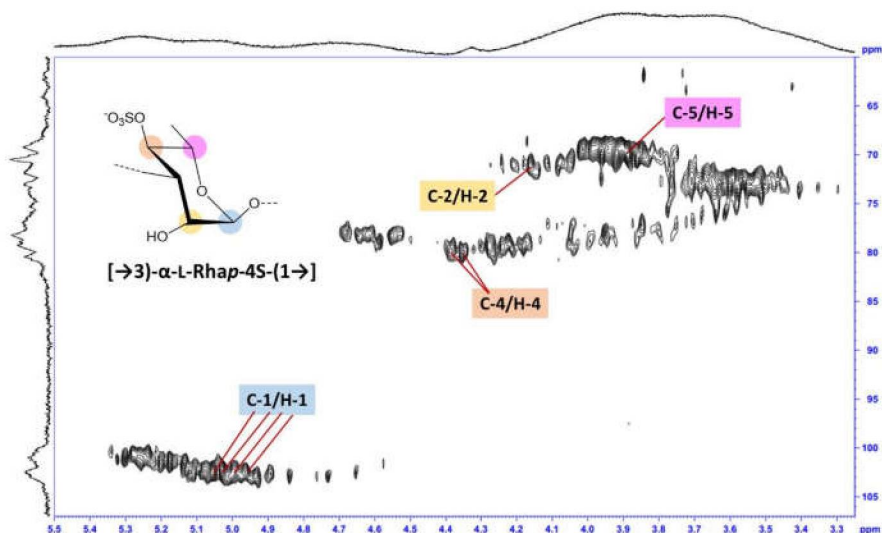
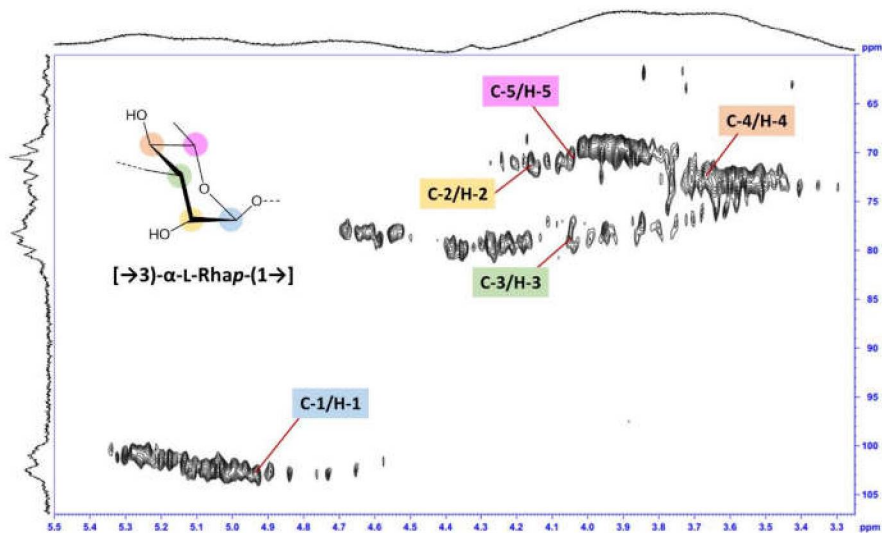
1H NMR Coupling Constant Prediction

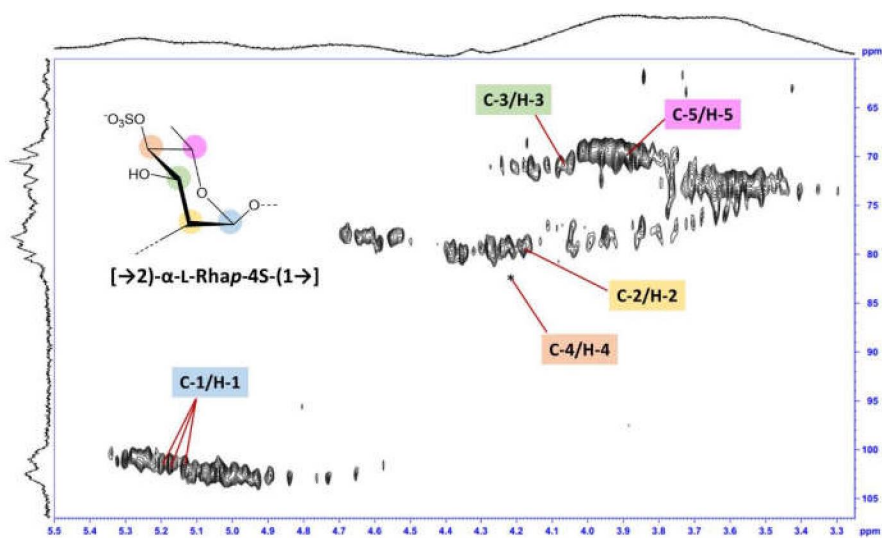
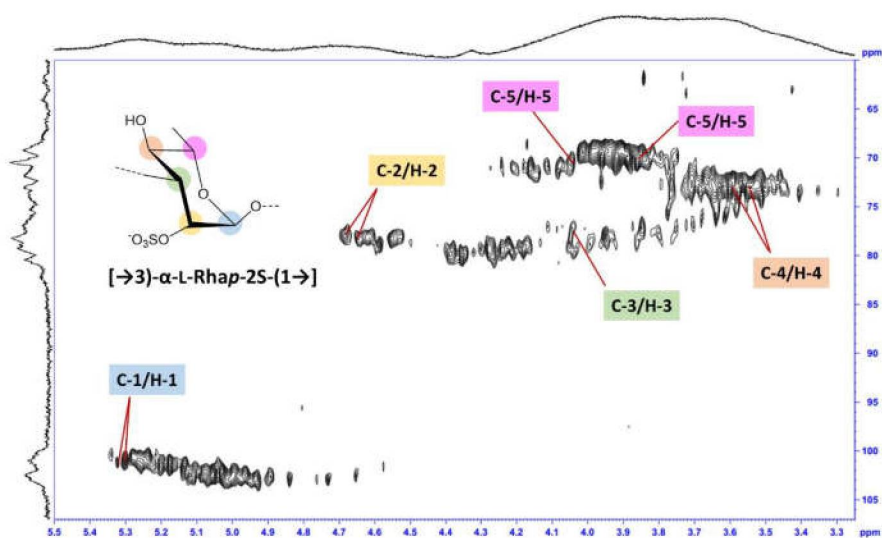
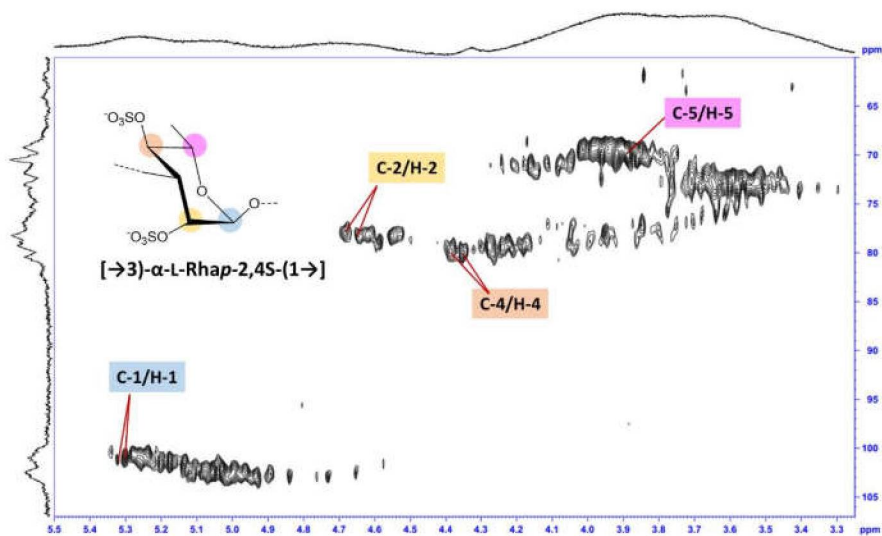
shift	atom index	coupling partner.	constant and vector
-------	------------	-------------------	---------------------

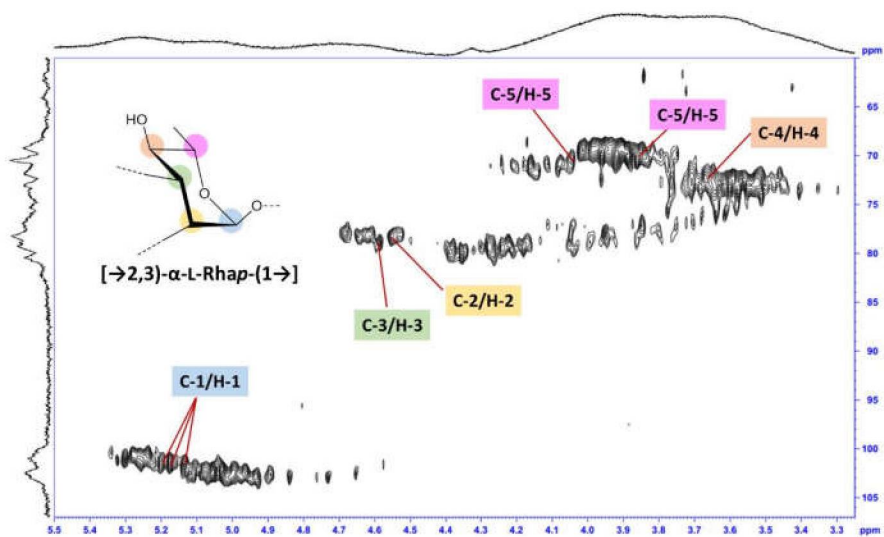
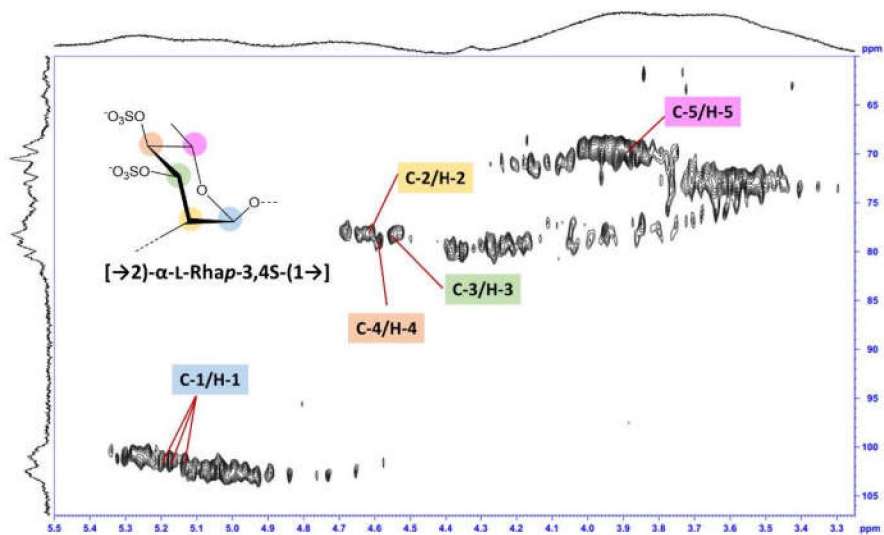
2,0	15		
5,11	20		
4,94	3	8 7,0	H-C-C-H
3,91	1	2 7,0	H-C-C-H
		9 6,8	H-C-CH2-H
5,21	2	1 7,0	H-C-C-H
		7 7,0	H-C-C-H
3,08	7	2 7,0	H-C-C-H
		8 7,0	H-C-C-H
2,23	8	3 7,0	H-C-C-H
		7 7,0	H-C-C-H
		6 7,0	H-C-CH-H
3,37	12	13 7,1	H-CH-CH-H
3,50	16		
2,55	14	13 7,1	H-CH-CH-H
2,55	17	18 7,1	H-CH-CH-H
2,65	19	18 7,1	H-CH-CH-H
1,55	6	8 7,0	H-CH-C-H
		10 8,0	H-CH-CH2-H
1,18	9	1 6,8	H-CH2-C-H
1,58	13	12 7,1	H-CH-CH-H
		14 7,1	H-CH-CH-H
1,72	18	17 7,1	H-CH-CH-H
		19 7,1	H-CH-CH-H
0,90	10	6 8,0	H-CH2-CH-H

ANEXO II – Espectro de HSQC de GBR1 com assinalamentos das unidades de α -L-Rhap

Solvente: D₂O. 70°C. Acetona como padrão interno: 31,45/2,225 ppm.







ANEXO III – Espectro de HSQC de GBR-S com assinalamentos das unidades de α -L-Rhap

Solvente: D₂O. 70°C. Acetona como padrão interno: 31,45/2,225 ppm.

