PAULA CRISTINA DE SOUSA FARIA-TISCHER



Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Eugênia Duarte Noseda

Co-orientador: Prof. Dr. Miguel Daniel Noseda

CURITIBA 2006

PAULA CRISTINA DE SOUSA FARIA-TISCHER

ESTRUTURA QUÍMICA, PROPRIEDADES REOLÓGICAS E ATIVIDADE ANTIVIRAL DAS GALACTANAS SULFATADAS DAS ALGAS VERMELHAS Meristiella gelidium e Gymnogongrus griffithsiae (GIGARTINALES)

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Eugênia Duarte Noseda

Co-orientador: Prof. Dr. Miguel Daniel

Noseda

CURITIBA 2006

Dedico esta tese à minha família, ao meu marido e aos amigos que conquistei nesta jornada.

Quando achamos que sabemos as respostas a vida muda as perguntas.

Esse é o desafio da vida e da pesquisa.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela oportunidade de estudar, me graduar e ainda estar no seleto grupo de pessoas que têm uma pós-graduação. Mas acima de tudo pela saúde física e mental para saber aproveitar todas as boas oportunidades que a vida gentilmente me oferece.

À Prof^a. Maria Eugênia D. Noseda que acompanhou a minha caminhada no mestrado e no doutorado, me apresentou a Química de Carboidratos das Algas Vermelhas, me orientou e me ajudou a crescer muito em todos esses anos. Muito Obrigada!

Ao Prof. Miguel D. Noseda, que me apresentou as carragenanas e me despertou para as propriedades e peculiaridades desses polissacarídeos. Obrigada pela orientação!

À Prof^a Maria Rita Sierakowski que tornou possível a minha iniciação no estudo das propriedades reológicas de biopolímeros. Obrigada pela orientação, disposição e por acreditar em mim e no trabalho.

Ao Prof. Phillip Gorin e Prof^a Carmem Petkowicz pela disponibilidade e correção da tese na banca interna.

Às Prof^{as} Tânia Bresolin, Sandra Barreira, Maria de Lurdes da Silva e Carmem Petkowicz, pela presença na banca e pela valiosa avaliação da tese.

Aos meus maiores e melhores orientadores na vida, meu pai Arnaldo Faria e a minha mãe Ana Paula F. S. e Sousa Faria, pelo amor incondicional, pelo apoio quando eu me sentia perdida e acima de tudo pela formação do meu caráter. Vocês iluminam meu caminho. Muito Obrigada!!!!!!!

À minha querida irmã Raquel de Sousa Faria Pavan, sua força, alegria, energia, carinho e amizade são indispensáveis. Muito Obrigada!! Você é muito especial!! E a você, Flávio, por sempre torcer muito por mim. Obrigada!

Ao meu marido e companheiro, Cesar Augusto Tischer, melhor presente que a vida poderia me dar. Obrigada por ser persistente. Você trouxe para a minha vida, serenidade, aconchego, otimismo e paz. Te amo!!

À Caroline G. Mellinger, exemplo de força, garra e humanidade. Obrigada pelo estimulo e carinho sempre que precisei. Tínhamos que fazer pósgraduação para nos tornarmos amigas.

À Rosiane G. M. Zibetti, pelo companheirismo, carinho, troca de experiências e principalmente pela amizade.

Ao Adriano (Dridri), sua alegria e entusiasmo eu não vou esquecer.

Aos colegas de turma de mestrado, Alan e Sérgio, pelos bons momentos de convívio e conversas.

À Juliana (Juju), Diogo (Dioguito), Luciana (Lulu), Marco (Marquito), obrigada pelo companheirismo, amizade, por fecharem a coluna, e por me esperarem para ir almocar quando eu só tinha que colocar uma diálise. Sinto saudade!!!

Marquito, obrigada por colocar Enya no final do dia de trabalho!

À Ana Helena, obrigada pelas ótimas conversas, risos e acima de tudo pela amizade. Gosto muito de você!

À Elaine que não me cumprimentava, mas que no final do doutorado até me deu um abraço. Que bom que você deixou eu te conhecer. Obrigada pela ajuda e conversas científicas. Gosto muito de você e saiba que sou sua amiga!!

À Fernanda (Fefer), Ricardo W., ao Thales, obrigada pelo carinho que vocês sempre me deram. Fefer, obrigada pela sua amizade demonstrada de várias formas, entre elas por ter ido ao meu chá de panela.

Ao Renato e Mariana, pela amizade, pelos ótimos passeios e por me ajudarem de maneira muito especial antes do seminário de tese. Vocês são grandes amigos!

À Cris, Fran, Charles, Tati, Neoli, do laboratório de Biopolímeros, obrigada por me adotarem e me receberem com tanto carinho. Sempre lembrarei de vocês.

De maneira muito especial, agradeço a grande amiga Lucy Ono, que me acompanhou desde qualificação. Sua amizade é especial!! Obrigada pela força!!

À Andréia, Rosane e Lauro pelas análises de GPC, GC e GC-MS. Obrigada! Andréia obrigada pelas conversas e leitura das cartas, lembra?!

À D. Marilza, aos funcionários do departamento, as bibliotecárias pela colaboração.

Obrigada!

A todas as pessoas que direta ou indiretamente participaram e participam da minha vida e contribuíram para a conclusão desta tese e desta etapa na minha vida.

Obrigada!!!!!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	
LISTA DE TABELAS	
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	
RESUMO	
ABSTRACT	
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. ALGAS VERMELHAS	
1.2. GALACTANAS: ESTRUTURA GERAL	2
1.2.1. CARRAGENANAS	4
1.2.2. AGARANAS	7
1.2.3. GALACTANAS DL-HÍBRIDAS	8
1.3. CICLO DE VIDA E REPRODUÇÃO DAS ALGAS VERMELHAS	10
1.4. ORDEM GIGARTINALES: VARIABILIDADE ESTRUTURAL DAS	
GALACTANAS E SIGNIFICADO QUIMIOTAXONÔMICO	11
1.4.1. FAMÍLIA PHYLLOPHORACEAE	16
1.4.2. FAMÍLIA SOLIERIACEAE	20
1.5. APLICAÇÃO INDUSTRIAL DAS GALACTANAS SULFATADAS	23
1.5.1. FORMAÇÃO DE GEL, FONTES E PROCESSAMENTO DAS	
CARRAGENANAS	27
1.5.2. INFLUÊNCIA DOS SAIS NO PROCESSO DE GELEIFICAÇÃO E	
INTERAÇÃO COM AMIDO	34
1.6. REOLOGIA: HISTÓRICO E ASPECTOS TEÓRICOS	40
1.7. GALACTANAS SULFATADAS COMO COMPOSTOS	
BIOLOGICAMENTE ATIVOS: ATIVIDADE ANTIVIRAL	48
2.0. OBJETIVOS	56
2.1. OBJETIVO GERAL	56

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	56
3.0. MATERIAL E MÉTODOS	57
3.1. ESPÉCIES ESTUDADAS E SEUS POSICIONAMENTOS	
SISTEMÁTICOS	57
3.2. COLETA E PROCESSAMENTO	57
3.3. EXTRAÇÃO DAS GALACTANAS DE Meristiella gelidium E	
Gymnogongrus griffithsiae	58
3.4. FRACIONAMENTO E CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL	59
3.4.1. MÉTODOS ANALÍTICOS GERAIS	59
3.4.2. PRECIPITAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS COM KCI	60
3.4.3. PURIFICAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS DE <i>M. gelidium</i> POR	
CROMATOGRAFIA DE TROCA-IÔNICA	60
3.4.4. HIDRÓLISE ÁCIDA TOTAL DO TIPO HIDRÓLISE REDUTIVA	61
3.4.5. HIDRÓLISE ÁCIDA TOTAL	61
3.4.6. METILAÇÃO	62
3.4.7. MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS	62
3.4.7.1. CROMATOGRAFIA LÍQUIDO-GASOSA (GLC)	62
3.4.7.2.CROMATOGRAFIA LÍQUIDO-GASOSA ACOPLADA À	
ESPECTROMETRIA DE MASSA (GC-MS)	63
3.4.7.3. CROMATOGRAFIA DE GEL PERMEAÇÃO (HPSEC-MALLS) -	
ANÁLISE DE HOMOGENEIDADE E MASSA MOLECULAR	63
3.4.8. DESSULFATAÇÃO POR TRATAMENTO SOLVOLÍTICO	64
3.4.8.1. PREPARO DO SAL DE PIRIDÔNIO	64
3.4.8.2. SOLVÓLISE	65
3.4.9. TRATAMENTO ALCALINO	65

3.4.10. MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS	66
3.4.10.1. RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR	66
3.4.10.2. ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO POR	
, ,	66
3.5. ANÁLISES REOLÓGICAS	66
3.5.1. PREPARO DAS GALACTANAS SULFATADAS	67
3.5.2. PREPARO DOS AMIDOS	67
3.5.3. PREPARO DAS MISTURAS DE POLISSACARÍDEOS	67
3.5.4. ANÁLISES EM SISTEMA DINÂMICO	68
3.5.5. DETERMINAÇÃO DO COMPORTAMENTO VISCOELÁSTICO	
LINEAR	68
3.5.6. VARREDURA DE FREQÜÊNCIA EM SISTEMA VISCOELÁSTICO	
LINEAR	69
3.5.7. VARREDURA DE TEMPERATURA	69
3.5.8. TESTE DE INCHAMENTO DO GEL – SWEELLING	69
3.6. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIHERPÉTICA E	
ANTIDENGUE DAS GALACTANAS DE M. gelidium e G. griffithsiae	70
3.6.1. CÉLULAS UTILIZADAS	70
3.6.2. VÍRUS UTILIZADOS	71
3.6.3. POLISSACARÍDEOS DE <i>M. gelidium</i> E <i>G. griffithsiae</i>	
UTILIZADOS NA AVALIAÇÃO ANTIVIRAL	71
3.6.4. ENSAIO CITOTÓXICO	72
3.6.5. FORMAÇÃO DE PLACAS EM CÉLULAS Vero	72
3.6.6. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL in vitro	73
3.6.7. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE VIRUCIDA in vitro	74
3.6.8. DETERMINAÇÃO DO TEMPO DE ADIÇÃO DAS FRAÇÕES	
-	
POLISSACARÍDICAS	75

3.6.10. ENSAIO DE INTERNALIZAÇÃO VIRAL	75
4.1. RESULTADOS E DISCUSSÃO	77
4.1.1. ANÁLISES ESTRUTURAIS DOS POLISSACARÍDEOS DA ALGA	
Meristiella gelidium (J. Agardh)	77
4.1.2. ANÁLISES REOLÓGICAS DAS GALACTANAS DE Meristiella	
gelidiumgelidium	112
4.1.3. ANÁLISES REOLÓGICAS DOS AMIDOS E DAS MISTURAS COM	
ι-CAR	117
4.1.4. ATIVIDADE ANTIVIRAL DAS GALACTANAS SULFATADAS	146
4.1.5. ATIVIDADE ANTIHERPÉTICA E ANTIDENGUE DAS	
GALACTANAS DE G. griffithsiae	146
4.1.6. ATIVIDADE ANTIHERPÉTICA E ANTIDENGUE DAS	
GALACTANAS DE M. gelidium E COMPARAÇÃO COM AS	
GALACTANAS DE G. griffithsiae,	160
5.0. CONCLUSÕES	163
6.0. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	166
ANEXOS	

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. ESTRUTURA BÁSICA REPETITIVA DE CARRAGENANAS,	
(UNIDADES D- ALTERNANTES)	4
FIGURA 2. ESTRUTURA BÁSICA REPETITIVA DE AGARANAS	
(UNIDADES D- E L- ALTERNANTES)	7
FIGURA 3. ESTRUTURAS IDEAIS REPETITIVAS DA (A) (NU-	
CARRAGENANA), CONFORMAÇÃO 4C1 E DA (B) (IOTA-	
CARRAGENANA), CONFORMAÇÃO ¹ C ₄	28
FIGURA 4. FORMAÇÃO DE GEL EM CARRAGENANAS	35
FIGURA 5: ESCOAMENTO DE FLUÍDO EM REGIME LAMINAR	42
FIGURA 6. FOTO DA ALGA Meristiella gelidium (J. Agardh)	77
FIGURA 7. FLUXOGRAMA DE EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS	
DA ALGA VERMELHA Meristiella gelidium	78
FIGURA 8. ESPECTRO DE RMN DE ¹³ C DA FRAÇÃO M5 DE M.	
gelidium	81
FIGURA 9. ESPECTROS DE RMN DE ¹³ C DAS FRAÇÕES BRUTAS M1	
(A), M2 (B) E M3 (C) DE M. gelidium	83
FIGURA 10. ESPECTROS DE INFRAVERMELHO DAS FRAÇÕES	
BRUTAS (M1-M5) EXTRAÍDAS DE ALGA VERMELHA M. gelidium	84
FIGURA 11. ANÁLISES DE HOMOGENEIDADE DAS FRAÇÕES M1 (A)	
e M3 (B) POR CROMATOGRAFIA DE GEL PERMEAÇÃO (HPSEC-	
MALLS)	85
FIGURA 12. FLUXOGRAMA (A) FRACIONAMENTO COM KCI; (B)	
PURIFICAÇÃO POR CROMOTOGRAFIA DE TROCA IÔNICA DAS	
FRAÇÕES DE M. gelidium	86
FIGURA 13. ANÁLISE DE HOMOGENEIDADE DA SUBFRAÇÃO M3a	
HPSEC-MALLS	90

FIGURA 14. ANÁLISE DE HOMOGENEIDADE DA SUBFRAÇÃO M3S	
POR CROMATOGRAFIA DE GEL PERMEAÇÃO (HPSEC)	96
FIGURA 15. ESPECTRO DE RMN DE ¹³ C DA FRAÇÃO M3S SOLÚVEL	
EM KCI 2M DE M. gelidium	97
FIGURA 16. ESPECTRO DE RMN DE ¹³ C (A) FRAÇÃO NATIVA M3S-3 E	
(B) FRAÇÃO DESSULFATADA M3S-3D	103
FIGURA 17. ESPECTROS DE RMN DE ¹³ C (A) FRAÇÃO NATIVA M3S-4	
E (B) FRAÇÃO DESSULFATADA M3S-4D E ANÁLISE DE DEPT	107
FIGURA 18. PRINCIPAIS UNIDADES MONOSSACARÍDICAS	
PRESENTES NAS AGARANAS M3S-3 E M3S-4	111
FIGURA 19. ESTRUTURA REPETITIVA DA IOTA-CARRAGENANA	112
FIGURA 20. REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA REGIÃO	
DECOMPORTAMENTO VISCOELÁSTICO LINEAR PARA A FRAÇÃO	
M1 (10 g/L) EM PRESENÇA DE 120Mm de KCI. (A) FREQUÊNCIA DE	
0,01 Hz E (B) FREQUÊNCIA DE 10 Hz, TEMPERATURA DE 25 °C	113
FIGURA 21. MÓDULO ELÁSTICO (G'), MÓDULO VISCOSO (G") EM	
FUNÇÃO DA FREQUÊNCIA (A) FRAÇÃO M1 (10g/L) EM PRESENÇA	
DE KCI 120 mM; (B) FRAÇÃO M3a (10g/L) EM PRESENÇA DE KCI 120	
mM. SENSOR C60/2°C, DEFORMAÇÃO DE 1%, A 25°C	114
FIGURA 22. MÓDULO ELÁSTICO (G'), MÓDULO VISCOSO (G") EM	
FUNÇÃO DA TEMPERATURA ($ ightarrow$ AQUECIMENTO DE 5 - 85 °C E	
RESFRIAMENTO DE 85 - 5 °C). (A) FRAÇÃO M1 (10 g/L) EM	
PRESENÇA DE KCI 120 mM; (B) FRAÇÃO M3a (10 g/L) EM	
PRESENÇA DE KCI 120mM. SENSOR C-60/2°, EM FREQUÊNCIA DE 1	
Hz E DEFORMAÇÃO DE 1%	116
FIGURA 23. REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA REGIÃO	
DECOMPORTAMENTO VISCOELÁSTICO LINEAR PARA O AMIDO DE	
MILHO COMUM (CS) (25 g/L). (A) FREQUÊNCIA DE 0,01 Hz E (B)	
FREQUÊNCIA DE 10 Hz, TEMPERATURA DE 25 °C	119

FIGURA 24. REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA REGIÃO DE	
COMPORTAMENTO VISCOELÁSTICO LINEAR PARA O AMIDO DE	
MILHO COM ALTOS TEORES DE AMILOSE (MS) (25 g/L). (A)	
FREQUÊNCIA DE 0,01 Hz E (B) FREQUÊNCIA DE 10 Hz,	
TEMPERATURA DE 25 °C	119
FIGURA 25. REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA REGIÃO DE	
COMPORTAMENTO VISCOELÁSTICO LINEAR PARA O AMIDO DE	
MILHO COM ALTOS TEORES DE AMILOPECTINA (WS) (25 g/L). (A)	
FREQUÊNCIA DE 0,01 Hz E (B) FREQUÊNCIA DE 10 Hz,	
TEMPERATURA DE 25 °C	120
FIGURA 26. REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA REGIÃO DE	
COMPORTAMENTO VISCOELÁSTICO LINEAR PARA O AMIDO DE	
CARÁ (YS) (25 g/L). (A) FREQUÊNCIA DE 0,01 Hz E (B) FREQUÊNCIA	
DE 10 Hz, TEMPERATURA DE 25 °C	120
FIGURA 27.REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA REGIÃO DE	
COMPORTAMENTO VISCOELÁSTICO LINEAR PARA A MISTURA	
AMIDO DE CARÁ (20 g/L) $- \iota$ -CAR (5 g/L). (A) FREQUÊNCIA DE 0,01	
Hz E (B) FREQUÊNCIA DE 10 Hz, TEMPERATURA DE	
25 °C	121
FIGURA 28. MÓDULO ELÁSTICO (G'), MÓDULO VISCOSO (G'') EM	
FUNÇÃO DA FREQUÊNCIA PARA (A) CS (25 g/L) E (B) MISTURA ι -	
CAR (5 g/L)-CS (20 g/L), SENSOR , pp35/Ti, DEFORMAÇÃO DE 1%, A	
25 °C	122
FIGURA 29. MÓDULO ELÁSTICO (G'), MÓDULO VISCOSO (G'') EM	
FUNÇÃO DA FREQUÊNCIA PARA (A) MS (25 g/L) E (B) MISTURA 1-	
CAR (5 g/L)-MS (20 g/L), SENSOR pp35/Ti, DEFORMAÇÃO DE 1%, A	
25 °C	122

FIGURA 30. MÓDULO ELÁSTICO (G'), MÓDULO VISCOSO (G") EM	
FUNÇÃO DA FREQUÊNCIA PARA (A) WS (25g/L) E (B) MISTURA ι -	
CAR (5 g/L)-WS (20 g/L), SENSOR pp35/Ti, DEFORMAÇÃO DE 1%, A	
25 °C	123
FIGURA 31. MÓDULO ELÁSTICO (G'), MÓDULO VISCOSO (G") EM	
FUNÇÃO DA FREQUÊNCIA PARA (A) YS (25 g/L) E (B) MISTURA ι-	
CAR (5 g/L)-YS (20 g/L), SENSOR C60/2° Ti, DEFORMAÇÃO DE 1%, A	
25 °C	124
FIGURA 32. GRÁFICO DE Tan δ EM FUNÇÃO DA FREQUENCIA PARA	
(A) YS (25 g/L) e (B) MISTURA 1-CAR (5 g/L) – YS (20 g/L)	125
FIGURA 33. MÓDULO ELÁSTICO (G'), MÓDULO VISCOSO (G") EM	
FUNÇÃO DA TEMPERATURA PARA (A) MS (25 g/L) E (B) MISTURA ι -	
CAR (5 g/L) – MS (20 g/L). SENSOR pp35/Ti, FREQUÊNCIA DE 1 Hz E	
DEFORMAÇÃO DE 1%. (→ AQUECIMENTO DE 5-85 °C E	
RESFRIAMENTO DE 85-5 °C)	126
FIGURA 34. MÓDULO ELÁSTICO (G'), MÓDULO VISCOSO (G") EM	
FUNÇÃO DA TEMPERATURA PARA (A) CS (25 g/L) E (B) 1-CAR (5 g/L)	
- CS (20 g/L). SENSOR pp35/Ti, FREQUÊNCIA DE 1 Hz E	
DEFORMAÇÃO DE 1%. (→ AQUECIMENTO DE 5-85 °C E	
RESFRIAMENTO DE 85-5 °C)	127
FIGURA 35. MÓDULO ELÁSTICO (G'), MÓDULO VISCOSO (G") EM	
FUNÇÃO DA TEMPERATURA PARA (A) WS (25 g/L) E (B) MISTURA ι -	
CAR (5g/L) – WS (20 g/L). SENSOR pp35/Ti, FREQUÊNCIA DE 1 Hz E	
DEFORMAÇÃO DE 1%. ($ ightarrow$ AQUECIMENTO DE 5-85°C E	
RESFRIAMENTO DE 85-5°C)	128

FIGURA 36. MÓDULO ELÁSTICO (G´), MÓDULO VISCOSO (G´´) EM	
FUNÇÃO DA TEMPERATURA PARA (A) YS (25 g/L) E (B) MISTURA ι -	
CAR (5 g/L) – YS (20 g/L). SENSOR C60/2° Ti, EM FREQUÊNCIA DE 1	
Hz E DEFORMAÇÃO DE 1%. (→ AQUECIMENTO DE 5-85 °C E	
RESFRIAMENTO DE 85-5°C)	130
FIGURA 37. MÓDULO ELÁSTICO (G'), MÓDULO VISCOSO (G") EM	
FUNÇÃO DA FREQUÊNCIA PARA (A) MISTURA 1-CAR (5 g.L ¹) – YS	
(20 g.L 1), 1-CAR NÃO AUTOCLAVADA E (B) MISTURA 1-CAR (5 g.L 1) –	
YS (20 g.L1), 1-CAR AUTOCLAVADA SEPARADO. SENSOR pp35/Ti,	
DEFORMAÇÃO DE 1%, A 25 °C	133
FIGURA 38. MÓDULO ELÁSTICO (G'), MÓDULO VISCOSO (G") EM	
FUNÇÃO DA TEMPERATURA PARA (A) MISTURA ι-CAR (5 g/L) – YS	
(20 g/L), ι-CAR NÃO AUTOCLAVADA E (B) MISTURA ι-CAR (5 g/L) -	
YS (20 g/L), 1-CAR AUTOCLAVADA SEPARADO. SENSOR pp35/Ti,	
DEFORMAÇÃO DE 1%, A 25°C	134
FIGURA 39. SISTEMAS PRÉ-AQUECIDOS A 85°C. MÓDULO	
ELÁSTICO (G'), MÓDULO VISCOSO (G") EM FUNÇÃO DA	
FREQUÊNCIA PARA (A) YS (25 g/L) E (B) MISTURA 1-CAR (5 g/L) – YS	
(20 g/L) COM PRÉ-AQUECIMENTO. SENSOR pp35/Ti, DEFORMAÇÃO	
DE 1%, A 25 °C	135
FIGURA 40. SISTEMAS PRÉ-AQUECIDOS A 85°C. MÓDULO	
ELÁSTICO (G'), MÓDULO VISCOSO (G") EM FUNÇÃO DA	
TEMPERATURA PARA (A) YS (25 g/L) E (B) MISTURA 1-CAR (5 g/L) -	
YS (20 g/L) COM PRÉ-AQUECIMENTO. SENSOR pp35/Ti, EM	
FREQUÊNCIA DE 1 Hz E DEFORMAÇÃO DE 1%. (→ AQUECIMENTO	
DE 5-85 °C E RESFRIAMENTO DE 85-5 °C)	137

FIGURA 41. VISCOSIDADE DINÂMICA DAS AMOSTRAS DE (A)	
MISTURA ι-CAR-YS, SEM PRÉ-AQUECIMENTO (B) MISTURA ι-CAR-	
YS, PRÉ-AQUECIDA (C) YS, SEM PRÉ-AQUECIMENTO E (D) YS, PRÉ-	
AQUECIDO. SENSOR pp 35.Ti, EM FREQUÊNCIA DE 1 Hz E	
DEFORMAÇÃO DE 1%	138
FIGURA 42. COX-MERZ DO (A) YS (25 g/L) E (B) ι-CAR (5 g/L) – YS (20	
g/L) (■) VISCOSIDADE COMPLEXA, (○) VISCOSIDADE APARENTE	139
FIGURA 43. MÓDULO ELÁSTICO (G'), MÓDULO VISCOSO (G") EM	
FUNÇÃO DA FREQUÊNCIA PARA MISTURA 1-CAR (5 g.L1) - YS (20	
g.L ¹) SEM PRÉ-AQUECIMENTO (A) SEM SAL (KCI 120 mM) (B) COM	
SAL (KCI 120 mM) SENSOR pp35/Ti, DEFORMAÇÃO DE 1%, A 25 °C	141
FIGURA 44. GRÁFICO DE Tan δ EM FUNÇÃO DA FREQUÊNCIA PARA	
(A) MISTURA 1-CAR (5 g/L) - YS (20 g/L), (A) SEM SAL, (B) COM SAL	
(KCI 120mM)	141
FIGURA 45. MÓDULO ELÁSTICO (G'), MÓDULO VISCOSO (G") EM	
FUNÇÃO DA TEMPERATURA PARA ι-CAR (5 g.L ¹) – YS (20 g.L ¹) SEM	
PRÉ-AQUECIMENTO (A) SEM SAL (KCI 120 mM) (B) COM SAL (KCI	
120 mM) SENSOR pp35/Ti, DEFORMAÇÃO DE 1%, A 25 °C	142
FIGURA 46. MÓDULO ELÁSTICO (G'), MÓDULO VISCOSO (G") EM	
FUNÇÃO DA FREQUÊNCIA PARA 1-CAR (5 g.L ¹) – YS (20 g.L ¹) COM	
PRÉ-AQUECIMENTO (A) SEM SAL (KCI 120 mM) (B) COM SAL (KCI	
120 mM) SENSOR pp35/Ti, DEFORMAÇÃO DE 1%, A 25 °C	143
FIGURA 47. MÓDULO ELÁSTICO (G'), MÓDULO VISCOSO (G") EM	
FUNÇÃO DA TEMPERATURA PARA A MISTURA ι-CAR (5 g.L ¹) – YS	
(20 g.L ¹) COM PRÉ-AQUECIMENTO (A) SEM SAL, (B) COM SAL (KCI	
120 mM) SENSOR pp35/Ti, DEFORMAÇÃO DE 1%, A 25 °C	144
, 11 , 3 ,	

FIGURA 48. FLUXOGRAMA (A) EXTRAÇÃO; (B) FRACIONAMENTO		
COM KCI E (C) PURIFICAÇÃO POR CROMATOGRAFIA DE TROCA		
IÔNICA DAS GALACTANAS DE G. griffithisiae	147	
FIGURA 49. (A) ESTRUTURA DA MÍNIMA SEQÜÊNCIA DE LIGAÇÃO		
DO HEPARAN SULFATO. (B) MÍNIMA ESTRUTURA DE LIGAÇÃO DA		
AGARANA DE <i>A. spicifera</i>	153	

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. CLASSIFICAÇÃO DAS CARRAGENANAS DE ACORDO	
COM ESTRUTURAS IDEAIS DE UNIDADES A E B	6
TABELA 2. PROPRIEDADES IMPORTANTES E APLICAÇÕES DAS	
AGARANAS	24
TABELA 3. APLICAÇÃO, FUNÇÃO E CONCENTRAÇÃO DAS	
CARRAGENANAS EM DIFERENTES PREPARAÇÕES	26
TABELA 4. ALGAS, LOCALIZAÇÃO E COMPOSIÇÃO EM	
CARRAGENANAS	31
TABELA 5. PROCESSAMENTO DE CARRAGENANAS. CAPACIDADE	
EM TONELADAS, DADOS DE 2001	33
TABELA 6. SOLUBILIDADE E CAPACIDADE DE GELEIFICAÇÃO DE	
DIFERENTES CARRAGENANAS	36
TABELA 7. ATIVIDADE ANTIVIRAL DE POLISSACARÍDEOS	
SULFATADOS OBTIDOS DE ALGAS VERMELHAS	53
TABELA 8. RENDIMENTO E ANÁLISE QUÍMICA DAS FRAÇÕES	
BRUTAS EXTRAÍDAS DA ALGA VERMELHA Meristiella gelidium	79
TABELA 9. COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES	
BRUTAS OBTIDAS DA ALGA VERMELHA Meristiella gelidium	80
TABELA 10. FAIXA DE FRACIONAMENTO, RENDIMENTO E	
ANÁLISES QUÍMICAS DAS SUBFRAÇÕES DE M1, M2 E M3 OBTIDAS	
APÓS FRACIONAMENTO COM KCI	87
TABELA 11. COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS SUBFRAÇÕES	
OBTIDAS APÓS FRACIONAMENTO COM KCI E TRATAMENTO	
ALCALINO	91
TABELA 12. ASSINALAMENTOS DAS PRINCIPAIS DÍADES	
PRESENTES NAS FRAÇÕES M1a, M2b e M3a OBTIDAS ATRAVÉS	
FRACIONAMENTO COM KCI DE M. gelidium	92

95
98
99
101
106
109
118
150
154
155
157
158
161

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

¹³**C** – carbono 13

GLC – cromatografia líquida-gasosa

GC-MS – cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa

D₂**O** – água deuterada

DEAE – dietilaminoetil

DMSO – dimetil sulfóxido

FT-IR – espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier

HPSEC- MALLS – cromatografia de exclusão estérica de alta pressão (HPSEC) acoplada a detector de índice de refração diferencial e espalhamento de luz em multiângulos (MALLS)

Hz – hertz

ppm – partes por milhão

RMN – ressonância magnética nuclear

TFA – ácido trifluoracético

Galp – unidade de galactose na forma piranosídica

NaNO₂ – nitrito de sódio

NaNO₃ – nitrato de sódio

NaN₃ – azida de sódio

G' – modulo elástico

G" - modulo viscoso

Tan δ – relação G"/G"

mPa – mili pascal

HS – heparan sulfato

PFU – unidades formadoras de placas

CC₅₀ – concentração citotóxica, ou concentração necessária para reduzir em 50% a viabilidade das células Vero após 48 horas de incubação com cada fração.

IC₅₀ – concentração inibitória, ou concentração que inibe em 50% o número de placas em células Vero

SI - índice de seletividade ou CC_{50}/IC_{50}

 VC_{50} – concentração virucida, ou concentração necessária para inativar os vírus em 50%.

p.i – pós infecção

MM – meio de manutenção

MEM – meio essencial de Eagle

HPLC – cromatografia líquido-gasosa

DEAE – dietilaminoetil

HPSEC-MALLS – cromatografia de exclusão estérica de alta pressão (hpsec) acoplada a detector de índice de refração diferencial e espalhamento de luz em multiângulos (malls)

M – extrato polissacarídico obtido por extração aguosa da alga *Meristiela gellidum*

M1 – fração obtida a partir da primeira extração aquosa a 25°C

M2 – fração obtida a partir da segunda extração aquosa a 25°C

M3 – fração obtida a partir da primeira extração aquosa a 100°C

M4 – fração obtida a partir da segunda extração aquosa a 100°C

M5 – fração obtida a partir da terceira extração aquosa a 100°C

M1a − fração precipitada entre 1,4 − 1,5 M de KCl obtida a partir de M1

M1a-T – fração M1a após tratamento alcalino

M2a − fração precipitada entre 0,1 − 0,2 M de KCl obtida a partir de M2

M2b − fração precipitada entre 1,0 − 1,2 M de KCl obtida a partir de M2

M3a − fração precipitada entre 0,75 − 1,0 M de KCl obtida a partir de M3

M3a-T – fração M3a após tratamento alcalino

M1S – fração solúvel em KCl 2,0 M obtida da fração M1

M2S – fração solúvel em KCl 2,0 M obtida da fração M2

M3S – fração solúvel em KCl 2,0 M obtida da fração M3

M3S-1 – fração eluída com água mediante cromatografia em DEAE-Sephacel da fração M3S

M3S-2 – fração eluída com NaCl 0,4 M mediante cromatografia em DEAE-Sephacel fração M3S

- M3S-3 fração eluída com NaCl 0,6 M mediante cromatografia em DEAE-Sephacel fração M3S
- M3S-4 fração eluída com NaCl 0,8 M mediante cromatografia em DEAE-Sephacel fração M3S
- M3S-5 fração eluída com NaCl 1,0 M mediante cromatografia em DEAE-Sephacel fração M3S
- M3S-6 fração eluída com NaCl 2,0 M mediante cromatografia em DEAE-Sephacel fração M3S
- **G** extrato polissacarídico obtido por extração aquosa da alga *Gymnogongrus* griffithsiae
- G1 fração obtida a partir da primeira extração aquosa a 25°C
- G2 fração obtida a partir da segunda extração aquosa a 25°C
- G3 fração obtida a partir da primeira extração aquosa a 100°C
- G3a fração precipitada entre 0,0 -0,1 M de KCl obtida a partir de G3
- **G3b** fração precipitada entre 0,2 0,3 M de KCl obtida a partir de G3
- **G3c** fração precipitada entre 0,75 1,0 M de KCl obtida a partir de G3
- G3d − fração precipitada entre 1,0 − 1,2 M de KCl obtida a partir de G3
- G3S fração solúvel em KCl 2,0 M obtida a partir de G3
- G3S-1 fração eluída com água mediante cromatografia em DEAE-Sephacel da fração G3S
- G3S-2 fração eluída com NaCl 0,25 M mediante cromatografia em DEAE-Sephacel da fração G3S
- G3S-3 fração eluída com NaCl 0,5 M mediante cromatografia em DEAE-Sephacel da fração G3S
- G3S-4 fração eluída com NaCl 0,75M mediante cromatografia em DEAE-Sephacel da fração G3S
- G3S-5 fração eluída com NaCl 1,0 M mediante cromatografia em DEAE-Sephacel da fração G3S
- G3S-6 fração eluída com NaCl 2,0 M mediante cromatografia em DEAE-Sephacel da fração G3S

G3S-7 – fração eluída com NaCl 4,0 M mediante cromatografia em DEAE-Sephacel da fração G3S

YS – amido de Cará

MS – amido de milho com altos teores de amilose

CS – amido de milho comum

WS – amido de milho com altos teores de amilopectina

ι-CAR – iota-carragenana (extrato bruto M1)

RESUMO

Da alga vermelha Meristiella gelidium (Solieriaceae, Gigartinales) foram obtidas as carragenanas homogêneas M1a (Mw = 425.600 g/mol), M2b (Mw = 950.800 g/mol) e M3a (Mw = 956.700 g/mol) por extração aquosa a 25°C e a 100°C e fracionamento com KCl. Essas carragenanas sulfatadas (24,0; 25,0; 29,0%, respectivamente) são constituídas majoritariamente por unidades dissacarídicas repetitivas de iota-carragenana (β-D-galactose 4-O-sulfato e 3,6anidro-α-D-galactose 2-sulfato), correspondendo a 84,0% do polímero. Díades de kappa- (β -D-galactose 4-O-sulfato e 3,6-anidro- α -D-galactose) e nu-carragenana (β-D-galactose 4-O-sulfato e α-D-galactose 2,6-sulfato), estão presentes em baixa percentagem 4,0 % e 6,0-8,0%, respectivamente. Além das carragenanas majoritárias essa espécie biossintetiza agaranas com características estruturais semelhantes, em relação ao padrão de sulfatação. A agarana M3S-3 (Mw = 187.000 g/mol) possui 40,0% das unidades A 2-O-sulfatadas e as unidades B são ~75,0% substituídas por grupos sulfato no C-3, as quais estão em parte substituídas em C-2 por unidades simples de xilose (~30,0%) ou grupos sulfato (~18,0%). Na agarana M3S-4 (Mw = 61.430 g/mol) as unidades A, ~60,0% são representadas por β -D-galactose 2-sulfato e ~75,0% das unidades B por α -Lgalactose 3-sulfato. Nessa galactana as unidades simples de xilose glicosilam o C-6 de parte das unidades A. A iota-carragenana presente no extrato bruto M1 (1,0%, 120 mM de KCI), forma gel sem histerese com temperatura de transição fita-hélice acima de 45 °C, característico dos géis de iota-carragenana. As misturas formadas pela iota-carragenana (0,5% p/p) e amidos (20,0% p/p) quando, autoclavadas juntas sem pré-aquecimento e sem sal, originam soluções viscoelásticas com os amidos de milho comum, amido de milho rico em amilose e amido de milho rico em amilopectina. De maneira distinta a iota-carragenana com o amido de cará forma um gel forte. Efeito sinérgico demonstrado pela maior diferença entre os módulos elástico (G') e viscoso (G") ocorre em função da temperatura, entre 45 - 85°C, nas pastas iota-carragenana e amido de milho comum, amido de milho rico em amilose e amido de milho rico em amilopectina. Na pasta formada com o amido de milho rico em amilose, a iota-carragenana evitou a histerese térmica. A presença do ficocolóide não alterou o comportamento do amido de milho comum e na pasta formada com o amido de cará a histerese não foi evitada. O processo de autoclavação dos polímeros juntos é importante no que diz respeito à solubilização do amido, alterando a formação de gel. A pasta pré-aquecida (85°C) e sem sal, formada pela iota-carragenana e amido de cará origina um gel mais forte, porém com intensa histerese térmica. A presença de sal (KCl 120 mM) no sistema, estabiliza as hélices da carragenana formando uma rede mais estável e um gel sem histerese térmica. O sal evita a histerese, enquanto que o pré-aquecimento permite a formação de um gel mais forte, porém com intensa histerese térmica. Os extratos brutos M1 e M3 e a carragenana M3a de M. gelidium, assim como as frações obtidas de Gymnogongrus griffithsiae (Phyllophoraceae, Gigartinales) (G3, G3d, G3S, G3S-1, G3S-3, G3S-4, G3S-5 e G3S-6) possuem atividade antiviral contra o vírus da herpes simplex e/ou o vírus

da dengue. Esses polissacarídeos apresentam atividade antiherpética frente a diferentes cepas de HSV-1 e HSV-2, são desprovidas de citotoxicidade contra células Vero e atuam inibindo a etapa de adsorção do vírus à célula hospedeira. O extrato bruto G3 e a carragenana G3d de *G. griffithsiae* apresentam potente atividade antiherpética (IC $_{50}$ ~1 μ g/ml). A carragenana M3a de *M. gelidium* apresentou maior atividade contra HSV-2 e DENV-2 (frente à células Vero) do que a carragenana G3d de *G. griffithsiae*. As galactanas M1, M3 e M3a apresentam potente atividade contra HSV-2 (IC $_{50}$ 0,04 – 0,06 μ g/mL) e são desprovidas de atividade citotóxica (CC $_{50}$ > 1000 μ g/mL). A carragenana M3a é o composto que apresenta maior IS relatado na literatura (IS 25000). Assim as galactanas de *M. gelidum* são promissores compostos antiherpéticos e apresentam propriedades reológicas com potencial utilização industrial.

ABSTRACT

The carrageenans M1a (Mw = 425,600), M2b (Mw = 950,800) e M3a (Mw = 956,700) were obtained from the red seaweed Meristiella gelidium (Solieriaceae, Gigartinales) by successive aqueous extraction at 25°C and 100°C followed by KCI precipitation. These sulfated carrageenans (24.0; 25.0; 29.0%, respectively) are mainly constituted (84.0%) by repeating units of iota-carrageenan (β-D-galactose 4-O-sulfate and 3,6-anidro- α -D-galactose 2-sulfate). Kappa- (β -D-galactose 4-Osulfate and 3,6-anidro- α -D-galactose) and nu-carrageenan (β -D-galactose 4-Osulfate and α -D-galactose 2.6-sulfate) are present in low amounts of 4.0 % and 6.0-8.0%, respectively. In addition to carrageenans, this species biosynthesizes agarans, with similar structural characteristics of sulfatation distribution. The units A (3-O-substituted β -D-galactose) in the agaran M3S-3 (Mw = 187.000) are 40.0% 2-O-sulfated and the units B (4-O-substituted α -L-galactose) are ~75.0% 3-Osulfated. The B units are ~30.0% substituted at C-2 by xylose or sulfate (~18.0%). In the agaran M3S-4 (Mw = 61.430) the A units are \sim 60.0% β -D-galactose 2-sulfate and ~75.0% of it's B units are α -L-galactose 3-sulfato. A part of the A units are, substituted by xylose at C-6. The gel formed by iota-carrageenan present in the crude extract M1 (1.0%, 120 mM of KCI), did not showed hysteresis and its conformational coil-helix transition is upper 45 °C, characteristic of an iotacarrageenans's gel. lota-carrageenan (0.5% w/w) and starch (2.0% w/w) mixtures, when autoclaved together without pre-heating and salt, gave rase to viscoelastic solutions in systems with common corn starch, corn starch rich in amylose, and waxy corn starch components. In contrast the iota-carrageenan with yam starch formed a strong gel. In the range of temperature 45 – 85°C, a strong interaction between biopolymers was observed, reflected by a difference between the moduli elastic (G') and viscous (G") in the mixtures with common corn starch, corn starch rich in amylose and waxy corn starch. In the paste formed by corn starch rich in amylose, did not occur thermal hysteresis. The rheological characteristics of the paste formed with common corn starch were not modified by the presence of iotacarrageenan. A strong interaction between iota-carrageenan yam starch was observed when they were autoclaved together, as a gel was formed. When this system was pre-heated (85°C) without salt a stronger gel was formed but hysteresis was present. In contrast, when salt (KCl 120 mM) was present, the carrageenan helices were more stable and the water was retained. The salt in the system did not allow hysteresis and the pre-heating gave rase to a stronger gel, but with intense thermal hysteresis. The crude extracts M1, M3 and the carrageenan M3a from *M. gelidium* as with the fractions obtained from Gymnogongrus griffithsiae (Phyllophoraceae, Gigartinales) (G3, G3d, G3S, G3S-1, G3S-3, G3S-4, G3S-5 e G3S-6) had antiviral activity against herpes simplex and dengue viruses. These polysaccharides are effective against HSV-1 and HSV-2, were not cytotoxicy to Vero cells, and influence virion binding to the host cell. The crude extract G3 and the carrageenan G3d from G. griffithsiae had potent antiviral activity (IC₅₀ ~1 μg/mL). The effectiveness of carrageenan M3a from *M. gelidium*

was greater against HSV-2 and DENV-2 (in Vero cells) than the corresponding carrageenan G3d from *G. griffithsiae*. The galactans M1, M3 and M3a are the most potent polysaccharides against HSV-2 (IC₅₀ 0,04 - 0,06 $\mu g/mL$), without any cytotoxicity (CC₅₀ > 1000 $\mu g/mL$). The selectivity index of carrageenan M3a (IS = 25.000) is the highest found in the literature. In this way, the galactans from *M. gelidium* showed potential as antiherpectic compounds and had rheological properties possible industrial utilization.

1. INTRODUÇÃO

1.1. ALGAS VERMELHAS

Entre as macroalgas, as algas vermelhas (Rhodophyta), representam o grupo com maior diversidade de espécies (USOV, 1992) incluindo aproximadamente 6.000 espécies, sendo 100 de água doce (RAVEN et al., 2001). Elas são comuns ao longo da costa brasileira, sendo mais abundantes e diversificadas na costa nordeste do país. Outras áreas de alta biodiversidade são encontradas nos costões rochosos desde o norte do estado do Espírito Santo até a Ilha de Santa Catarina (SAITO; OLIVEIRA, 1990).

As algas pertencentes à divisão Rhodophyta são, do ponto de vista econômico as mais exploradas, pois, biossintetizam uma grande variedade de galactanas sulfatadas como principais componentes da matriz intercelular (USOV, 1998). Esses polissacarídeos são utilizados em setores economicamente importantes, como nas indústrias alimentícias e farmacêuticas apresentando alto potencial biotecnológico, despertando interesse mundial, devido ao seu alto valor econômico (DE RUITER; RUDOLPH, 1997).

Além da importância industrial as galactanas têm despertado interesses na área biomédica, pois são promissoras como compostos biologicamente ativos desempenhando atividade antiviral (DUARTE et al., 2001, 2004; TALARICO et al., 2004, 2005; DAMONTE et al., 1996; CÁCERES et al., 2000,) anticoagulante (CARLUCCI et al., 1997; FARIAS et al., 2000), antitrombótica (SEN et al., 2002), antiangiogênica (SATORU et al., 2003) e antitumoral (FERNANDEZ et al., 1989; ZHOU et al., 2004).

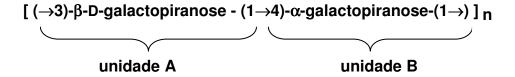
Segundo KLOAREG; QUATRANO (1988) os polissacarídeos da matriz das algas marinhas, estão correlacionados com a regulação osmótica ou iônica, adaptando-as ao ambiente marinho. Ainda com função de osmorregulação, as algas biossintetizam carboidratos de baixo peso molecular e/ou polióis (KARSTEN; BARROW; KING, 1993).

Como polissacarídeo de reserva elas sintetizam um polímero constituído por α -D-glucose, denominado "amido das florídeas", com ligações glicosídicas do tipo α -(1 \rightarrow 4) e pontos de ramificação no carbono-6 similar a amilopectina (PAINTER, 1983), porém possui uma proporção maior de ramificações assemelhando-se ao glicogênio animal.

A determinação estrutural das galactanas sulfatadas contribui para a prospecção de novas aplicações industriais e biológicas além de ser útil como ferramenta para posicionamento taxonômico das algas vermelhas.

1.2. GALACTANAS: ESTRUTURA GERAL

As galactanas sulfatadas de algas marinhas são polímeros lineares, constituídos por unidades de β -galactopiranose substituídas glicosidicamente na posição 3 (unidade A) e α -galactopiranose substituídas glicosidicamente através da posição 4 (unidade B) (PERCIVAL; McDOWELL, 1967). A unidade A sempre pertence à série estereoquímica D e a estereoquímica da unidade B é a base para a classificação geral das galactanas, sendo classificadas como agaranas (série L) ou carragenanas (série D) (PAINTER, 1983). Deste modo formam um arranjo alternado entre as unidades A e B (AB)_n.



Uma característica estrutural particular dos polissacarídeos sintetizados pelas algas vermelhas é a presença da unidade B total ou parcialmente ciclizada na forma de 3,6-anidrogalactose. As galactanas sulfatadas que apresentam este anidro-açúcar na sua estrutura, podem apresentar propriedades geleificantes ou viscosantes (RENN, 1997) e são denominadas de ficocolóides ou hidrocolóides,

pela elevada capacidade que apresentam de formar géis em meios aquosos (GLICKSMAN, 1987).

Estudos estruturais detalhados têm demonstrado que uma importante característica de vários polissacarídeos de algas vermelhas é a presença de grupos estruturais dissacarídicas de carragenanas e agaranas na mesma molécula. Esse tipo estrutural foi denominado de carrágar por CHOPIN; KERIN; MAZEROLLE (1999) e posteriormente STORZ; CEREZO (2000) adotaram o termo galactana DL-híbrida. Foi definido então um terceiro grupo de polissacarídeos, onde as unidades de α -galactose ou 3,6-anidro- α -galactose podem apresentar tanto a configuração D (D ou DA) como L (L ou LA).

Essa estrutura alternante de unidades $(1\rightarrow 3)$ β -galactopiranose e $(1\rightarrow 4)$ α -galactopiranose das galactanas, pode apresentar variações estruturais como a presença de grupos metil, éster sulfato, acetal de ácido pirúvico, cadeias laterais de β -D-xilopiranose, entre outros.

A unidade B, α -galactopiranose, pode apresentar cadeias laterais de β -D-xilopiranose no C-3 e/ou no C-6, grupos metil, assim como grupos sulfato podem estar presentes nos C-2, C-3 e/ou C-6 ou ainda esta unidade pode apresentar-se total ou parcialmente ciclizada como 3,6-anidro- α -galactopiranose, com ou sem grupo metil ou sulfato no C-2 (PAINTER, 1983).

Por sua vez a unidade A, β-galactopiranose pode apresentar acetal de ácido pirúvico nas posições C-4 e C-6 e grupos metil, sulfato assim como cadeias laterais de xilose em C-2, C-4 e C-6.

Esta variabilidade estrutural das galactanas biossintetizadas pelas algas vermelhas é normalmente explicada em decorrência de modificações incompletas ou irregulares que ocorrem a partir do esqueleto das unidades de galactose préformado. A biossíntese das galactanas de algas vermelhas envolveria os seguintes passos: i) formação da cadeia regular de unidades de galactose a partir de açucares-UDP (GOULARD et al., 1999); ii) sulfatação de vários grupos hidroxilas e/ou substituição com outros grupos constituintes (xilose, ácido pirúvico, metil) e por fim iii) eliminação enzimática dos grupos sulfato do C-6 de algumas

unidades de \rightarrow 4)- α -galactose 6-sulfato-(1 \rightarrow , originando as unidades \rightarrow 4)- 3,6-anidro- α -galactose (1 \rightarrow e seu derivado sulfatado em C-2 (REES, 1961a e b).

Desse modo, as galactanas sulfatadas apresentam ampla diversidade estrutural dependendo da espécie, e em decorrência, diferentes propriedades físico-químicas e biológicas.

1.2.1. CARRAGENANAS

As carragenanas são conhecidas desde o século XVIII quando eram utilizadas pela população de Carrageen (cidade costeira da Irlanda), como agentes espessantes e geleificante em alimentos caseiros. Estes polissacarídeos normalmente apresentam mais grupos sulfato que as agaranas, e a capacidade de formar gel depende, da interação de determinados cátions, especialmente K+/Ca²+ e a presença das unidades 3,6-anidro-α-D-galactopiranose na díade repetitiva.

Basicamente, as carragenanas apresentam uma estrutura linear repetitiva unidade A (β -D-galactopiranose) e unidade B (α -D-galactopiranose) (Figura 1).

FIGURA 1. ESTRUTURA BÁSICA REPETITIVA DE CARRAGENANAS, (UNIDADES D-ALTERNANTES).

 $R = H_1 SO_3$ ou CH_3

As carragenanas são agrupadas em quatro famílias de acordo com a posição dos grupos sulfato na unidade β -D-galactose, sendo nominadas com letras do alfabeto grego.

- I Família Kappa (κ): grupos sulfato em C-4.
- II Família Lambda (λ): grupos sulfato em C-2.
- III Família Ômega (ω): grupos sulfato em C-6.
- IV Família Beta (β): não possui grupos sulfato na unidade A.

Na Tabela 1 está demonstrada a classificação das carragenanas baseada nas díades ideais repetitivas. É importante ressaltar que as algas sintetizam polissacarídeos com uma ou mais díades repetitivas na mesma molécula em diferentes proporções, as quais recebem a denominação de carragenanas híbridas (*carragenana kappa / iota*).

Na família Kappa estão presentes as carragenanas com maior valor econômico, as geleificantes kappa e iota e a não geleificante lambda. A diferença na capacidade de geleificação das carragenanas foi explorada como um processo de separação das mesmas. O primeiro exemplo de separação de carragenanas estruturalmente diferentes foi realizado a partir da alga vermelha *Chondrus crispus* com base na capacidade diferencial de geleificação em solução de cloreto de potássio, a partir de exemplares que pertenciam a diferentes estados reprodutivos (McCANDLESS et al., 1973).

Observou-se que as plantas esporofíticas das algas do gênero *Chondrus* produzem lambda-carragenana, enquanto plantas gametofíticas (ver item 1.3) produzem carragenanas híbridas kappa/iota (McCANDLESS et al., 1982), o que demonstra que as variações quanto ao tipo de estrutura não ocorrem somente entre diferentes espécies, mas que de acordo com os estágios de vida, uma mesma espécie pode produzir diferentes tipos de carragenanas.

Variações estruturais foram observadas, como as carragenanas com alto teor de piruvatação (43-49%) sintetizadas pelas algas do gênero *Callophycus* (CHIOVITTI et al.,1997) e carragenanas altamente metiladas (6-*O*-metil-β-D-

galactose) biossintetizadas por espécies do gênero *Rhabdonia* (17-31%) (CHIOVITTI et al., 1996) e do gênero *Claviclonium* (45%) (CHIOVITTI et al., 2004).

TABELA 1. CLASSIFICAÇÃO DAS CARRAGENANAS DE ACORDO COM ESTRUTURAS IDEAIS DE UNIDADES A E B.

Família	(→3)-β-D-Gal p – $(1→4)$ -α-D-Gal p - $(1→)$	Nomenclatura de
	(Unidade A) (Unidade B)	KNUTSEN et al. (1994)
KAPPA		_
κ (kappa)	4-sulfato – 3,6-anidrogalactose	G4S – DA
ι (iota)	4-sulfato – 3,6-anidrogalactose 2-sulfato	G4S – DA2S
μ (mu)	4-sulfato – 6-sulfato	G4S - D6S
v (nu)	4-sulfato – 2,6-dissulfato	G4S - D2,6S
LAMBDA		
λ (lambda)	2-sulfato – 2,6-dissulfato	G2S - D2,6S
ξ (xi)	2-sulfato – 2-sulfato	G2S - D2S
π (pi)	2-sulfato; 4,6-O-(1'-carboxietilideno) – 2-sulfato	GP,2S - D2S
θ (theta)	2-sulfato – 3,6-anidrogalactose 2-sulfato*	G2S – DA2S
OMEGA		
$\omega \text{ (omega)}$	6-sulfato – 3,6-anidrogalactose	G6S – DA
ψ (psi)	6-sulfato – 6-sulfato	G6S - D6S
BETA		
β (beta)	não-sulfatada – 3,6-anidrogalactose	G – DA
α (alpha)	não sulfatada – 3,6-anidrogalactose 2-sulfato	G – DA2S
γ (gamma)	não sulfatada – 6-sulfato	G – D6S
δ (delta)	não sulfatada – 2,6-dissulfato	G – D2,6S

^{*}A θ-carragenana não é biossintetizada naturalmente pelas algas, para sua obtenção é necessário o tratamento alcalino da λ-carragenana.Tabela modificada de: KNUTSEN et al. (1994).

1.2.2. AGARANAS

As galactanas deste grupo apresentam a estrutura repetitiva formada por unidades de $(1\rightarrow3)$ - β -D-Galp e $(1\rightarrow4)$ - α -L-Galp, portanto diferindo das carragenanas na estereoquímica da unidade B. Esta unidade pode ainda estar total ou parcialmente ciclizada na forma de 3,6-anidro- α -L-galactopiranose (PAINTER, 1983) (Figura 2).

FIGURA 2. ESTRUTURA BÁSICA REPETITIVA DE AGARANAS (UNIDADES D- E L-ALTERNANTES).

Não existe uma classificação tão detalhada para as agaranas como a das carragenanas. ARAKI em 1966 realizou os primeiros estudos estruturais de agaranas analisando os polissacarídeos de *Gelidium amansii* (Gelidiales) e observou duas frações distintas com base na solubilidade em clorofórmio. A fração solúvel foi denominada de agarose e apresenta a estrutura ideal repetitiva ([\rightarrow 3) β -D-galactose(1 \rightarrow 4) α -L-3,6-anidrogalactose (1 \rightarrow]) e agaropectina, a fração insolúvel, apresentou uma estrutura mais complexa contendo substituintes como grupos sulfato e ácido pirúvico.

A partir da agarose neutra, as unidades α -L-3,6-anidrogalactose podem estar como unidades precursoras α -L-galactose 6-sulfato, estrutura que foi denominada de porfinara ([\rightarrow 3) β -D-galactose (1 \rightarrow 4) α -L-galactose 6-sulfato (1 \rightarrow])

por ter sido isolada pela primeira vez de algas do gênero *Porphyra* (REES, 1961b) e posteriormente em algas do gênero *Bangia* (ASPINALL, 1970).

Na fração que foi denominada agaropectina estão presentes agaranas com grupos sulfato em várias posições com percentagens que variam de 3% a 10%, grupos metil nas unidades β -D-galactose 4-metil, α -L-galactose 4-metil e α -L-galactose 2-metil e pequenas quantidades de ácido pirúvico na unidade β -D-galactose (DUCKWORTH e YAPHE, 1970).

A variabilidade estrutural nas agaranas está relacionada, como nas carragenanas, com presença dos grupos sulfato, metil e ácido pirúvico. As unidades β -D-galactose podem estar piruvatadas, metiladas (6-O-metil-L-galactose) e apresentar cadeias laterais de 4-O-metil- α -L-galactose, α -L-galactose e ou β -D-xilose (STORTZ e CEREZO 2000).

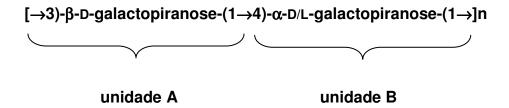
As agaranas são principalmente biossintetizadas pelas algas vermelhas pertencentes às ordens Gelidiales e Gracilariales, sendo que agaranas com diversas modificações estruturais podem ainda ser sintetizadas por algas das ordens Bangiales, Ceramiales, Corallinales e Nemaliales (MILLER 1997; CHOPIN et al., 1999; STORZ e CEREZO, 2000).

As agaranas são amplamente utilizadas nas indústrias farmacêuticas, alimentícias, assim como meio de cultura para análise microbiológica. A agarose possui alto valor econômico devido à sua elevada capacidade de geleificação, porém a presença de substituintes e de unidades precursoras diminui este poder geleificante (FALSHAW et al., 1998).

1.2.3. GALACTANAS DL-HÍBRIDAS

Este terceiro grupo de galactanas não apresenta uma estrutura regular, mas sim características de carragenanas e de agaranas na mesma molécula. Com o uso de técnicas de fracionamento e caracterização mais apuradas este grupo de galactanas está sendo encontrado em algas pertencentes a diferentes ordens, entre elas em maior proporção nas ordens Rhodymeniales, Plocamiales e Halymeniales (STORTZ e CEREZO, 2000). CHOPIN et al. em 1999 denominaram

este tipo estrutural de carrágar e posteriormente STORTZ e CEREZO (2000) adotaram o termo galactana DL-híbrida, para diferenciá-las do termo híbrido utilizado para as carragenanas.



Ainda não está claro se estas estruturas se encontram na forma de blocos na mesma molécula ou se estão em um mesmo sistema, porém em moléculas separadas. Até o momento a definição das galactanas DL-híbridas é realizada de acordo com a proporção da configuração presente na unidade B, se maior configuração L-, denomina-se: DL-híbrida com predomínio da estrutura de agarana, e se predomina configuração D-: DL-híbrida com predomínio da estrutura de carragenana.

Uma ferramenta estrutural muito importante na caracterização dessas galactanas é a determinação das unidades enantioméricas, que em conjunto com técnicas de fracionamento mais minuciosas têm permitido o isolamento e a caracterização desses polissacarídeos em extratos de algas que anteriormente eram consideradas somente produtoras de carragenanas (carragenófitas) (CIANCIA et al., 1993; STORTZ et al., 1997), por exemplo, ordem Gigartinales, ou produtoras de agaranas (agarófitas) (TAKANO et al., 1999; TAKANO et al., 2003) como foi observado em espécies pertencentes à ordem Ceramiales.

Avanços nas pesquisas voltadas à determinação estrutural de polissacarídeos provavelmente levará à caracterização de novas galactanas DL-híbridas. Estas descobertas podem ter um impacto quimiotaxômico, visto que a reanálise de polissacarídeos de algas, anteriormente consideradas produtoras somente de carragenanas ou agaranas, são na realidade produtoras de mais de um tipo de galactana (STORTZ e CEREZO, 2000).

1.3. CICLO DE VIDA E REPRODUÇÃO DAS ALGAS VERMELHAS

O tipo de ciclo de vida, em conjunto com outros caracteres, também é uma ferramenta importante utilizada na classificação das algas vermelhas. A reprodução das Rhodophyta ocorre pela fusão de um pequeno gameta masculino, denominado espermácio, com o gameta feminino denominado carpogônio. O carpogônio se desenvolve no interior do oogônio (gametângio feminino) e os espermácios são células esféricas, sem parede celular que se desenvolvem dentro dos espermatângios (gametângio masculino) (MASUDA et al., 1996).

Na maioria das algas vermelhas, o carpogônio se forma no ápice de um conjunto de células especializadas denominadas de ramo carpogonial. O número de células de cada ramo, a presença ou não de células acessórias e o número de carpogônios por cada ramo carpogonial são características de cada grupo taxonômico. Geralmente, cada espermatângio produz somente um espermácio que é liberado e levado pela água passivamente até o carpogônio, e como resultado da fertilização do carpogônio, se desenvolve uma fase diplóide, *in situ,* sobre o gametófito feminino, denominada carposporófito (HOMMERSAND e FREDERICQ, 1990).

O carposporófito quando maduro produz carpósporos, que são esporos de origem mitótica, os quais são liberados e, se em condições adequadas, germinam e originam a outra fase diplóide de vida livre, denominada tetrasporófito. Nessa fase serão formados os tetrasporângios (que dão origem a esporos por meiose) nos quais se originam os tetrásporos. Ao ser liberado, o tetrásporo de natureza haplóide, quando encontra um habitat adequado, por divisões mitóticas originará os gametófitos (masculino ou feminino), completando o ciclo de vida trifásico característico e único das algas vermelhas (HOMMERSAND e FREDERICQ, 1990).

Baseando-se no ciclo de vida constituído pelas fases gametófiticas (haplóide-n), carposporofítica (diplóide-2n) e tetrasporofítica (diplóide-2n), o tipo *Polysiphonia* é denominado quando tanto o gametófito quanto o tetrasporófito são morfologicamente idênticos, tendo o ciclo de vida uma alternância isomórfica. Em

contraste quando há alternância heteromórfica das gerações, o ciclo de vida é denominado, *Bonnemaisonia* (MASUDA et al., 1996).

As fases gametofíticas, masculina e feminina se desenvolvem em plantas independentes e macroscópicas na grande maioria das famílias pertencentes à ordem Gigartinales. No entanto o ciclo de vida trifásico das algas vermelhas pode apresentar modificações ou reduções em algumas de suas fases.

Na família Phyllophoraceae, a literatura relata uma notável diversidade no tipo de ciclo de vida, como por exemplo, quando as algas não possuem carposporófitos, mas sim tetrasporófitos, que são parasitados e se desenvolvem sobre os gametófitos femininos. Este ciclo é bifásico e se denomina tetrasporoblástico, ou tipo Gymnogongrus griffitsiae, ou seja, em uma mesma planta se desenvolve a fase gametofítica (masculina e feminina) e a fase tetrasporofítica. Algas pertencentes a esta família podem apresentam, além do tipo tetrasporoblástico, os outros dois tipos já citados Polysiphonia e Bonnemaisonia e ainda o ciclo de vida direto no qual só estão presentes os gametófitos femininos (KAPRAUM et al., 1993).

Em muitas famílias pertencentes à ordem Gigartinales há produção de diferentes polissacarídeos de acordo com a fase do ciclo de vida que a alga se encontra. Nas famílias Gigartinaceae e Phyllophoraceae, as algas na fase gametofítica (n) produzem carragenanas da família kappa, enquanto que os esporofitos (2n) biossintetizam carragenanas da família lambda (McCANDLESS et al., 1982).

1.4. ORDEM GIGARTINALES: VARIABILIDADE ESTRUTURAL DAS GALACTANAS E SIGNIFICADO QUIMIOTAXONÔMICO

A estrutura química dos polissacarídeos solúveis em água biossintetizados pelas algas vermelhas até pouco tempo atrás era utilizada como base para classificação das algas dentro da ordem Gigartinales. Um exemplo é a afirmação que as carragenófitas eram exclusivas desta ordem, assim como as agarófitas

estavam compreendidas nas ordens Bangiales, Ceramiales, Gelidiales e Gracilariales.

A ordem Gigartinales é a mais numerosa dentro da divisão Rhodophyta e com a criação das ordens Gracilariales (FREDERICQ e HOMMERSAND, 1989), Plocamiales (SAUNDERS e KRAFT, 1996), Ahnfeltiales (MAGGS e PUESCHEL, 1989) e Halymeniales (SAUNDERS e KRAFT, 1996), aproximadamente 10 gêneros e 172 espécies foram removidas da ordem Gigartinales, que atualmente é composta por 41 famílias, 100 gêneros e 700 espécies (CHOPIN et al., 1999).

A necessidade destas alterações taxonômicas e criações de novas ordens é uma resposta não somente dos avanços nas análises estruturais dos polissacarídeos biossintetizados pelas Rhodophyta, mas também das análises seqüenciais do gene *rbc*L (subunidade maior da rubisco) (FRESHWATER et al., 1994) que demonstram que este é um grupo heterogêneo e polifilético.

Em 1996, FREDERICQ et al. apresentaram a hipótese de relação filogenética entre 57 espécies pertencentes a 37 famílias de algas vermelhas produtoras de carragenanas, agaranas ou que apresentam ambas as estruturas, dentro da ordem Gigartinales, baseado nas seqüências de *rbc*L.

De acordo com os trabalhos de CRAIGIE em 1990 e MILLER em 1997, espera-se que as galactanas produzidas pelas algas da ordem Gigartinales sejam carragenófitas, porém tem-se observado e destacado nesta ordem a presença de algas produtoras de agaranas e galactanas DL-híbridas (USOV e KLOCHKOVA, 1992; CHOPIN et al., 1999; TAKANO et al.,1995; ESTEVEZ et al., 2001; ESTEVEZ et al., 2004).

De acordo com STORTZ; CEREZO (2000) as famílias dentro da ordem Gigartinales poderiam ser divididas em três grupos: (i) famílias que apresentam alternância biossintética de carragenanas (Gigartinaceae, Petrocilidaceae e Phyllophoraceae), (ii) famílias que não apresentam uma característica estrutural dos seus biopolímeros de acordo com a fase do ciclo de vida da alga (Sarcodiaceae, Solieriaceae, entre outras) e (iii) famílias pertencentes à antiga ordem Cryptonemiales (Tichocarpaceae, Endocladiaceae, Kallymenaceae e

Dumontiaceae). As algas pertencentes às famílias Phyllophoraceae e Solieriaceae serão discutidas em um item à parte.

A presença de carragenanas com "díades desviantes" como, por exemplo, ricas em grupos metil e com estruturas mais complexas é um exemplo da influência dos polissacarídeos biossintetizados pelas algas na classificação taxonômica das mesmas. Essas variações estruturais fizeram com que alguns gêneros pertencentes à família Solieriaceae e Cystocloniaceae fossem agrupados na família Areschougiaceae.

CHIOVITTI et al., em 1996 observaram que algas da família Solieriacea (*Rhabdonia coccinea* e *Rhabdonia verticillata*) eram uma rica fonte de polissacarídeos de parede celular do tipo iota-carragenana altamente metilada, e devido ao alto grau de grupos *O*-metil (31% e 17% respectivamente) estes polissacarídeos foram considerados distintos dos demais da família Solieriaceae.

Dois anos depois CHIOVITTI et al. (1998b) analisando os polissacarídeos de três espécies do gênero *Erythroclonium* (Solieriaceae) por análise de infravermelho, RMN de 13 C e análise de metilação constatou grande semelhança estrutural dos seus polissacarídeos constituídos por iota- e alfa-carragenana 6-O-metiladas, podendo estar ainda substituídas por ácido pirúvico e as unidades B (α -D-galactopiranosil) presentes principalmente não substituídas ou em menores proporções 3-O-metiladas e com terminal glicosil.

Fazendo parte da família Cystocloniaceae (Gigartinales, Rhodophyta), CHIOVITTI et al., (1998c) analisaram os polissacarídeos biossintetizados pelas algas dos gêneros Austroclonium, Gloiophyllis, Erythronaema e Stictosporum. Todas as espécies analisadas produziam tipicamente iota-carragenana com exceção da alga do gênero Austroclonium que biossintetizava uma galactana sulfatada contendo predominantemente estrutura repetitiva de iota- e alfacarragenanas 6-O-metiladas. A produção destas carragenanas se assemelha aos polissacarídeos sintetizados pelas algas Rhabdonia Erythroclonium е (Solieriaceae), mas que também produzem carragenanas significativamente diferentes de outros gêneros dentro desta família.

Em 2001 CHIOVITTI et al avaliaram as estruturas químicas e as implicações filogenéticas das carragenanas parcialmente metiladas, biossintetizadas pelas algas do gênero Areschougia. As análises estruturais demonstraram que há predominância de variações sobre a estrutura repetitiva da iota-carragenana, como a presença de 6-O-metil (G4S,6M-DA2S e G6M-DA2S), ácido pirúvico (GP - DA2S) e ainda menores proporções de grupos metil, sulfato e/ou glicosil substituindo o C-3 das unidades α -D-galactopiranose. Foi demonstrado que essas galactanas sulfatadas são ricas em mono-O-metil galactose, o que as assemelha com as algas dos gêneros Rhabdonia, Erythroclonium e Austroclonium, constituindo desse modo а família Areschougiaceae.

Na família Sarcodiaceae, inicialmente foi demonstrado que algas do gênero *Sarcodia* biossintetizam em ambos os estágios gametofíticos e tetrasporofitico, polissacarídeos equivalentes à lambda-carragenana (LIAO et al., 1993). Porém, Em 2003, MILLER, realizou a análise estrutural por RMN de ¹³C dos polissacarídeos de *Sarcodia montagneana* e *Sarcodia flabellata* e demonstrou que as unidades β-D-galactopiranosil estão principalmente substituídas por grupos sulfato no C-2 e acetal de ácido pirúvico. As unidades 4-*O*-ligadas (α-galactopiranosil) estão quase exclusivamente na configuração L, sulfatadas principalmente no C-3 e C-2 e ainda estão presentes quantidades significativas destas unidades sulfatadas nos carbonos 2, 3 e 6. Estes polissacarídeos de *Sarcodia* apresentam muita similaridade com os polissacarídeos biossintetizados por algas do gênero *Trematocarpus* (MILLER, 2002).

As famílias pertencentes à antiga ordem Cryptonemiales (Tichocarpaceae, Endocladiaceae, Kallymenaceae e Dumontiaceae) estão agora incluídas na ordem Gigartinales (SAUNDERS e KRAFT, 1996).

Os polissacarídeos sintetizados pelas algas pertencentes a estas famílias apresentam grande variedade estrutural, como observado nas algas do gênero *Kallymenia (K. reniformis* e *K. westii)* (Kallymenaceae) (DESLANDES et al., 1990; CHOPIN et al., 1994) que sintetizam galactanas denominadas genericamente de aeodanas. Estes polímeros apresentam uma estrutura majoritária de carragenana,

porém grupos sulfato apenas nas unidades A, principalmente em C-2 e C-4, grupos metoxil geralmente localizados em C-6 das unidades A e em C-2 das unidades B e pequena percentagem de α -L-galactose (USOV et al., 1980).

Uma galactana com estrutura muito mais complexa foi isolada da alga *K. berggrenii* (MILLER e FURNEAUX, 1996). Esta alga biossintetiza uma galactana DL-híbrida, cuja estrutura não foi completamente elucidada, mas que apresenta relativamente altas percentagens de 3,6-anidrogalactose e seu derivado 2-*O*-metil galactose, possuindo ainda galactose, 2-*O*-metilgalactose, 6-*O*-metilgalactose, xilose e acetal de ácido pirúvico. Este polissacarídeo possui ainda grupos sulfato substituindo os carbonos 2 e 6 em ambas as unidades, demonstrado pelas análises de metilação realizadas antes e após o processo de dessulfatação.

Na família Endocladiaceae, WHYTE et al. (1984), observaram que a alga *Endocladia muricata*, biossintetiza um polissacarídeo constituído principalmente por carrabiose [β -D-galactose-($1\rightarrow4$)-3,6-anidro- α -D-galactose], mas também com 6% de agarobiose [β -D-galactose-($1\rightarrow4$)-3,6-anidro- α -L-galactose]. Nesta mesma família, algas do gênero *Gloiopeltis*, foram classificadas como agarófitas, devido à caracterização dos seus polissacarídeos como agaranas sulfatadas, como por exemplo, em *G. cervicornis* (PENMAN e REES, 1973).

Pórem, TAKANO et al. em 1995 isolaram de *G. complanata* um polissacarídeo com estrutura híbrida de carragenana e agarana e em 1998 o mesmo grupo (TAKANO et al., 1998) caracterizou da alga *Gloiopeltis complanata* um polissacarídeo que por hidrólise parcial, originou oligossacarídeos com estrutura de carragenana, e outros com estrutura de agarana. Resultados diferentes foram observados dentro do mesmo gênero com as espécies *G. coliformis* e *G. tenax*, caracterizadas como produtoras de carragenanas (CHOPIN et al., 1999).

CHOPIN et al. (1999), classificaram as espécies: *Constantinea rosa-marina*, *C. subulifera*, *Cryptosiphonia woodii*, *Neodilsea borealis*, *N. natashae* e *N. yendoana* pertencentes à família Dumontiaceae como produtoras de galactanas do tipo DL-híbrida uma vez que apresentavam no seu espectro de infravermelho, bandas de absorção características de agarana e de carragenana.

As algas pertencentes às famílias Gigartinaceae, Phyllphoraceae e Petrocilidaceae, dentro da ordem Gigartinales, apresentam alternância das carragenanas produzidas durante o ciclo de vida. Os gametófitos produzem carragenanas da família kappa e a fase tetraspórica (esporófitos) biossintetizam carragenanas da família lambda (McCANDLESS et al., 1982, 1983). Estas famílias constituem um grupo dentro da ordem Gigartinales e a alternância biossintética de carragenanas kappa/lambda é exclusiva destas famílias na ordem Gigartinales (CRAIGIE 1990; CHOPIN et al., 1999).

Porém, gametófitos das algas *Gigartina skottsbergii* (Gigartinaceae), *Mastocarpus stellatus* (Petrocilidaceae), *Chondracanthus canaliculatus* (Gigartinaceae), *Chondrus crispus* (Gigartinaceae), e *Mazzaella leptorhynchos* (Gigartinaceae) que eram consideradas carragenófitas biossintetizam pequenas quantidades de agaranas (CIANCIA et al., 1993, 1997).

Assim como foi observado na alga *Gigartina skottsbergii* (Gigartinaceae), a alga *Iridaea undulosa* (= *Sarcothalia crispata*), também pertencente à família Gigartinaceae, biossintetiza quantidades significativas de polissacarídeos com unidades na configuração L (α -L-galactose e 3,6-anidro- α -L-galactose) presente tanto em plantas cistocárpicas (gametofíticas) quanto em tetraspóricas (STORTZ e CEREZO, 1993; STORTZ et al., 1997).

Esses resultados demonstram que as algas da ordem Gigartinales podem biossintetizar agaranas, carragenanas e galactanas DL-híbridas, quando são analisados os polissacarídeos produzidos em menor proporção, e sendo esta ordem a mais numerosa, pesquisadores têm avaliado a relevância quimiotaxonômica dessas diferenças estruturais.

1.4.1. FAMÍLIA PHYLLOPHORACEAE

Até pouco tempo atrás na família Phyllophoraceae estavam agrupados 8 gêneros: *Gymnogongrus* Martius, *Phyllophora* Greville, *Stenogramme* Harvey, *Ozophora* J. Agardh, *Petroglossum* Hollenberg, *Schottera* Guiry et Hollenberg,

Ceratocolax Rosenvinge e Besa Setchell (FREDERICQ e LOPEZ-BATISTA, 2003).

Como já citado, as algas pertencentes a esta família apresentam grande diversidade em relação ao ciclo de vida, podendo apresentar:

- Alternância trifásica isomórfica: com gametófitos e tetrasporófitos morfologicamente similares e bem desenvolvidos (Ex. *Phyllophora*).
- Alternância trifásica heteromórfica: nos quais os gametófitos são eretos com dimensões macroscópicas e os tetrasporófitos são de vida livre, com morfologia crustosa e microscópica (Ex. *Ahnfeltiopsis*).
- Alternância bifásica: com a presença de gametófitos e tetrasporófitos, porém ausência de carposporófitos. Sobre o gametófito feminino se desenvolve uma fase denominada "tetrasporoblástica" (Ex. *Gymnogongrus griffithsiae*) (NEWROTH, 1971; KAPRAUN et al., 1993; MASUDA et al., 1996).
- Ciclo de vida direto: no qual só se encontram presentes gametófitos femininos macroscópicos que produzem carposporos. Estes carposporos voltam a dar lugar à fase gametofítica (Ex. *Gymnogongrus devoniensis*).

Essas variações fizeram com que algumas espécies de *Gymnogongrus* (espécie tipo *G. griffithsiae*) que não apresentavam "tetrasporoblastos", mas sim cistocarpos internos e um ciclo de vida heteromórfico fossem transferidas para um novo gênero *Ahnfeltiopsis* (SILVA e De CREW, 1992; MASUDA e KOGAME, 1998). A espécie heteromórfica *Phyllophora trailli* foi transferida para o gênero *Erythrodermis* (GUIRY e GARBARY, 1990) e no gênero *Phyllophora* permaneceram somente as algas que apresentavam alternância isomórfica das gerações.

Por este motivo nessa família o ciclo de vida é muito importante, como em nenhuma outra família dentro das algas vermelhas, pois é utilizado como um dos caracteres mais significativos para se definir os gêneros dentro da família Phyllophoraceae (Gigartinales).

Com base em evidências morfológicas e por análises filogenéticas de seqüenciais de *rbc*L (FRESHWATER et al., 1994; FREDERICQ et al., 1996) a família Phyllophoraceae apresenta maior proximidade com a família

Gigartinaceae. E em relação à produção de galactanas sulfatadas McCANDLESS et al. (1982, 1983) estudaram o padrão de carragenanas biossintetizado pelas algas da família Phyllopharaceae e Gigartinaceae, respectivamente.

Na família Phyllophoraceae (McCANDLESS et al., 1982) observaram que plantas gemetofíticas produzem iota- ou iota/kappa- carragenanas híbridas, enquanto que na família Gigartinaceae (McCANDLESS et al., 1983) há produção de kappa- ou kappa/iota-carragenanas híbridas. Em ambas as famílias, os tetrasporófitos produzem lambda-carragenana.

Nessa família já foram realizados vários estudos das galactanas sulfatadas produzidas por gêneros muito semelhantes como *Gymnogongrus* (6 espécies) e *Ahnfeltiopsi*s (7 espécies).

Estruturas referentes à iota-carragenana foram encontradas em gametófitos de *Ahnfeltiopsis leptophylla* (McCANDLESS et al., 1982) determinadas por análise espectroscópica de infravermelho. Carragenanas híbridas kappa/iota foram determinadas em *Ahnfeltiopsis concinna*, *A. devoniensis*, *A. flabeliformis*, *A. furcellata* (McCANDLESS et al., 1982), *A. gigartinoides* (BELLION et al., 1983), *A. linearis*, *Gymnogongrus crustiforme*, *G. crenulatus*, *G. vermicularis e G. griffithsiae* (McCANDLESS et al., 1982). FURNEAUX e MILLER, (1985) também determinaram carragenanas kappa/iota por RMN de ¹³C em diferentes espécies de *Gymnogongrus*, *Ahnfeltia* e *Stenogramme*.

Nas espécies estudadas do gênero *Phyllophora* (3 espécies) foi demonstrado a presença de iota- e lambda-carragenanas (McCANDLESS et al., 1982; USOV e SHASHKOV, 1985). Algas dos gêneros *Schottera* (1 espécie), e *Sternogramme* (1 espécie) (McCANDLESS et al., 1982; WHYTE et al., 1984) parecem sintetizar polissacarídeos muito homogêneos quanto a sua estrutura, produzindo típicas carragenanas kappa/iota na fase citoscárpica e lambda-carragenana na fase tetraspórica.

Algas da família Phyllophoraceae descritas na literatura (McCANDLESS et al., 1982) (FURNEAUX e MILLER, 1985), (SAITO e OLIVEIRA, 1990), têm sido relatadas como produtoras apenas de carragenanas, em concordância com a clássica denominação destas como carragenófitas. Porém trabalhos mais recentes

realizados por MILLER et al. (1998) e ESTEVEZ et al. (2001), demonstraram que algas pertencentes a esta família também sintetizam polissacarídeos com diferentes características estruturais e variável percentagem de monossacarídeos pertencentes à série L-, seja agaranas ou galactanas D/L-híbridas.

MILLER (1998) detectou por RMN de ¹³C a presença do acetal de ácido pirúvico na galactana isolada de *Stenogramme interrupta*, sendo este considerado como critério quimiotaxonômico para classificação de algas da família Phyllophoraceae.

Em 2001, MILLER analisou também por RMN de 13 C, os polissacarídeos da fase tetraspórica dessa alga e observou em maior percentagem a unidade B (α -D-galactose) 6-O-sulfatada ligada à unidade A (β -D-galactose), também 6-O sulfatada (G6S-D6S) que corresponde à díade da psi-carragenana, precursora da ômega-carragenana (G6S-DA). Alternadamente em menores proporções, a unidade B (D6S) também estava ligada a β -D-galactose 2,6-dissulfato (G2,6S-D6S). Esses resultados foram semelhantes aos encontrados com algas do gênero *Phyllophora* e demonstram que os polissacarídeos produzidos pela fase tetraspórica diferem dos da fase gametofítica (kappa/iota), como relatado para outros membros das famílias Phyllophoraceae (FURNEAUX e MILLER, 1985), mas estes polímeros não correspondem à lambda-carragenana como esperado.

FURNEAUX e MILLER, em 1985 analisaram por RMN de ¹³C os polissacarídeos da alga *Gymnogongrus torulosus* da Nova Zelândia (= *Ahnfeltia torulosa*) e observaram que além da presença de kappa-carragenana (32%) e estruturas de iota-carragenana (46%) esta alga biossintetiza também estruturas precursoras mu/nu-carragenanas (22%). Resultados semelhantes foram encontrados por ESTEVEZ et al., 2001 e por MILLER em 2003, apesar da maior percentagem de unidades precursoras mu/nu-carragenanas (31%), 32% de kappa- e 37% de iota-carragenana.

Esses resultados foram obtidos quando somente foi analisado o extrato majoritário, porém ESTEVEZ et al., 2001 observaram a presença minoritária de agaranas e galactanas DL-híbridas biossintetizadas pela alga *G. torulosus*. Os polissacarídeos encontrados são formados principalmente por um esqueleto

básico de unidades alternantes de β -D-galactose 3-O-ligadas e α -L-galactose 4-O-ligadas com: (i) substituição parcial no C-4 da unidade A (β -D-galactose), e em C-2 e C-3, ou somente em C-3 ou C-6 da unidade B (α -galactose) e (ii) presença de unidades 3,6-anidro- α -L-galactose, parcialmente sulfatada no C-2. A galactana D/L-híbrida apresentou aproximadamente 70% de estrutura similar a de carragenanas (dados de metilação, análise enantiomérica e RMN de 13 C) e apresentou as unidades B, principalmente sulfatadas em C-3 (27,4%) (α -L-galactose-3-sulfato) com baixas percentagens de grupo O-metil (4,2%) esterificando este carbono das unidades de α -D-galactose.

Este é o único relato na literatura de uma alga produtora de galactana DLhíbrida dentro da família Phyllophoraceae.

1.4.2. FAMÍLIA SOLIERIACEAE

As algas pertencentes à família Solieriaceae são, do ponto de vista econômico, as mais importantes, pois nesta família estão presentes os gêneros *Kappaphycus* e *Eucheuma*, principais fontes para extração comercial de kappa- e iota-carragenana, respectivamente. A família Solieriaceae (incluindo a Areschougiaceae) contém aproximadamente 20 gêneros, que são amplamente distribuídos em águas de regiões de clima tropical e temperado (STORTZ e CEREZO, 2000).

Evidências morfológicas e resultados da similaridade das seqüências cloroplásticas de *rbc*L auxiliaram no estudo filogenético e biogeográfico das algas pertencentes a esta família. FREDERICQ et al., em 1999 sugerem que as algas poderiam ser divididas em sete grupos (1) *Sarconema*, (2) *Eucheuma*, (3) *Solieria* – grupo do Atlântico, (4) *Solieria* – grupo do Pacífico, (5) *Meristiella/Meristotheca*, (6) *Agardhiella* e (7) *Sarcodiotheca* que incluiria *Eucheuma uncinatum* do Golfo da Califórnia. Quatro grupos de espécies são reconhecidos no grupo *Eucheuma* que correspondem à *Eucheuma*, *Gelatiformia* (= *Betaphycus*), *Anaxiferae* e *Cottoniformia* (= *Kappaphycus*) proposto por Maxwell Doty.

Com base no tipo das galactanas sulfatadas as principais mudanças taxonômicas ocorreram no gênero *Eucheuma* (DOTY, 1988). As espécies de *Eucheuma* que produziam carragenanas do tipo beta (*E, gelatinae, E. especiosum*), passaram para o novo gênero *Betaphycus* (DOTY, 1995), as espécies produtoras de carragenanas kappa/iota foram transferidas para o novo gênero *Kappaphycus* e as espécies restantes que biossintetizavam carragenanas do tipo iota permaneceriam no antigo gênero *Eucheuma*.

Esta separação deve ser considerada como uma conveniência taxonômica, muito mais útil comercialmente do que com real significado taxonômico-filogenético, pois a cada dia está mais aceita a idéia de que não existem famílias "puras" de carragenanas, mas sim uma dispersão de estruturas ao redor de uma ou várias estruturas predominantes (CHOPIN et al., 1999).

O primeiro relato da existência de galactanas DL-híbridas fora da extinta ordem Cryptonemiales foi na família Solieriaceae, onde por hidrólise parcial da galactana de *Anatheca dentata* (NUNN et al., 1971; 1973; 1981), foram obtidos fragmentos correspondentes à estrutura de carragenana e agarana, porém nenhum com ambas as estruturas.

ESTEVEZ et al. em 2000 analisaram o extrato obtido a 25 °C da alga *Kappaphycus alvarezii* e detectaram a presença não somente de kappacarragenana, mas também estruturas incomuns de baixa massa molecular com características de galactanas DL-híbridas. Os parâmetros que as diferencia da estrutura ideal repetitiva da kappa-carragenana são: (i) baixa percentagem de 3,6-anidrogalactose e de unidades precursoras, (ii) pequena quantidade de unidades incomuns como, β-D-galactose 3-*O*-ligada não sulfatada e na forma 2,4- e 4,6-dissulfatada, (iii) quantidade significativa de iota-carragenana e (iv) de 6-*O*-metil β-D-galactose 4-sulfato. A presença de α-L-galactose 4-*O*-ligada e possivelmente, 4-*O*-ligada 3-substituída e 3-*O*-ligada 2- e 6-substituída por resíduos de galactose indica a presença de agaranas. A predominância de D-galactose sugere a co-ocorrência de estruturas de carragenanas e agaranas.

As galactanas extraídas a 90 °C de Kappaphycus alvarezii, após prévia extração a 25 °C, são compostas principalmente por kappa-carragenana

(aproximadamente 74%). No entanto, significativas quantidades destas galactanas (pelo menos 14%) representam agaranas sulfatadas e, possivelmente, galactanas DL-híbrida (ESTEVEZ et al., 2004).

No gênero *Callophycus* CHIOVITTI et al., (1997) observaram em 6 espécies a presença de alfa-carragenana com altas percentagens de ácido pirúvico (8,0% - 10,5%). A presença destes substituintes parece ser constante em todas as espécies estudadas desse gênero, assim como na alga *Sarconema filiforme* (CHIOVITTI et al., 1998a). Os conteúdos de acetal de ácido pirúvico encontrados em *Callophycus* superam os encontrados em agarófitas e é possível que a presença deste substituinte nas unidades B possa ter algum valor quimiotaxonômico neste gênero.

Da alga *Solieria robusta* também foram isoladas carragenanas piruvatadas (CHIOVITTI et al., 1999) determinadas por análise de composição monossacarídica, análises de metilação, espectroscopia de infravermelho e RMN de ¹³C.

Como já citado anteriormente o alto grau de metilação presente nas galactanas isoladas das algas dos gêneros *Erythroclonium* (CHIOVITTI et al., 1998b) e *Rhabdonia* (CHIOVITTI et al., 1996), que pertenciam à família Solieriaceae, foi o fator estrutural responsável pela transferência destas algas para a família Areschougiaceae.

A família Solieriaceae, juntamente com as famílias Gigartinaceae, Phyllophoraceae e Hypneaceae são as principais fontes de extração de carragenanas e além dos principais gêneros *Kappaphycus* e *Eucheuma*, algas dos gêneros *Gymnogongrus*, *Ahnfeltia* e *Iridaea* estão recentemente sendo utilizadas como matéria prima para obtenção desses polissacarídeos (WEST e MILLER, 2001).

1.5. APLICAÇÃO INDUSTRIAL DAS GALACTANAS SULFATADAS

Novas fontes e aplicações dos polissacarídeos produzidos por algas marinhas têm despertado o interesse de vários setores industriais nos últimos anos. Atualmente os campos de maior aplicação dos polímeros das algas marinhas estão nas indústrias alimentícias, nutracêuticas, farmacêuticas e odontológicas. Esses polímeros também são utilizados como matéria prima para o desenvolvimento de novos excipientes, por exemplo, para utilização em sistema de liberação controlada em biotecnologia enzimática e biosensores (RENN, 1997).

A ampla utilização dos polissacarídeos de algas está baseada, entre outras propriedades, na capacidade única desses de formar géis fortes em soluções aquosas. Estes géis são resultados da peculiar estrutura química regular que possibilita conformações moleculares ordenadas e agregações (LAHAYE, 2001).

As agaranas, agaroses e dextranas (Sephadex) modificadas quimicamente, são utilizadas para a realização de análises cromatográficas por exclusão e troca-iônica (DEAE-Sephadex; CM-celulose). A agarose está entre os meios mais utilizados na confecção de géis para eletroforese, assim como também o ágar é amplamente utilizado na formulação de meios de cultivo de microorganismos (ARMISEN, 1991; LAHAYE, 1991).

As agaranas podem ser utilizadas na fabricação de cápsulas de vitaminas e outras drogas, em materiais odontológicos e como base para cosméticos. São igualmente empregadas como agentes que impedem a dessecação de produtos de confeitaria, na preparação de geléias e sobremesas e como preservante temporário para carne e peixe em regiões tropicais (RENN, 1997). Algumas aplicações e propriedades importantes das agaranas estão demonstradas na TABELA 2.

TABELA 2. PROPRIEDADES IMPORTANTES E APLICAÇÕES DAS AGARANAS.

Galactana sulfatada	Propriedades importantes	Aplicações
Agaranas	Gel em soluções aquosas a baixas concentrações; Forma géis termoestáveis; Relativamente inerte; Retém umidade; Resiste a hidrólise por microorganismos.	Pastelaria/ Glacê; Geléias; Carnes enlatadas; Laxantes; Meio de Cultura.
Agarose	Gel em soluções aquosas a baixas concentrações; Forma géis termoreversíveis independente de íons; Mínima reatividade não específica com proteína.	Matrizes para: eletroforese, imunoensaios, cultura de células e microorganismos, cromatografia e sistemas imobilizados.

Tabela reproduzida de: RENN, (1997).

Entre as carragenanas, as geleificantes (kappa- e iota-) e a não geleificante (lambda-carragenana), são amplamente utilizadas em diferentes setores da indústria. As carragenanas geleificantes diferem nas propriedades dos seus hidrogéis (PICULELL 1995).

A diferença na textura dos géis de kappa- e iota-carragenana é reflexo das diferenças nas suas estruturas: os géis de iota-carragenana consistem da união das duplas hélices com pouca ou nenhuma agregação, o que proporciona flexibilidade e suavidade aos géis. Em contraste, géis de kappa-carragenana são originados de hélices agregadas, uma vez que estas moléculas não geleificam sob condições onde não há agregação, o que faz com que eles sejam relativamente duros e quebradiços (STANLEY, 1987).

No entanto, a textura dos géis pode ser controlada pela concentração dos polímeros na preparação, pela mistura de diferentes tipos de carragenanas, assim como pela mistura dessas com outros polissacarídeos como amidos,

galactomanas, xantanas, gomas de exudatos entre outros (VILLANUEVA et al., 2003).

As carragenanas podem ser usadas como géis, espessantes ou em suspensão, elas estabilizam emulsões e controlam a sinerese, proporcionando dispersão, ligação, e corpo ao produto final. O principal uso das carragenanas, em particular na indústria alimentícia é em produtos derivados do leite (GUISELEY et al., 1980).

Ambas kappa- e iota-carragenanas formam géis com sais de potássio e cálcio. A kappa-carragenana é a que origina géis mais fortes, porém são os mais sujeitos a sinerese (perda de água) (PICULELL,1995). A Tabela 3 demonstra algumas das várias aplicações das carragenanas, sua função e concentração nas preparações.

TABELA 3. APLICAÇÃO, FUNÇÃO E CONCENTRAÇÃO DAS CARRAGENANAS EM DIFERENTES PREPARAÇÕES.

Aplicação	Função	Tipo de	Concentração
		carragenana	aproximada (%)
Sobremesas	Prevenção da formação	kappa-	0,010 - 0,030
congeladas: sorvetes	do soro e do		
	descongelamento		
Produtos pasteurizados	Corpo	kappa-, iota-	0,025 - 0,035
de leite:			
Flans cozidos e cremes	Geleificação	kappa-, kappa-+	0,20 - 0,30
Géis de leite prontos		iota-	
para consumo	Controle de sinerese e	iota-	0,10-0,20
	corpo (consistência)		
Sobremesas (Géis)	Geleificação	kappa- + iota-	0,5-1,0
		kappa- + iota- +	0,5-1,0
		galactomanana	
Geléias de baixa caloria	Geleificação	kappa- + iota-	0,5-1,0
Comidas para animais	Estabilização dos	kappa- +	0,2-1,0
	lipídeos e espessante	galactomanana	
Bebidas: Frutas em pós	Corpo	kappa-, lambda-	0,1-0,2
e concentrados	Efeito "pulping" (efeito	(sódio)	0,1-0,2
congelados	de polpa)	kappa- (potássio e	
		cálcio)	
lmitação de leite	Corpo e estabilização	lota-, lambda-	0.03 - 0.06
	dos lipídeos		
Pasta de dente	Ligante	kappa- (sódio),	0.8 - 1.2
		lambda-, iota-	
Loções	Corpo e emoliente	kappa- (sódio),	0,2-1,0
		lambda-, iota-	
Suspensões	Suspensão	lota-	0,2-1,0
Tintas à base de água	Suspensão, controle do	kappa- +	0,15 - 0,5
	fluxo e estabilização da	galactomanana,	
	emulsão	iota-	

Tabela modificada de MOIRANO (1977) e GUISELEY et al. (1980).

1.5.1. FORMAÇÃO DE GEL, FONTES E PROCESSAMENTO DAS CARRAGENANAS

O mecanismo proposto por Rees para explicar a formação de gel das carragenanas, é basicamente o mesmo dos polissacarídeos que apresentam "cadeias com seqüência interrompida". Rees inclui nesse grupo os polissacarídeos com mais de um tipo de unidade monossacarídica, e/ou mais de um tipo de união glicosídica, que apresentam estruturas com seqüências repetitivas, interrompidas por outras sem nenhum tipo de regularidade, como por exemplo, as carragenanas, agarose, alginatos, pectinas e glicosaminoglicanas (com exceção do ácido hialurônico) (REES, 1977).

Em condições favoráveis, geralmente por resfriamento, as cadeias polissacarídicas de kappa- e iota-carragenanas passam do estado "random coil (ao acaso)" ao de hélice formando hélices duplas entre as regiões repetitivas da molécula. Estas estruturas terciárias se encontram limitadas à região da molécula que apresenta regularidade. Na zona com seqüência irregular a dupla hélice se interrompe, permitindo a formação de dupla hélice com outra cadeia (REES, 1977).

REES (1977)denominou interações cadeias essas entre as polissacarídicas de zonas de união ou domínios. Um exemplo da importância das seqüências irregulares é observada nas carragenanas kappa- e iota-, onde a estrutura repetitiva destes polissacarídeos é interrompida em alguns pontos pela presença de unidades de 3,6-anidro- α -galactose 6-sulfato (mu-carragenana) e α galactose 2,6-disulfato (nu-carragenana), precursores da kappa- e iotacarragenanas, respectivamente. É importante ressaltar que embora as duas primeiras apresentem a conformação ⁴C₁ sendo unidas por meio de duas ligações axiais (C-4 e C-1); as unidades de 3,6-anidrogalactose (presentes na kappa- e iota-carragenanas) se encontram na conformação ¹C₄, unidas por duas ligações equatoriais (C-4 e C-1). Portanto a substituição de uma única unidade na seqüência repetitiva das carragenanas kappa- e/ou iota- é responsável por um desvio na direção da cadeia, produzindo uma importante alteração na forma da molécula como um todo. Na Figura 3 estão demonstradas as conformações 4C_1 da nu-carragenana e 1C_4 da iota-carragenana.

FIGURA 3. ESTRUTURAS IDEAIS REPETITIVAS DA (A) (NU-CARRAGENANA), CONFORMAÇÃO 4C_1 E DA (B) (IOTA-CARRAGENANA), CONFORMAÇÃO 1C_4 .

Por essa razão as unidades precursoras mencionadas anteriormente foram denominadas de "unidades de dobramento" ou "kinks"; estas "unidades de dobramento" são necessárias para a formação do gel (REES, 1977).

As unidades precursoras são importantes para a formação de gel, pois possibilitam a formação dessas zonas de união ou domínios. Porém, se presentes em elevadas concentrações essas unidades, mu-carragenana e nu-carragenana, as quais são carragenanas não geleificantes, dificultam a formação das hélices e por conseqüência podem prejudicar o processo de geleificação (VAN DE VELDE et al., 2002a., 2002b).

Neste contexto é importante deixar claro que para a formação do gel é necessário um balanço entre o número de ligações cruzadas entre as cadeias polissacarídicas (ocasionado pela presença das unidades precursoras) e o

conteúdo de unidades capazes de formar hélices, devido a presença de kappa- e iota-carragenanas.

A indústria, no início dos anos 90, com o intuito de minimizar os custos de extração e processamento das carragenanas alterou o método de extração e disponibilizou no mercado as carragenanas semi-refinadas (veja adiante). Nesse processo a alga é submetida à extração alcalina, método químico que permite a ciclização das unidades precursoras, aumentando assim o poder geleificante do polímero. Em escala laboratorial, este método é denominado tratamento alcalino (NOSEDA e CEREZO, 1995).

As carragenanas são listadas pelo FDA (Food and Drug Administration) como GRAS (Generally Recognized as Safe), sendo consideradas aditivos alimentares permitidos para adição direta em alimentos para consumo humano. O FDA define este aditivo alimentar como um hidrocolóide refinado preparado por extração aquosa de algas das famílias Gigartinaceae e Solieriaceae, classe Rodophyceae.

As famílias Gigartinaceae, Phyllphoraceae e Solieriaceae são as principais fontes de extração de carragenanas utilizadas industrialmente, porém o Brasil, mesmo sendo um país rico em algas pertencentes a essas famílias (SAITO e OLIVEIRA, 1990), as explora de modo subestimado como fonte de carragenanas. No Brasil a alga utilizada como fonte de carragenanas é a alga pertencente à família Rhodophyceae, *Hypnea musciformes* (TABELA 4).

Entre as principais fontes desses polímeros estão as algas Chondrus crispus, C. ocellatus, Kappaphycus alvarezii antigamente Eucheuma cottonii e comercialmente chamada "cottonii", E. denticulatum antigamente E. spinosum e comercialmente chamada "spinosum", Gigartina acicularis, G. pistillata, G. radula, Mastocarpus stellatus antigamente Gigartina. stellata, G. skottsbergii, G. canaliculata, G. chamissoi, Gymnogongrus furcellatus, Hypnea musciformes, Sarcothalia crispata, Betaphycus gelatinum antigamente Eucheuma gelatinae e Sarcothalia crispata antigamente Iridaea ciliata (STANLEY, 1987).

As algas dos gêneros *Eucheuma* e *Kappaphycus*, principais produtoras de iota- e kappa-carragenanas, respectivamente são cultivadas principalmente no

Hawaii, Filipinas, Indonésia, Malásia, China e Tailândia. Outra importante fonte de carragenanas é a alga *Chondrus crispus* obtida de populações naturais na província litorânia do Canadá, onde aproximadamente 50.000 toneladas de alga (peso úmido) são coletadas por ano. Como já citado anteriormente as algas não sintetizam famílias "puras" de carragenanas, mas sim misturas delas (CHOPIN et al., 1999).

Devido aos 9.198 km de extensão do litoral brasileiro ele apresenta condições favoráveis para implantação do cultivo de algas e, em 1996, PAULA et al. (2002) iniciaram um trabalho para introdução do cultivo da alga *Kappaphycus alvarezii* no litoral de São Paulo, em Ubatuba. Os resultados demonstraram que o cultivo comercial desta alga é viável nesta região utilizando o sistema de flutuação.

A Tabela 4 fornece dados das principais fontes, sua localização e composição em carragenanas extraídas industrialmente de algumas algas vermelhas.

TABELA 4. ALGAS, LOCALIZAÇÃO E COMPOSIÇÃO EM CARRAGENANAS.

Algas	Carragenanas	Localização
Chondrus crispus / C.	Mistura de kappa- e lambda-	Províncias marinhas do
ocellatus	carragenana	Canadá e
		Massachusetts (USA)
Kappaphycus alvarezii	Principalmente kappa-	Filipinas, Indonésia,
	carragenana	Hawaii, Malásia, China
		e Tailândia
Eucheuma denticulatum	Principalmente iota-	Filipinas, Indonésia,
	carragenana	Hawaii, Malásia, China
		e Tailândia
Gigartina skottsbergii	Principalmente kappa- e	Chile
	pouco lambda-carragenana	
Gigartina acicularis / G.	Principalmente kappa- e xi-	México e sul da França,
pistillata / G. radula	carragenana	Espanha, Portugal e
		Marrocos
Gymnogongrus furcellatus	Principalmente iota-	Peru
	carragenana	
Sarcothalia crispata	Mistura de kappa- e lambda-	Chile
	carragenana	
Hypnea musciformes	Principalmente kappa-	Brasil
,	carragenana	
	<u> </u>	

Fonte: STANLEY, (1987).

Atualmente, no mercado estão disponíveis dois tipos de produtos: (i) carragenanas refinadas ou filtradas e (ii) carragenanas semi-refinadas. Essa denominação é decorrente do método de extração empregado para a obtenção do polímero.

No método original, utilizado até os anos 80, as carragenanas eram extraídas em solução aquosa, os resíduos da alga eram removidos por filtração e, então, as carragenanas recuperadas da solução ou por precipitação com solução de cloreto de potássio (processo geleificante) ou por precipitação com etanol. Esse método origina as carragenanas refinadas ou filtradas, porém, são trabalhosos e têm custo elevado para serem empregados industrialmente (STANLEY, 1987).

A obtenção das carragenanas semi-refinadas começou por volta dos anos 90. Nesse processo a alga é tratada com álcali o que ocasiona a ciclização das unidades precursoras e consequentemente o aumento da força do gel. A formação do gel impede que a carragenana fique dissolvida na solução, enquanto proteínas solúveis, carboidratos e sais são dissolvidos e removidos. O resíduo (com aparência da alga) é lavado várias vezes para a remoção do álcali e posteriormente seco. Além da ciclização das unidades precursoras e aumento do poder geleificante das carragenanas extraídas (item 4.1), a simplicidade deste método proporciona a redução dos custos do processo (BIXLER, 1996).

Os produtos obtidos por esse método de extração foram originalmente denominados PNG (Philippine Natural Grade carrageenan) e, apesar de sofrer forte oposição dos produtores das carragenanas refinadas, na Europa e no Brasil, as refinadas e as PNG são permitidas na alimentação humana. Elas recebem a seguinte rotulagem.

Na Europa:

- Carragenana refinada: é rotulada "carrageenan" e E 407.
- Philippine Natural Grade (PNG) é rotulada: "Processed *Eucheuma* seaweed" ou "PES" e E- 407a.

No Brasil:

- Carragenina / Carragena - E - 407. Comercialmente disponível sob diversas denominações Eucheuman (do gênero *Eucheuma*), Hypnean (do gênero *Hypnea*), Carragenina / Carragena (dos gêneros *Chondrus* e *Gigartina*).

- Algas Eucheuma transformadas - "PES" e E- 407a. (Ministério da Agricultura, do desenvolvimento Rural e das Pescas - Decreto-Lei n.º 38/2000 de 14/03/2000).

Apesar do custo menor na produção de carragenanas semi-refinadas (PNG ou PES) essas contêm celulose originando soluções turvas, já as carragenanas refinadas originam soluções límpidas, uma vez que a celulose é removida durante o processo de filtração. A Tabela 5 demonstra a capacidade dos produtores de carragenanas de acordo com a localização geográfica.

TABELA 5. PROCESSAMENTO DE CARRAGENANAS. CAPACIDADE EN TONELADAS, DADOS DE 2001.

	Processo	Processo	PES	Total	%	ATC ¹
	Alcoólico	Geleificante				
Europa	8.100	5.000	500	13.600	32	
Américas	4.700	3.350	1.100	9.150	21	
Ásia-Pacifíco	2.000	8.280	9.900	20.180	47	16.000
Total	14.800	16.630	11.500	42.930		16.000

Fonte FAO – Food and Agriculture Organization. ATC = Tratamento alcalino da alga E. cottonii.

Entre os principais produtores e distribuidores das carragenanas refinadas estão: (i) Filipinas: Shemberg Marketing Corporation, Marcel Carrageenan Corporation, (ii) Dinamarca: CP Kelco, Danisco Cultor, (iii) EUA: Ingredients Solutions Inc, FMC Biopolymer, (iv) Espanha: CEAMSA, Hispanagar, S.A. (v) Japão: Chuo Food Materials Co.Ltd., Ina Food Industry Co., Ltd., (vi) Alemanha: Degussa Texturant Systems, (vii) França: Rhodia Food, (viii) Chile: Gelymar S.A., (ix) Coréia: Myeong Shin Chemical Ind. Co., Ltd., (x) Argentina: Soriano S.A., (FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations).

¹ ATC: alga *E. cottonii* tratada com álcali.

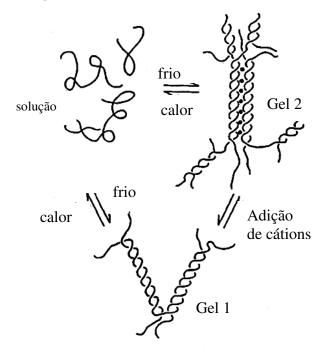
As PNG e PES são produzidas e distribuídas principalmente por indústrias nas (i) Filipinas: Marcel Carrageenan Corporation, Shemberg Marketing Corporation, Quest International Philippines Corp., FMC Corporation, Geltech Hayco, Inc., TBK Manufacturing Corp. (ii) Indonésia: P.T. Surya Indoalgas Jln Kedungdoro – 60, C.V. Cahaya Cemerlang, P.T. Gumindo Perkasa Industri e P.T. Asia Sumber Laut, (iii) Portugal: Iberagar S.A. e (iv) EUA Ingredients Solutions Inc. (FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations).

Uma inovação na aplicação das carragenanas em alimentos é o advento da kappa-2'carragenana (sinônimos: kappa fraca, kappa geleificante fraca, kappa/iota híbrido). A kappa-2 carragenana foi recentemente introduzida comercialmente pela Shemberg Corporation (Cebu, Filipinas) e foi especialmente desenvolvida para uso como geleificante e agente ligante utilizado em vários produtos lácteos. Quimicamente, a kappa-2 difere da kappa-carragenana por apresentar também unidades de iota-carragenana, contendo 20-50% de unidades de 3,6-anidro-α-galactose 2-*O*-sulfatadas (VILLANUEVA et al., 2004).

1.5.2. INFLUÊNCIA DOS SAIS NO PROCESSO DE GELEIFICAÇÃO E INTERAÇÃO COM AMIDO

Uma das mais notáveis características das carragenanas geleificantes está na sua pronunciada sensibilidade ao ambiente iônico que se reflete em quase todas as suas propriedades geleificantes. Não somente a quantidade ou a valência dos íons, mas também a identidade dos íons presentes pode ser importante (PICULELL, et al., 1997). Em geral, a adição de sal aumenta a estabilidade das hélices ordenadas e promove a geleificação (FIGURA 4).

FIGURA 4. FORMAÇÃO DE GEL EM CARRAGENANAS.



Fonte: www.fao.org (FAO - Food and Agriculture Organization).

O efeito de vários cátions na transição conformacional (fita para hélice) da kappa-carragenana tem sido amplamente estudado. A interação dos cátions com as duas conformações da kappa-carragenana têm sido estudada por uma variedade de métodos termodinâmicos e espectroscópicos; a maioria desses estudos emprega técnicas como medidas de condutividade e medidas de coeficientes de atividade iônica.

A dependência de sal na transição conformacional da iota-carragenana tem sido muito estudada e para esse tipo de carragenana efeitos de cátions específicos também foram relatados. Esta especificidade relata o efeito muito forte na estabilização da hélice dos íons divalentes, como o Ca⁺⁺. No entanto, a sensibilidade à presença de íons monovalentes específicos também foi identificada de maneira similar à da kappa-carragenana (PICULELL et al., 1987).

Porém, foi observado que estes efeitos eram decorrentes da presença de impurezas de kappa-carragenana em amostras de iota-carragenana nativa, estando a primeira, presente em blocos e/ou em polímeros separados com

comprimento suficiente que dão origem a um passo de transição distinto em um intervalo de temperatura típico para kappa-carragenana (PICULELL et al., 1987).

Nas amostras nativas mais puras, como a iota-carragenana de *Eucheuma spinosum*, a amplitude deste passo de transição separado é freqüentemente tão pequena que pode não ser detectável nos experimentos de rotação óptica. Devido a pequena variação nas temperaturas de transição de diferentes formas de íons (possivelmente resultado das diferenças nos tamanhos dos íons hidratados), não há nenhuma indicação de qualquer especificidade de cátion na transição conformacional da iota-carragenana pura (PICULELL et al., 1987). A TABELA 6 mostra a solubilidade e capacidade de geleificação dessas carragenanas com diferentes íons.

TABELA 6. SOLUBILIDADE E CAPACIDADE DE GELEIFICAÇÃO DE DIFERENTES CARRAGENANAS.

Tipo	Sais	Solubilidade em água	Tipo de gel	Estabilidade Congelamento/ Descongelamento
	Sódio (Na ⁺)	Solúvel fria e quente	Quebradiço, sinerese	Nenhuma
Карра (к)	Cálcio (Ca++)	Solúvel acima 60°C	Quebradiço, sinerese	Nenhuma
	Potássio (K+)	Solúvel acima 60°C	Gel mais forte, quebradiço, sinerese	Nenhuma
	Sódio (Na+)	Solúvel fria e quente	Elástico, coesivo e sem sinerese	Estável
lota (ι)	Cálcio (Ca++)	Dispersão tixotrópica abaixo 60°C	Gel mais forte, elástico, coesivo, sem sinerese	Estável
	Potássio (K+)	Solúvel acima 60°C	Elástico, coesivo, sem sinerese	Estável
Lambda (λ)	Todos	Solúvel fria e quente	Não geleificante	Nenhuma

^{*} Tabela segundo: CLARKE, M. T., in Rheological Properties of Cosmetics and Toiletries (1993).

Além das carragenanas que, apesar do seu elevado custo, são muito utilizadas na indústria alimentícia, os amidos estão entre os polímeros mais empregados em diferentes setores industriais, devido às suas capacidades de adesão, ligação, formação de filme, geleificante e espessante (AUTIO et al., 2002). Carragenanas, gomas arábica, guar, xantanas, carboximetilcelulose e galactomananas são algumas das macromoléculas normalmente combinadas com amidos de trigo ou de milho (TECANTE e DOUBLIER, 1999).

A utilização do amido em preparação de produtos alimentícios é superior a soma de todos os hidrocolóides combinados, sem levar em conta a indústria de panificação (GUILBOT; MERCIER, 1985; ZOBEL; STEPHEN, 1995; WHISTLER; BeMILLER, 1997)

O amido é uma mistura de polissacarídeos sendo a maioria composta por dois polímeros, um altamente ramificado, chamado amilopectina e o outro essencialmente linear (menor teor de substituição) chamado amilose (SCHOCH, 1945, WHISTLER; BeMILLER, 1997).

Em termos estruturais a amilopectina é o componente altamente ramificado do amido, formado por cadeias de unidades α -D-glucopiranose unidas por ligação (1 \rightarrow 4), mas com 5-6% de ligações α -(1 \rightarrow 6) nos pontos de ramificação. A amilopectina apresenta alta capacidade de ligação à água e um lento processo de retrogradação, formando misturas claras com textura macia e com bom fluxo, com baixa tendência a formação de géis (ZOBEL; STEPHEN, 1995).

Já amilose é uma molécula essencialmente linear, apresentando uma cadeia constituída por unidades de α -D-glucopiranose unidas por ligações (1 \rightarrow 4), com baixo teor de ligações α -(1 \rightarrow 6), apresentando em torno de 0,3 a 0,5% do total de ligações (GUILBOT; MERCIER, 1985; WHISTLER; BeMILLER, 1997).

Comercialmente os amidos podem ser obtidos de sementes, em particular de milho comum, de milho com altos teores de amilopectina "waxy" e de milho com altos teores de amilose, de trigo e de vários genótipos de arroz. Outras fontes fontes como cará possuem baixa aplicação industrial até o momento, e publicações científicas relacionadas a este amido são incipientes quando comparadas ao de milho (*Zea mays L.*), cuja produção mundial é próxima a

20.000 t/ano e aumenta rapidamente (ZOBEL;STEPHEN, 1995), sendo que nos Estados Unidos 95% do amido consumido provêm da soma das diferentes variedades de milho (WURZBURG, 1986).

HOOVER; VASANTHAN (1994) observaram que o nível aparente de amilose no amido de cará foi de 27,1%, teor muito semelhante ao do amido de trigo e acima do amido de ervilha e batata. MCPHERSON; JANE (1999) compararam o amido de batata "waxy" com outros amidos de tubérculos e raízes como cará, amido de batata normal e batata doce. Nesse trabalho foi observado um teor de amilose aparente de 29,2% para o amido de cará. Os autores também observaram que a amilopectina de amido de cará e batata doce apresentam altas porções de cadeias laterais curtas (dp 6-12) de 19,09 e 17,05%, respectivamente, quando comparadas a amilopectina de amido de batata normal e "waxy"(13,07 e 14,75%, respectivamente).

Em amidos nativos, as moléculas de amilose, amilopectina e uma limitada quantidade de água estão organizadas em micelas, com uma durável e morfologicamente esclarecida estrutura microscópica chamada de grânulo. A fusão ou rompimento de tal estrutura organizada é um pré-requisito para utilização de seus polímeros. A presença de regiões cristalinas nos grânulos de amido, devem-se principalmente às moléculas de amilopectina de alta massa molar interconectadas. Já nas regiões amorfas estão localizadas predominantemente moléculas de amilose (ZOBEL; STEPHEN, 1995).

Sem processamento, os grânulos de amidos são parcialmente cristalinos; durante o aquecimento em presença de água se hidratam, gerando um aumento temporário da viscosidade, devido à fusão das regiões cristalinas e a hidratação das macromoléculas. Após resfriamento, a gelatinização é acompanhada pelo aumento da turbidez e da firmeza da pasta formada (WURZURG, 1986). Assim a gelatinização é acompanhada por dois fenômenos principais, o primeiro refere-se à perda da cristalinidade, refletindo a redução das interações intra e intermoleculares em ordem respectivas, e o segundo ao inchamento do grânulo de amido (MARCHANT; BLANSHARD, 1978). Tecnologicamente, amido apresenta alguns incovenientes, entre eles, altos picos de viscosidade durante seu

aquecimento, sinerese, retrogradação e consistência indesejável da pasta fria (ZOBEL; STEPHEN, 1995).

As moléculas de amilose nativas sofrem rápido processo de retrogradação, isto é, formam géis opacos e parcialmente cristalinos. A retrogradação ocorre quando moléculas que se desordenam pelo aquecimento dos grânulos em água, formam dispersões moleculares que, rapidamente, precipitam ou formam géis. Isso ocorre quando cadeiais longas e flexíveis de amilose que apresentam movimento aleatório (Browniano) colidem e formam ligações intermoleculares formando zonas de junção. Tal interação temporária é fortalecida por segmentos de outras cadeiais que colidem com esse núcleo e ligam-se a ele, formando uma rede tridimensional compacta, aumentando a ordem do sistema, gerando uma rede elástica e cristalina (WHISTLER; BeMILLER, 1997; WURZBURG, 1986).

Em géis ricos em amilose, a formação de uma rede compacta gera exclusão de água do sistema, o que é indesejável, e o fenômeno é chamado de sinerese (WHISTLER; BeMILLER, 1998; WURZBURG, 1986).

Sabe-se que as características de polímeros em solução podem ser alteradas por certas misturas que podem gerar propriedades diferentes do sistema puro, possibilitando, por exemplo, evitar problemas de processamento e estocagem (MARCOTTE et al., 2001).

As carragenanas são frequentemente combinadas com amidos, como amido de milho, em sobremesas geleificadas contendo leite (TYE, 1988). O amido fornece corpo e boa impressão sensorial ao produto, enquanto a carragenana proporciona a textura apropriada, normalmente firme e quebradiça com a kappa-, suave e elástica com a iota-carragenana (ZOBEL e STEPHEN, 1995).

Em geral, a adição do hidrocolóide acelera a geleificação do amido de milho nativo. Isto ocorre com a kappa-carragenana, embora a iota-carragenana retarde essa geleificação (EIDAM et al., 1995). Similarmente, foi observado que a adição de amido acelera a geleificação da kappa-carragenana, possivelmente devido ao efeito da interação entre o ficocolóide e as moléculas solúveis de amido. A geleificação da iota-carragenana pode ser retardada pela adição de moléculas de

amidos rígidos, ou acelerada, quando grânulos solúveis são adicionados (LAI et al., 1999).

Um dos aspectos enfocados nas misturas de amido-hidrocolóide é que essa combinação pode ampliar as propriedades reológicas e originar modificações na textura dos géis. Quando amido contendo amilose é ligado com outras macromoléculas, efeitos sinérgicos podem ser obtidos, aumentando a viscosidade das pastas como resultado da concentração do polímero adicionado.

Na aplicação prática, sistemas misturados são utilizados para aperfeiçoar as propriedades reológicas, buscando não só, o aumento da habilidade do biopolímero como agente geleificante, pela adição de outra macromolécula, mas também devido as propriedades que os hidrocolóides desempenham na aceitabilidade total dos produtos alimentícios, aumentando a estabilidade física e atuando nas propriedades sensoriais (textura) dos mesmos (MARCOTTE et al., 2001).

1.6. REOLOGIA: HISTÓRICO E ASPECTOS TEÓRICOS

O termo reologia criado por M. Reiner e E.C. Bingham, provém da palavra Grega "*rheos* " e significa o estudo da deformação e fluxo da matéria, sendo que tal definição foi aceita pela Sociedade Americana de Reologia quando esta foi fundada em 1929 (BARNES et al., 1989, LAPASIN; PRICIL, 1995).

A reologia é a ciência que estuda as propriedades mecânicas dos materiais que determinam seu escoamento quando solicitados por forças externas. O campo da reologia estende-se desde a mecânica de fluidos newtonianos até a elasticidade de Hooke (BIRD et al., 1960).

Fluidos reais (ideais) deformam-se irreversivelmente, ou seja, quando tensões são aplicadas sobre esses materiais, eles escoam. A energia da deformação é dissipada dentro dos fluidos em forma de calor e não pode ser recuperada se a tensão aplicada for cessada. Aqui é importante ressaltar que devido ao escoamento, esses materiais são estudados na reologia, pela relação entre sua taxa de cisalhamento e tensão de cisalhamento (BARNES et al., 1989).

Para um fluido newtoniano ideal, a tensão de cisalhamento é uma função linear da taxa de cisalhamento, e a constante de proporcionalidade para esta relação μ é chamada de viscosidade newtoniana (SHARMA et al., 2000).

Dessa forma o líquido seria a substância que muda continuamente de forma (flui), independente da magnitude da tensão aplicada, ou seja, sua viscosidade permanece a mesma, independente da tensão. Muitos alimentos, como leite, suco de maçã, suco de laranja, vinho e cerveja exibem um comportamento newtoniano (BARNES et al., 1989).

O postulado de Newton introduziu o conceito de viscosidade em que a tensão de cisalhamento (σ) ou "shear stress" foi relacionada à taxa de cisalhamento $(\mathring{\gamma})$ ou "shear rate", através da equação:

$$\sigma = \eta \dot{\gamma}$$
 (1)

No sistema corrente (SI), é utilizado Pascal-segundo, cujo símbolo é Pa.s, sendo anteriormente utilizado no sistema CGS o poise (BARNES et al., 1989).

Então a viscosidade (η) é dada por:

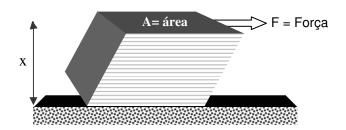
$$\eta = \sigma / \mathring{\gamma} \tag{2}$$

Onde σ = força aplicada sobre uma área = N/ m² ou Pa

 γ = velocidade relativa das camadas líquidas dividida pela distância entre elas = s^{-1} (Figura 5).

Uma vez que a medida da viscosidade de um material está relacionada com a tensão (σ) e taxa de cisalhamento ($\dot{\gamma}$) a figura 5 facilita a compreensão dos conceitos de tensão e taxa de cisalhamento.

FIGURA 5: ESCOAMENTO DE FLUÍDO EM REGIME LAMINAR



X = espessura

(i) Tensão de cisalhamento (σ) relaciona a força F aplicada sobre a área A, sendo que a interface entre a camada superior e inferior do líquido, leva a um fluxo na camada líquida. A velocidade de fluxo que pode ser mantida por uma dada força é controlada pela resistência interna do líquido, ou seja, pela sua viscosidade.

A tensão de cisalhamento faz com que o líquido flua num determinado padrão. A velocidade máxima é observada nas camadas superiores do líquido. A velocidade diminui das camadas superiores para as inferiores, apresentando uma velocidade mínima na camada mais inferior que está em contato com a superfície estacionária. Esse gradiente de velocidade é definido como (ii) $taxa de cisalhamento (\mathring{\gamma})$. A velocidade de cisalhamento pode variar de acordo com a espessura do material.

Os fluidos viscosos não-newtonianos não apresentam proporcionalidade entre a taxa de cisalhamento e a tensão cisalhamento (IBARZ e BARBOSA-CÁNOVAS, 1999). Os fluidos não-newtonianos podem ser dependentes ou independentes do tempo. Para os fluidos não-newtonianos independentes do tempo, à temperatura e composição constantes, a viscosidade aparente depende da taxa de cisalhamento ou da tensão de cisalhamento (RAO & RIZVI, 1986).

Para fluidos não-newtonianos o termo viscosidade é substituído por ηαρ que é a viscosidade aparente e é função do gradiente de velocidade. Entre os líquidos não Newtonianos podem ser citados os seguintes exemplos:

Fluídos pseudoplásticos (Shear Thinning): Este tipo de fluido demonstra um decréscimo na viscosidade com um aumento na tensão de cisalhamento (MCCLEMENTS, 2005), sendo que a taxa de cisalhamento versus a tensão de cisalhamento forma uma linha convexa (SHARMA et al., 2000). Esses fluidos em repouso apresentam um estado desordenado, e quando submetidos a uma tensão de cisalhamento, suas moléculas tendem a se orientar na direção da força aplicada. Quanto maior a tensão aplicada, maior será a ordenação. Consequentemente, a viscosidade aparente será menor (HOLDSWORTH, 1971).

Alguns exemplos de fluidos pseudoplásticos são: sucos de frutas concentrados, purê de maçã, pasta de amido e proteínas (RHA, 1978). Em geral, os purês de frutas e vegetais são fluidos pseudoplásticos. A consistência desses produtos é um importante parâmetro de qualidade industrial (IBARZ e BARBOSA-CÁNOVAS, 1999). Suspensões, emulsões e dispersões também apresentam comportamento pseudoplástico.

Fluídos Dilatantes: Os fluidos dilatantes apresentam o comportamento inverso ao fenômeno da pseudoplasticidade, ou seja, a viscosidade do fluido aumenta à medida que aumenta a taxa de cisalhamento. Esse tipo de fluxo somente é encontrado em líquidos que contém uma alta proporção de partículas rígidas insolúveis em suspensão (BOURNE, 1982). Alguns tipos de mel e suspensões de amido se enquadram nessa categoria (SHARMA et al., 2000).

Fluídos Plástico ou de Bingham: O fluído de Bingham é aquele em que é necessária a aplicação de uma tensão inicial mínima, o ponto de ruptura ou "yield stress" para que o material comece a fluir. Ou seja, o sistema apresenta em repouso altas forças de interações intermoleculares, dando a substância um caráter sólido, que o impede de fluir, até que a força externa seja superior à força da rede, onde possamos observar o ponto de ruptura. Alguns exemplos de fluidos alimentícios que representam esse comportamento são: molhos de tomate, maionese, clara de ovo batida e margarina (BOURNE, 1982).

Fluidos tixotrópicos: Os fluidos desse grupo apresentam um comportamento reológico dependente do tempo. Um fluido tixotrópico é aquele no qual a viscosidade aparente diminui com o tempo quando o fluido é submetido a

uma taxa de cisalhamento constante. Fluidos desse tipo são conhecidos por conter pequenas partículas (cristais ou biopolímeros) que são mantidos juntos por forças fracas. O cisalhamento do material separa as partículas agregadas e então ocorre uma menor resistência ao escoamento e a viscosidade decresce com o tempo até um valor constante ser alcançado (MCCLEMENTS, 2005). Exemplos desse fluido são gelatinas, cremes, manteigas, molhos para saladas, entre outros (SHARMA et al., 2000).

Fluidos reopéticos: Em alguns alimentos, a viscosidade aparente do fluido aumenta com o tempo quando sujeito a uma taxa constante de cisalhamento. Há diferentes razões para este comportamento. A mais importante é que o cisalhamento aumenta a freqüência das colisões entre as moléculas ou partículas dos fluidos, que pode levar para um aumento de agregados e consequentemente um aumento na viscosidade aparente (MCCLEMENTS, 2005). Este tipo de comportamento não é comum em alimentos, mas pode ocorrer em soluções de amido altamente concentradas (SHARMA et al., 2000).

Soluções de carragenanas que apresentam viscosidade inferior à 100 mPa.s apresentam comportamento próximo ao Newtoniano e em maiores viscosidades as soluções exibem comportamento pseudoplástico (Shear-Thinning) (STANLEY, 1987). As carragenanas comerciais estão disponíveis em viscosidades que variam de 5 mPa.s à 800 mPa.s, quando medida à concentração de 1,5% e 75°C.

As carragenanas formam soluções aquosas altamente viscosas. Essa característica é decorrente da sua linearidade estrutural e natureza polieletrólica. A repulsão mútua decorrente dos vários grupos sulfatos carregados negativamente ao longo da cadeia, faz com que a molécula fique altamente estendida, enquanto que a sua natureza hidrofílica permite que a estrutura esteja cercada por moléculas de água imobilizadas (GUISELEY et al., 1980).

A viscosidade depende da concentração, temperatura, presença de outros polímeros, tipo e massa molar da carragenana. A baixa temperatura e concentrações ideais de sais, as carragenanas geleificam, com o aumento da viscosidade aparente. Este comportamento é particularmente verdadeiro para

cátions considerados fortes indutores de gel, como sódio e cálcio (PICULELL, 1995).

A viscosidade diminui com o aumento da temperatura, novamente em uma mudança exponencial. Esse processo é reversível, contanto que, o aquecimento não seja prolongado até um ponto onde significativa degradação térmica ocorra. No resfriamento, no entanto, a viscosidade aparente dessas carragenanas aumenta abruptamente quando o ponto de geleificação é alcançado, desde que os contra-íons (K⁺ e Ca⁺⁺) que promovem a geleificação estejam presentes (LAPASIN e PRICL, 1995b).

Sabe-se que a grande maioria das substâncias não apresenta comportamento nem de sólidos ideais (Hookeano), nem de líquidos ideais (Newtonianos) (BARNES et al., 1989, LAPASIN e PRICIL, 1995a). Eles exibem ambos os comportamentos, elástico e viscoso e são então denominados de materiais viscoelásticos.

Fluidos viscoelásticos: Muitos produtos alimentícios não são líquidos puros ou sólidos puros, mas possuem propriedades reológicas que são parcialmente viscosas e parcialmente elásticas (MCCLEMENTS, 2005). Quase todas as soluções, de polímeros, mesmo diluídas, apresentam comportamento viscoelástico, e muitas vezes, este comportamento não é detectado por instrumentos não preparados para essas medidas.

Para um sólido Hookeano, a tensão aplicada a uma superfície resulta em uma deformação instantânea, a energia é totalmente armazenada. A deformação nesse caso é proporcional à tensão, ou seja, tensão e deformação estão em fase (diferença de ângulo entre tensão e deformação de 0°) (REES 1969).

Para um líquido Newtoniano a tensão não é proporcional a deformação (fora de fase 90°), e sim proporcional a taxa de cisalhamento. Quando um sistema viscoso ideal é deformado sob uma força externa, a energia é totalmente perdida (REES 1969). Então, se for medido o ângulo de fase entre tensão e deformação, teremos uma medida do grau do comportamento sólido ou líquido, quantificados através do módulo de cisalhamento de estocagem ou rigidez G' e módulo de perda ou viscoso G' (REES 1969).

Para a melhor compreensão desses módulos é importante entender alguns conceitos, entre eles o módulo de cisalhamento complexo (G^{*}) que representa a resistência total a deformação do sistema, o qual é definido como:

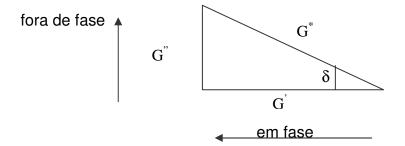
$$G^* = \sigma^0 / \gamma^0 \tag{5}$$

Onde σ^0 e γ^0 representam a tensão total e deformação total do sistema. O módulo complexo pode ser subdividido em dois componentes:

$$G^* = G' + G'' \tag{6}$$

Onde G' é o módulo elástico e o G" o módulo viscoso (NAÉ, 1993).

Geometricamente os componentes do módulo complexo (G^*) , módulo elástico (G^*) e módulo viscoso (G^*) são obtidos pelo triângulo:



Então o ângulo de fase pode ser calculado matematicamente por:

Tan
$$\delta = G''/G'$$
 (7)

Ou seja, a tangente de δ é uma forma de relacionar o teor de energia perdida e armazenada.

Para um sólido puramente elástico, o G' é igual a zero, e o módulo de armazenamento (G') é igual ao módulo de cisalhamento complexo (G*), o ângulo de fase é igual a zero, ou seja, toda a energia aplicada ao sistema é armazenada a cada ciclo.

$$G^* = G' \tag{8}$$

Já, para um fluído Newtoniano, a viscosidade dinâmica (η^*) é igual ao módulo de perda (G") e ao módulo de cisalhamento complexo (G*), o ângulo de fase é igual a 90 °, ou seja, toda energia aplicada ao sistema é dissipada na forma de calor.

$$G^*=G^*=\eta^* \tag{9}$$

A viscosidade dinâmica é uma análoga da viscosidade absoluta, porém a taxa de cisalhamento é substituída pela velocidade angular, assim:

$$\eta^* = \sigma^0 / \omega \tag{10}$$

As propriedades reológicas podem ser caracterizadas em dois tipos de sistemas não oscilatórios (a viscosidade absoluta é uma relação entre a tensão e taxa de cisalhamento) e oscilatórios (a viscosidade é dependente do módulo elástico e viscoso), denominada então de viscosidade complexa (LAPASIN e PRICIL, 1995a).

Quando se fala em análises em sistemas oscilatórios uma das técnicas mais importantes é a análise em sistemas viscoelásticos lineares, onde uma tensão oscilatória é aplicada à amostra e a resistência à deformação é medida, e mostra-se independente da tensão. Há uma independência do módulo de cisalhamento complexo (G*), da tensão aplicada ou da deformação. Geralmente, assumem-se como ideais deformações abaixo de 10%. A interação entre as partículas na solução determina se o sistema é elástico ou viscoso. Medidas dos

módulos (G'e G") em função da freqüência oscilatória sob uma tensão constante na faixa viscoelástica linear, fornecem um entendimento destas interações.

Para géis verdadeiros não basta o G' ser superior ao G" é importante observar a relação destes dois módulos onde a relação G'/G" possua relação 1:2 e ambos mostrem pequena dependência da frequência (LAPASIN e PRICL, 1995a).

1.7. GALACTANAS SULFATADAS COMO COMPOSTOS BIOLOGICAMENTE ATIVOS: ATIVIDADE ANTIVIRAL

Entre as principais atividades biológicas desempenhadas pelas galactanas sulfatadas estão as anticoagulante e antiviral. A atividade anticoagulante para esses compostos foi inicialmente descrita por CHARGAFF et al., (1936), e, atualmente, vários trabalhos relatam este tipo de atividade (CARLUCCI et al., 1997; CACERES et al., 2000; FARIAS et al., 2000; PEREIRA et al., 2002). Atividades antioxidante (ZHANG et al., 2003), antitumoral, e anti-angiogênica (SATORU et al., 2003) também têm sido relatadas.

Esses polissacarídeos naturalmente sulfatados obtidos de algas marinhas, especialmente os que são extraídos de algas vermelhas (carragenanas, agaranas e xilomananas sulfatadas) são reconhecidos como inibidores seletivos de vários tipos de vírus envelopados. Entre eles, estão incluídos os retrovírus (HIV tipo 1 e 2), herpes simplex vírus (HSV-1 e 2) também denominados herpes vírus hominis, citomegalovírus humano (HCMV), flavivírus (vírus da dengue tipo 2), hepadnavírus (vírus da hepatite B (HBV), orthomyxovírus (vírus da influenza A (InfA), entre outros (BABA et al., 1988).

Pertencente à família *Herpesviridae* foram, até o momento, isolados oito herpes-vírus em humanos: herpes simplex vírus 1 e 2 (HSV-1 e HSV-2), o vírus varicela-zoster (VZV), o citomegalovírus humano (HCMV), o vírus Epstein-Barr (EBV) e os herpesvírus humanos 6, 7 e 8 (HHV6, HHV7 e HHV8). Todos são formados por DNA e sua principal propriedade é a capacidade típica de se tornarem latente no organismo, provocando infecções repetidas. Ambos HSV-1 e

2 associam-se geralmente a lesões cutâneas faciais, oftálmicas ou genitais. O homem é o hospedeiro natural do herpes simplex vírus (WITVROUW et al., 1994).

Este vírus possui quatro componentes estruturais (i) um "core" interior onde está a estrutura helicoidal de DNA, (ii) o capsídeo icosaédrico envolvendo o "core", que é envolvido pelo (iii) tegumento ou matriz amorfa e (iv) a membrana, constituída pela bicamada lipídica que contém as glicoproteínas (SHIEH et al., 1992).

O ciclo de replicação viral da família *Herpesviridae* pode ser dividido em várias etapas (ROIZMAN e SEARS 1993), ainda que algumas características sejam comuns a todos os vírus envelopados.

Tem sido demonstrado que as glicoproteínas gC ou gB presentes no envelope viral estão envolvidas na fase inicial da ligação do vírus, interagindo com o heparan sulfato da superfície da célula alvo (HEROLD et al., 1994). Esta interação facilita a ligação da glicoproteína gD do envelope viral aos receptores HVEM (herpes vírus entry mediators). Este processo de ligação permite a penetração do vírus na célula por fusão do envelope viral com a membrana plasmática celular, permitindo a entrada do DNA viral.

O efeito inibitório das substâncias polianiônicas na replicação do herpes simplex vírus (HSV) e outros vírus envelopados vêm sendo relatados há quase 50 anos. Em 1958, GERBER et al relataram que polissacarídeos de algas exibiram atividade antiviral contra o vírus da caxumba e vírus influenza B. Em 1977, EHRESMANN et al. associaram a inibição do herpes simplex e outras viroses com frações polissacarídicas extraídas de dez espécies de algas vermelhas; observações semelhantes foram feitas por RICHARDS et al. (1978). Na década de 80 NAKASHIMA et al. (1987 a e b) relataram inibição da transcriptase reversa do HIV por polissacarídeos sulfatados da alga vermelha *Schizymenia pacifica*.

Entre vários trabalhos, em 1997 CARLUCCI et al demonstraram que as lambda-carragenanas e as parcialmente ciclizadas mu/nu-carragenanas de *Gigartina skottsbergii* foram os mais potentes inibidores do HSV, mesmo contra cepas variantes resistentes ao aciclovir (cepa TK⁻), apresentando valores de IC₅₀ menores que 1,0 μg/mL contra ambos os sorotipos. Foi observada uma relação

direta entre a atividade antiherpética e a quantidade de unidades α -D-galactose 2,6-disulfato nas carragenanas nativas, uma vez que a ciclização dessas unidades, realizada por tratamento alcalino, diminuiu a atividade antiherpética em relação aos polissacarídeos nativos.

A estrutura química da lambda-carragenana parece ser a responsável pelo seu comportamento diferencial em relação à kappa/iota- e mu/nu-carragenanas, provavelmente permitindo uma ligação mais estável ao HSV, levando a sua inativação. Estas galactanas interferem na interação das glicoproteínas virais (gB e/ou gC) com os receptores na membrana da célula inibindo a interação vírus-célula (CARLUCCI et al., 1999).

Em colaboração com o grupo de Virologia do Departamento de Química Biológica da Universidade de Buenos Aires, o laboratório de Química de Carboidratos de Algas Marinhas da UFPR tem avaliado a atividade antiherpética de galactanas sulfatadas.

As agaranas de *Acanthophora spicifera* (DUARTE et al., 2004) apresentam suas unidades A principalmente sulfatadas em C-2, enquanto as unidades B estão na forma precursora (α-L-galactose 6-sulfato) ou na forma de 3,6-anidro-α-L-galactose. Estas agaranas apresentam seletiva e potente atividade contra as cepas HSV-1 e HSV-2, sendo desprovidas de atividade citotóxica contra células Vero (células de rim de macaco verde Africano) até a concentração de 1000 μg/mL. Assim como em outras galactanas sulfatadas, o efeito inibitório das agaranas de *Acanthophora spicifera* deve-se à inibição da adesão do vírus a célula hospedeira, impedindo a entrada do mesmo. A etapa inicial de adesão inicia-se pela interação de glicoproteínas do envelope viral (gC ou gB) com o heparan sulfato (HS) da célula do hospedeiro (WUDUNN e SPEAR, 1989; LYCKE et al., 1991; SHIEH et al., 1992).

A família *Flaviviridae* é formada por vários gêneros: flavivirus, hepacivirus e pestivirus e um grupo de vírus não classificados. Dentro desta família estão compreendidos os vírus da febre amarela (YF) e o vírus da dengue (DENV) entre outros (HEINZ e ALISSON, 2001). Essas enfermidades são transmitidas por mosquitos e são infecções consideradas reemergentes, pelo aumento da

incidência observado nos últimos anos. No Brasil, a mais importante infecção foi no Rio de Janeiro (1986/1987), na qual foi estimado que 1 milhão de pessoas foram infectadas pela dengue sorotipo 1 (BRASIL, 2002).

O vírus da dengue apresenta uma forma esférica, com um diâmetro aproximado de 50 nm. O genoma viral, dentro do nucleocapsídeo, consiste de uma cadeia de RNA. Esse vírus apresenta a proteína do nucleocapsídeo V2/C associada ao RNA viral. O nucleocapsídeo está envolvido por uma bicamada lipídica que interage com uma proteína glicosilada transmembranal denominada V3/E. Essa proteína é considerada a responsável pelas principais atividades biológicas do vírus como: hemoaglutinação, neutralização e união a receptores celulares. A localização da proteína V1/M não está clara, mas acredita-se que seja uma proteína integral de membrana que interage com a proteína V3/E, assim como o complexo RNA-proteína V2/C (HEINZ e ALISSON, 2001).

Dependendo das características moleculares quatro sorotipos de vírus da dengue estão descritos (DENV 1 – 4) (GUBLER, 1998). Esse *flavivirus* também se liga ao heparan sulfato presente na célula do hospedeiro para iniciar o processo de infecção (CHEN et al., 1997).

A dengue é uma enfermidade associada a regiões tropicais e subtropicais em todo o mundo. A enfermidade apresenta um ciclo de transmissão que tem início no homem infectado pelo mosquito (fêmea) *Aedes aegypti*. Após a ingestão de sangue infectado, transcorre, no inseto, um período de incubação intrínseca que pode variar de 8 a 12 dias. Após esse período, o mosquito torna-se apto para transmitir o vírus e assim permanece durante toda sua vida. No homem, o período entre a picada infectante e o aparecimento de sintomas (período de incubação) pode variar de 3 a 15 dias, sendo, em média, de 5 a 6 dias. Posteriormente ocorre o período de transmissibilidade quando houver vírus no sangue (período de viremia). Este período começa um dia antes do aparecimento dos sintomas e vai até o 6º dia da doença (HENCHAL e PUNTNAK, 1990).

A maioria das infecções por dengue é relativamente amena, caracterizada por um rápido início de febre e sintomas não específicos, incluindo dor de cabeça frontal, dor retro-orbital, dores no corpo, náusea e vômito, dores nas articulações,

fraqueza e erupções na pele (GUBLER, 1998). Com o aumento da co-circulação de diferentes sorotipos da dengue febre hemorrágica (DFH) e síndrome do choque da dengue (SCD) a incidência de epidemias com taxas de mortalidade em torno de 1-5% tem sido muito maior (HOLMES e BURCH, 2000).

Na febre hemorrágica da dengue (FHD) os sintomas iniciais são semelhantes aos do dengue clássico, porém rapidamente evoluem para manifestações hemorrágicas. A definição de caso de FHD, de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), consiste nos seguintes critérios: febre, manifestações hemorrágicas e hemoconcentração: hemotócríto aumentado em 20% ou mais, ou evidência objetiva de aumento da permeabilidade capilar.

Até o momento não existe nenhuma terapia antiviral para o tratamento de dengue e muitos aspectos dos mecanismos de ação envolvidos com a atividade antiviral dos polissacarídeos sulfatados ainda não foram explorados (FIGUEIREDO, 2000).

A Tabela 7 demonstra algumas algas cujos polissacarídeos naturalmente sulfatados apresentam atividade antiviral.

TABELA 7. ATIVIDADE ANTIVIRAL DE POLISSACARÍDEOS SULFATADOS OBTIDOS DE ALGAS VERMELHAS.

Algas	Polissacarídeos	Vírus	Referência	
Aghardiella tenera	Agaranas sulfatadas	HIV-1, HIV-2, HSV- 1, HSV-2, HCMV, VSV, Vacinia, Togavirus, Parainfluenza	WITVROUW et al., 1994	
Asparagopsis armata	Agaranas sulfatadas	HIV-1	HASLIN et al., 2001	
Acanthophora spicifera	Agaranas sulfatadas	HSV-1 e HSV-2	DUARTE et al., 2004	
Bostrychia montagnei	Agaranas sulfatadas	HSV-1, HSV-2	DUARTE et al., 2001	
Cryptopleura ramosa	Agaranas sulfatadas	SV-1, HSV-2	CARLUCCI et al., 1997	
Gigartina skottsbergii	carragenanas lambda, κ-/ι- e ν-/μ	HSV-1, HSV-2	CARLUCCI et al., 1997; 1999	
Gracilaria corticata	Agaranas sulfatadas	HSV-1, HSV-2	MAZUMDER et al., 2002	
Gymnogongrus torulosus	DL-galactanas híbridas	HSV-2 e DEN-2	PUJOL et al., 2002	
Nothogenia fastigiata	xilomananas e xilogalactanas	HIV-1, HIV-2, SIV, HSV-1, HSV-2, HCMV, InfA, RSV,	KOLENDER et al., 1995	
Pterocladiella capilaceae	Agaranas sulfatadas	HSV-1, HSV-2	PUJOL et al., 1996	
Schizymenia pacifica	carragenanas lambda	HIV-1, AMV	NAKASHIMA et al., 1987a	
Schizymenia dubai	galactanas sulfatadas com ácidos urônicos	HIV-1, HSV-1, HSV-2, VSV	BOURGOUGNON et al., 1993	
Stenograme interrupta	Carragenanas	HSV-1, HSV-2	CÁCERES et al., 2000	

Para que uma substância seja considerada um agente antiviral, ela deve possuir seletividade e ser capaz de inibir a replicação viral sem alterar as funções da célula do hospedeiro. Neste contexto, é desejável encontrar uma droga que tenha um perfil aceitável de efeitos secundários. Até o momento os melhores resultados de atividade antiviral foram obtidos com compostos análogos de nucleosídeos. Estes compostos, porém, não podiam ser utilizados em tratamentos sistêmicos devido a sua baixa seletividade, pois exerciam seu efeito tanto na DNA polimerase viral quanto na celular.

Em 1977, foi descoberto o aciclovir (9-[2-(hidroxietoxi)-metil] guanina), que é um análogo da guanosina, porém com uma cadeia acíclica no lugar do ciclo completo de ribose, muito utilizado como composto antiherpético (FURMAN et al., 1980).

O aciclovir difundi-se livremente através das células e apresenta potente atividade seletiva sobre as células infectadas, pois só é ativado para sua forma fosforilada pela timidinaquinase e DNA-polimerase viral, o que lhe confere alto índice de segurança no uso clínico. Durante a replicação do DNA, o aciclovir trifosfato compete com o substrato natural dGTP pela DNA polimerase e é incorporado ao DNA em formação, uma vez que ele apresenta maior afinidade pela enzima. A forma trifosfato ativa se encontra em concentrações 40 a 100 vezes maiores nas células infectadas que nas células sadias, inibindo a replicação do DNA viral e produzindo poucos efeitos colaterais (O'BRIEN, e CAMPOLI-RICHARDS, 1989).

Apesar desta droga ser efetiva na redução da severidade das infecções por HSV, o aparecimento de mutantes resistentes durante os tratamentos prolongados é uma das razões que justifica a busca contínua de novos agentes antivirais. Atualmente estão disponíveis três derivados do aciclovir aprovados para uso clínico: ganciclovir, famciclovir e valaciclovir (BALFOUR et al., 1999).

Para o vírus da dengue, até o momento, nenhuma terapia antiviral está estabelecida. ONO et al (2003) demonstraram que galactomananas submetidas à sulfatação apresentaram atividade *in vitro* e *in vivo* contra o vírus da dengue e febre amarela. O interesse na atividade antiviral dos polissacarídeos naturalmente

sulfatados de algas marinhas aumenta, pois eles podem ser obtidos em altas quantidades, baixo custo, baixa toxicidade e em alguns casos há perda do seu efeito anticoagulante (DAMONTE et al., 2004).

Todos esses dados demonstram que o desenvolvimento de pesquisas voltadas para determinação da estrutura química fina destes polímeros naturais é muito importante tanto para a correta aplicação industrial nos diferentes setores, quanto, para a avaliação das potenciais ações biológicas. Essas pesquisas podem contribuir para identificação de novas e promissoras fontes desses polímeros, cada vez mais importantes economicamente.

2.0. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Este trabalho tem como objetivo geral determinar a estrutura química fina de galactanas sulfatadas isoladas das algas marinhas *Meristiella gelidium* (Solieriaceae) e *Gymnogongrus griffthisae* (Phyllophoraceae), avaliar suas propriedades reológicas e atividade antiviral.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1. Extrair e purificar os polissacarídeos solúveis em meio aquoso (a 25 °C e a 100 °C).
- 2. Determinar a massa molecular média dos principais polissacarídeos homogêneos por cromatografia de gel permeação (HPSEC-MALLS).
- 3. Determinar a estrutura química fina dos principais polissacarídeos por métodos químicos e espectroscópicos.
- 4. Avaliar as propriedades reológicas das carragenanas de *M. gelidium* isoladamente e em combinação com diferentes amidos frente a distintos modos de preparo variando temperatura e sal.
- 5. Correlacionar a atividade antiherpética e antidengue com a estrutura química das galactanas de *M. gelidium* e *G. griffithsiae*.

3.0. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. ESPÉCIES ESTUDADAS E SEUS POSICIONAMENTOS SISTEMÁTICOS

As espécies estudadas neste trabalho foram as algas *Meristiella gelidium* e *Gymnogongrus griffithsiae*.

Divisão: Rhodophyta

Classe: Rhodophyceae

Ordem: Gigartinales

Família: Solieriaceae Gênero: *Meristiella*

Espécie: Meristiella gelidium (J. Agardh)

Divisão: Rhodophyta

Classe: Rhodophyceae

Ordem: Gigartinales

Família: Phyllophoraceae Gênero: *Gymnogongrus*

Espécie: Gymnogongrus griffithsiae (Turner) Martius

3.2. COLETA E PROCESSAMENTO

A alga *Meristiella gelidium* foi coletada na praia de Pitimbu, no estado da Paraíba em março de 2002 e a alga *Gymnogongrus griffithsiae*, na ilha do Farol na praia de Caiobá – Paraná, em 2004. As algas foram classificadas pela Dr^a Silvia Maria Pita de Beuclair Guimarães do Instituto de Botânica/SP.

Exemplares da espécie *M. gellidium* e *G. griffithsiae* estão depositados no Herbário da UFPR, Departamento de Botânica, sob o número UPCB- 46434 e 46433, respectivamente.

Os exemplares das duas espécies foram lavados com água corrente, secos a temperatura ambiente (à sombra) e moídos em moinho de faca (WILEY MILL). As algas secas e moídas foram submetidas ao processo de extração descrito a seguir.

3.3. EXTRAÇÃO DAS GALACTANAS DE Meristiella gelidium E Gymnogongrus griffithsiae

As algas *Meristiella gelidium* e *Gymnogongrus griffithsiae* secas e moídas foram submetidas à extração aquosa (1,0% p/v) sob agitação mecânica à 25°C, por 15 horas. Os extratos foram centrifugados (10.000 xg por 5 minutos), obtendose um resíduo e um sobrenadante. Ao sobrenadante foi adicionado etanol (3 volumes). Os resíduos foram novamente submetidos à extração aquosa a 25°C, como descrito anteriormente. Os precipitados etanólicos das duas extrações aquosas a 25°C foram separadamente ressolubilizados em água destilada, dialisados contra água destilada e liofilizados. As frações polissacarídicas obtidas de *M. gelidium* e *G. griffithsiae* foram denominadas de M1-M2 e G1-G2, respectivamente.

Os respectivos resíduos da última extração aquosa a 25°C foram suspensos em água sob agitação mecânica, a 100°C por 3 horas. Após centrifugação (10.000 xg por 10 minutos), aos sobrenadantes foi adicionado etanol (3 volumes). O precipitado obtido, após centrifugação, foi ressolubilizado em água, dialisado e liofilizado originando os extratos G3 para *G. griffthsiae* e M3 para *M. gelidium.* O processo de extração a 100 °C foi repetido por mais duas vezes para a alga *M. gelidum*, originando as frações M4 eM5.

3.4. FRACIONAMENTO E CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL

3.4.1. MÉTODOS ANALÍTICOS GERAIS

- 3.4.1.1 A dosagem de açúcar total foi realizada pelo método do fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS et al. 1956), com sensibilidade entre 10-100 μ g/ml, utilizando-se como padrão galactose na concentração de 70 μ g/mL. A leitura foi realizada no comprimento de onda de 490 nm.
- 3.4.1.2 As dosagens de proteínas foram realizadas pelo método de LOWRY et al. (1951), utilizando-se o reativo de Folin-Ciocalteau e solução de soro-albumina bovina cristalina como padrão na concentração de 40 mg%. A leitura foi realizada no comprimento de onda de 660 nm. A sensibilidade do método é de 5-100 μg.
- 3.4.1.3 O teor de sulfato foi determinado pelo método de DODGSON (1961). Após hidrólise das amostras com HCl 1 M, 5 horas, 105°C, foi adicionado o reativo gelatina-bário (neste reativo o cloreto de bário foi solubilizado na gelatina), formando posteriormente o sulfato de bário, que permanece suspenso. Como padrão foi utilizado solução de sulfato de sódio na concentração de 1 mg/mL, diluído em HCl 1M. A leitura foi realizada no comprimento de onda de 360 nm. A sensibilidade do método está na faixa de 20-200 µg de sulfato.
- 3.4.1.4 O conteúdo de 3,6-anidrogalactose foi determinado pelo método fotocolorimétrico do resorcinol (YAPHE, 1960).
- 3.4.1.5 A determinação da rotação óptica específica ($[\alpha]_D$) foi realizada em polarímetro RUDOLPH RESEARCH, modelo Autoplol III, a 20°C, com as amostras na concentração de 0,2 g% em água.

3.4.2. PRECIPITAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS COM KCI

As frações M1-M3 de *M. gelidium* e G3 de *G. griffithsiae* foram solubilizadas em água destilada 0,20% p/v), (0,25% p/v), respectivamente e submetidas a fracionamento com KCI utilizando concentrações crescentes (0 − 2,0 M), com adição de 0,1 em 0,1 M até concentração final de 2,0 M. Após cada adição as amostras foram mantidas em repouso durante 16 horas a 4°C. Os extratos polissacarídicos foram centrifugados, e os sobrenadantes e precipitados dialisados contra água destilada e liofilizados. Os polissacarídeos insolúveis de *M. gelidium* foram denominados M1a (1,0−1,2 M); M2a (0−0,1 M); M2b (1,0−1,2 M) e M3a (1,0−1,2 M). O fluoxograma de precipitação da fração G3 e obtenção da fração G3d (utilizada para avaliação antiviral) está descrito na Figura 48 (B) (pág. 145). Os polissacarídeos solúveis em KCl 2,0 M obtidos a partir das frações M1, M2, M3 e G3 foram denominados de M1S, M2S, M3S e G3S, respectivamente.

3.4.3. PURIFICAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS DE *M. gelidium* POR CROMATOGRAFIA DE TROCA-IÔNICA.

A fração polissacarídica M3S, solúvel em KCl 2,0 M, foi submetida à fracionamento por meio de cromatografia de troca-iônica em coluna contendo DEAE-Sephacel utilizando como eluentes água e soluções de NaCl de molaridade crescente. A eluição foi monitorada pelo teste de fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS et al., 1956).

Foram obtidas de *M. gelidum* as frações denominadas M3S-1, M3S-2, M3S-3, M3S-4, M3S-5 e M3S-6, as quais foram eluídas com água e com NaCl 0,4, 0,6, 0,8, 1,0 e 2,0 M respectivamente (Figura 12, pág.85).

3.4.4. HIDRÓLISE ÁCIDA TOTAL DO TIPO HIDRÓLISE REDUTIVA

A composição monossacarídica foi determinada de acordo com o método de FALSHAW e FURNEAUX (1994), o qual é uma modificação do método original descrito por STEVENSON e FURNEAUX (1991), que se processa em duas etapas:

- Na primeira etapa, é realizada uma pré-hidrólise: 1-2 mg de polissacarídeo foi tratada com ácido trifluoroacético (TFA) na concentração de 3,0 M, e o complexo 4-metil-morfolina borano, agente redutor, o qual possui estabilidade em meio reacional ácido, à temperatura de 90 °C por 15 minutos, com a finalidade de reduzir as unidades de 3,6-anidrogalactopiranose, protegendo-as da degradação em meio ácido.
- Na segunda etapa, a concentração do TFA é ajustada para 2,0 M pela adição da solução do complexo 4-metil-morfolina borano, à temperatura de 120 °C por 90 minutos. Nesta condição há hidrólise das ligações glicosídicas envolvendo as demais unidades constituintes do polissacarídeo, as quais por sua vez serão também reduzidas.

Os correspondentes alditóis foram acetilados (anidrido acético/TFA concentrado na proporção de 2:1) e analisados na forma de acetatos de alditóis por cromatografia líquido-gasosa (CG) e/ou CG-EM (cromatografia líquido-gasosa - espectrometria de massa).

3.4.5. HIDRÓLISE ÁCIDA TOTAL

Com o objetivo de diferenciar os derivados naturais 3- e 4-*O*-metilgalactose, 1-2 mg de polissacarídeo foi submetido seqüencialmente a hidrólise ácida total (ácido fórmico 45 %, 100 °C, 16 h), redução com NaBD₄ (12 h) e acetilação (anidrido acético 0,4 g %, 120 °C, 1,5 h), seguida por análise por CG-EM.

3.4.6. METILAÇÃO

O processo de metilação dos polissacarídeos na forma de sal de trietilamônio foi conduzido de acordo com o método de CIUCANU e KEREK (1984). Após solubilização em DMSO (1 mL para cada 15 mg de polissacarídeo) foi adicionado NaOH pulverizado (30 mg) e após agitação mecânica vigorosa (30 minutos), foi adicionado iodometano (0,1 mL) sob agitação mecânica vigorosa (30 minutos). Este processo (adição de NaOH e iodometano) foi repetido por mais 2 vezes completando-se assim uma etapa de metilação. A cada etapa as frações foram dialisadas e liofilizadas. Após cada etapa de metilação as frações polissacarídicas foram hidrolisadas de acordo com o método de FALSHAW e FURNEAUX (1994), acetiladas (anidrido acético/TFA concentrado, a 50 °C por 15 minutos) e analisadas por CG e/ou CG-EM, na forma de acetatos de alditóis parcialmente metilados.

3.4.7. MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

3.4.7.1. CROMATOGRAFIA LÍQUIDO-GASOSA (GLC)

As análises por cromatografia gasosa foram realizadas em Cromatógrafo HEWLETT PACKARD 5890, com detector de ionização de chama (300 °C) e injetor (250 °C), utilizando nitrogênio como gás de arraste e coluna capilar de sílica fundida (30 m X 0,25 mm d.i.), DB-225 (0,25 μ m), em diferentes temperaturas: análises cromatográficas para acetatos de alditóis foram realizadas à 220 °C, e as amostras de acetatos de alditóis parcialmente *O*-metilados foram realizadas à 210 °C.

3.4.7.2.CROMATOGRAFIA LÍQUIDO-GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSA (GC-MS)

As análises cromatográficas em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa foram realizadas em cromatógrafo a gás "VARIAN", modelo 3.300, acoplado a um espectrômetro de massa de marca FINNIGAN MAT, modelo ITD 800 e/ou VARIAN — SATURN 2000R, equipado com coluna capilar de sílica fundida (30 m X 0,25 d.i.) DB-225, marca J.W. As injeções nas colunas foram feitas mantendo-se a temperatura inicial em 50 °C/min, seguido de aumento de acordo com a programação de temperatura em um gradiente de 40 °C/min, até 230 °C, mantendo-se constante a partir deste valor. Foi utilizado gás hélio como gás de arraste, com fluxo de 1 mL/min. As áreas dos picos de interesse foram determinadas por integração em software. Os espectros de massa foram obtidos por impacto de elétrons a 70 eV, repetidamente a cada 1/8 de segundo, de m/e (relação carga/massa) 80 a 220. Este método foi utilizado para quantificação de acetatos de alditóis (SLONEKER, 1972).

3.4.7.3. CROMATOGRAFIA DE GEL PERMEAÇÃO (HPSEC-MALLS) – ANÁLISE DE HOMOGENEIDADE E MASSA MOLECULAR

Para a análise de homogeneidade e determinação da massa molecular ponderal média (Mw) foi preparada uma solução de 1 mg de amostra em 1mL de solução de nitrito de sódio (NaNO₂ 0,1 M) contendo azida de sódio (NaN₃, 200 ppm). As soluções obtidas foram filtradas em membranas MILLIPORE (acetato de celulose) de 0,45 e 0,22 μm. As análises foram realizadas em HPLC acoplado a detectores de espalhamento de luz e índice de refração, com fluxo de 0,6 mL/min. Para determinação da massa molecular ponderal média utilizou-se o valor de dn/dc (variação do índice de refração com relação à concentração) o qual foi previamente determinado.

As análises de homogeneidade e de determinação do valor de Mw foram realizadas em cromatógrafo de exclusão estérica de alta pressão (HPSEC) WATERS, equipado com um detector de índice de refração diferencial WATERS modelo 2410 e com detector de espalhamento de luz em multiângulos (MALLS) WYATT TECHNOLOGY modelo DAWN DSP com 18 detectores dispostos ao redor da fotocélula em diferentes ângulos. Foram utilizadas 4 colunas de gel permeação WATERS, com limites de exclusão de 1.10⁶, 4.10⁵, 8.10⁴ e 5.10³, em série. O eluente utilizado foi uma solução de (NaNO₃ 0,1 M) contendo NaN₃ (200 ppm), pressão de 920 psi a 20°C. Foi utilizado o programa ASTRA (WYATT TECHNOLOGY), para analisar os dados obtidos.

Para determinação do dn/dc soluções 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1,0 mg foram preparadas a partir de uma solução mãe 1,0 mg da amostra em 1 mL de NaNO $_3$ 0,1 M e azida de sódio (NaN $_3$) 200 ppm, previamente filtradas em membrana Millipore 0,45 μ m. As análises foram realizadas utilizando índice de refração, com fluxo de 0,6 mL/min e pressão de 67 psi a 20 °C.

3.4.8. DESSULFATAÇÃO POR TRATAMENTO SOLVOLÍTICO

3.4.8.1. PREPARO DO SAL DE PIRIDÔNIO

O processo de solvólise foi conduzido com os polissacarídeos (M3S-3 e M3S-4) na forma de sal de piridônio. Este sal foi formado por meio da solubilização das frações em água e então foi adicionada resina catiônica DOWEX 50x8 na forma H⁺, sob agitação magnética a 25 °C por 30 minutos. O pH do sobrenadante ficou entre 1-2. O filtrado (obtido por filtração à pressão reduzida) foi neutralizado (em capela) com piridina, até pH 7,0 e liofilizado (NAGASAWA et al., 1979).

3.4.8.2. SOLVÓLISE

O polissacarídeo, na forma de sal de piridônio, foi solubilizado em uma mistura de dimetilsulfóxido, metanol e piridina, cuja proporção foi de 89:10:1 v/v/v, respectivamente, respeitando-se a relação de 10 mg de polissacarídeo para 3 mL de mistura (NAGASAWA et al., 1979).

A solução resultante foi mantida a 100ºC durante 4 horas. Após o resfriamento, a fração solvolisada foi submetida à diálise exaustiva contra água destilada e liofilizada. O polissacarídeo dessulfatado foi submetido à metilação conforme descrito no item 3.4.8.

3.4.9. TRATAMENTO ALCALINO

Aos polissacarídeos M1a e M3a (50 mg) previamente solubilizados em água destilada (0,2 g%), foi adicionado borohidreto de sódio (10 % em relação à massa do polissacarídeo). Após repouso de 17 horas a 4ºC, adicionou-se hidróxido de sódio 3,0 M (concentração final 1,0 M) e a mistura foi mantida em banho termostatizado a 80ºC por 2 horas (NOSEDA e CEREZO, 1995).

A reação foi monitorada pela determinação do teor de 3,6-anidrogalactose, até alcançar valor constante, pelo método do resorcinol (YAPHE, 1960).

Após resfriamento, diálise e liofilização, as amostras foram submetidas à hidrólise redutiva segundo FALSHAW e FURNEAUX (1994), e analisadas por CG e/ou CG-EM na forma de acetatos de alditóis.

3.4.10. MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS

3.4.10.1. RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

Χ

As análises de ressonância magnética nuclear (RMN) monodimensionais foram realizadas em espectroscópio da marca BRUKER, modelo DRX 400, série Avance, em probe de diâmetro externo de 5 mm, com as amostras dissolvidas em água deuterada (D_2O), a temperatura de 50 ou $70^{\circ}C$. Os deslocamentos químicos, expressos em δ (ppm), foram determinados utilizando acetona como padrão interno para as análises de ^{13}C (δ = 30,2 ppm).

Os espectros de RMN - ¹³C foram obtidos na freqüência base de 100,61 MHz, com intervalo de aquisição de sinal de 0,6 segundos, sendo feitas de 4.000 – 100.000 aquisições, utilizando-se um intervalo de 0,1 segundo entre os pulsos.

3.4.10.2. ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FT-IR)

Os espectros FT-IR foram obtidos pelo uso de espectrômetro BOMMEN, modelo MB-100, incorporado a Transformada de Fourier. As amostras (2 mg) foram homogeneizadas com brometo de potássio (KBr) e analisadas sob a forma de pastilhas.

As análises de FT-IR foram realizadas no Departamento de Química da UFPR.

3.5. ANÁLISES REOLÓGICAS

As análises reológicas foram realizadas em colaboração com a Prof^a. Dr^a. Maria Rita Sierakowski do Laboratório de Biopolímeros, Departamento de Química da Universidade Federal do Paraná.

3.5.1. PREPARO DAS GALACTANAS SULFATADAS

Para as análises reológicas oscilatórias, as galactanas sulfatadas M1 e M3a de *M. gelidium* foram solubilizadas na concentração de 10 g/L na presença de 120 mM de KCl. As amostras foram mantidas sob agitação mecânica a 25°C durante 4 horas.

3.5.2. PREPARO DOS AMIDOS

Os amidos de milho comum (CS), amilose (MS), amilopectina (WS) e amido de Cará (YS) na concentração de 25 g/L foram transformados em pasta por dispersão em água destilada durante 1 hora e 30 minutos a 25°C, seguida de autoclavação (120°C) por 30 minutos e refrigeração por 18 horas, exceto para a amostra de amido de Cará que também foi dispersa em água, 1 hora e meia a 85°C, na ausência e presença de 120 mM de KCI. O cloreto de sódio foi escolhido por ser o sal utilizado para obtenção das carragenanas pelo método original (processo geleificante).

3.5.3. PREPARO DAS MISTURAS DE POLISSACARÍDEOS

Em todas as análises as concentrações utilizadas foram: galactana (5 g/L) e amidos (20g/L). As amostras foram preparadas em volume final de 10 ml, para as concentrações desejadas foram adicionadas 50 mg da galactana e 200 mg do amido. A galactana foi solubilizada em água (10 ml) sob dispersão mecânica a 25°C durante 30 minutos. Posteriormente o amido foi dissolvido na solução de galactana e o sistema mantido sob agitação (dispersão mecânica) a 25°C durante 1 hora. Em seguida, as misturas foram autoclavadas durante 30 minutos. As misturas obtidas após refrigeração a 4°C por 18 horas foram analisadas.

Somente com o amido de cará foi avaliada a influência da galactana em função da (i) presença de sal (KCl) e (ii) da temperatura (pré-aquecimento = dispersão mecânica a 85 °C).

Dispersão mecânica a 25°C sem KCl 120 mM: já citado anteriormente.

- (i) Dispersão mecânica a 25°C com KCl 120 mM: o modo de preparo é o mesmo com a exceção de que a galactana foi solubilizada em solução de KCl 120 mM sob dispersão mecânica a 25°C durante 30 minutos. Posteriormente o amido foi adicionado e o sistema mantido sob agitação a mesma temperatura durante 1 hora. Em seguida as misturas foram autoclavadas durante 30 minutos. A mistura obtida após refrigeração a 4°C por 18 horas foi analisada
- (ii) Dispersão mecânica a 85°C sem KCl 120 mM: o amido de cará foi adicionado à galactana, previamente dissolvida em solução aquosa por 30 minutos. A mistura foi mantida sob dispersão mecânica em banho maria a 85°C por 1 hora seguido de autoclavação por 30 minutos e refrigeração durante 14 horas.
- (ii e i) Dispersão a 85°C com KCl 120 mM: o processo é o mesmo descrito acima, porém a galactana foi previamente dissolvida em solução de KCl 120 mM por 30 minutos.

3.5.4. ANÁLISES EM SISTEMA DINÂMICO

As amostras foram preparadas conforme descrito no item 3.5.1 e as medidas em sistema dinâmico foram realizadas em reômetro oscilatório HAAKE, modelo RS 75, utilizando sistema peltier para controle de temperatura. Os sensores coneplaca C60/2° Ti e pp 35/Ti foram utilizados nas análises.

3.5.5. DETERMINAÇÃO DO COMPORTAMENTO VISCOELÁSTICO LINEAR

O comportamento viscoelástico linear foi determinado utilizando-se tensões de 0,01 a 10 Pa, em freqüências fixas de 0,01 e 10 Hz. O comportamento viscoelástico foi determinado onde o módulo elástico (G') foi constante em função da tensão fornecida, e com baixos valores de deformação (+/- 10%).

3.5.6. VARREDURA DE FREQÜÊNCIA EM SISTEMA VISCOELÁSTICO LINEAR

Foram realizados experimentos utilizando-se deformação constante de 1%, referente à região de comportamento viscoelástico linear, e freqüências variáveis de 0,05 a 10 Hz. Nessas condições a resposta elástica (G') e viscosa (G"), assim como a viscosidade dinâmica (n*) foram avaliadas.

3.5.7. VARREDURA DE TEMPERATURA

Nas análises de variação de temperatura foi utilizado o sistema "Peltier". Sobre a placa foi utilizada também uma camada de óleo para minimizar o efeito da evaporação do solvente, durante os ciclos de temperatura.

Foram realizadas duas rampas de temperatura (aquecimento e resfriamento). A variação de temperatura foi de 5°C a 85°C com variação de 0,066°C por segundo, em frequência de 1 Hz e deformação de 1%. Foi avaliada a temperatura de fusão da galactana, influência da variação de temperatura no processo de histerese e estabilidade térmica das pastas.

3.5.8. TESTE DE INCHAMENTO DO GEL – SWEELLING

As pastas de (YS 25g/L) e 1-CAR (5g/L) – YS (20 g/L) foram secas (em forma de disco), devidamente pesadas e transferidas para um banho a 25°C. O peso das amostras hidratadas foi determinado após 15 min. Depois desse tempo nenhuma diferença no peso foi observada. O peso dos géis hidratados foi calculado subtraindo o peso do material seco do peso total (POLNOK et al., 2004). O experimento foi repetido três vezes. A taxa de inchamento (Q) foi definida como:

$$Q = \frac{W_s - W_d}{W_d}$$

Onde:

W_s é o peso do material hidratado

W_d é o peso do material seco

3.6. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIHERPÉTICA E ANTIDENGUE DAS GALACTANAS DE *M. gelidium* e *G. griffithsiae*

Os experimentos de atividade antiviral apresentados neste trabalho foram realizados no laboratório de Virologia do Departamento de Química Biológica da Universidade de Buenos Aires (Argentina) pelo grupo da Dr^a. Elsa B. Damonte. O grupo de Química de Carboidratos de algas marinhas da UFPR mantém colaboração científica com o grupo da Dr^a. Elsa B. Damonte fornecendo amostras de carboidratos sulfatados com o intuito de associar os resultados de atividade antiviral com os dados estruturais.

3.6.1. CÉLULAS UTILIZADAS

As células utilizadas para os ensaios antivirais foram as células Vero [(linha de células de rim de macaco verde africano (*Cercopithecus aethiops*)], crescidas em meio essencial mínimo de Eagle (MEM) suplementado com 5% (v/v) de soro bovino fetal e para o meio de manutenção (MM) a concentração de soro bovino fetal foi reduzida para 1,5%. A linha celular C6/36 HT do mosquito *Aedes albopictus* (adaptada para crescimento a 33 °C) foi fornecida pelo Instituto Nacional de Enfermedades Virales Humanas (INEVH) Dr. J. Maiztegui (Pergamino, Argentina), crescida em meio L-15 (Leibovitz) suplementado com 0,3% de triptose fosfato, 0,02% de glutamina, 1% de MEM (solução de aminoácidos não-essenciais) e 5% de soro bovino fetal. A linhagem de células de fibroblastos humano (PH) foi fornecida pelo (CEMIC, Buenos Aires, Argentina) e propagada em meio MEM suplementado com 10% de soro bovino fetal. A linha de

células de hepatoma HepG2 foi fornecida pela Cátedra de Virologia, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires (Buenos Aires, Argentina) e propagada em meio MEM contendo 0,03% de glutamina, 0,01% de piruvato de sódio e 10% de soro bovino fetal.

3.6.2. VÍRUS UTILIZADOS

Os vírus HSV-1 cepa F e HSV-2 cepa G foram obtidos da American Type Culture Collection (Rockiville, USA) e utilizados como cepas de referência. A cepa B2006 é um HSV-1 TK⁻ resistente a aciclovir obtida pelo Professor Dr. E. De Clercq (Intituto Rega, Bélgica). O vírus HSV-2 cepa MS foi fornecido pelo Dr. F. Benencia (Laboratório de Imunoquímica, UBA, Argentina). As variantes (1C3-syn 13-8) e (1C3-syn 14-1) de HSV-1 foram obtidas por passagens seriadas na presença de *mu/nu*-carragenana 1C3 como descrito por CARLUCCI et al. (2002). Os estoques virais foram propagados e titulados pela formação de placas virais em células Vero.

Os vírus DENV-1 cepa Hawaii (obtido de INEVH), DENV-2 cepa NGC, DENV-3 cepa H87 e DENV-4 cepa 8124 foram fornecidos pelo Dr. A.S. Mistchenko (Hospital de Niños Dr. Ricardo Gutiérrez, Buenos Aires, Argentina).

3.6.3. POLISSACARÍDEOS DE *M. gelidium* E *G. griffithsiae* UTILIZADOS NA AVALIAÇÃO ANTIVIRAL

Da alga *M. gelidium* foi avaliada a atividade antiviral das frações polissacarídicas M1, M3 e M3a e da alga *G. griffithsiae* foram avaliadas as frações G3, G3S, G3G, G3S-1, G3S-2, G3S-3, G3S-4, G3S-5, G3S-6 e G3S-7. A fração G3d foi obtida conforme Figura 48 (pág.145/146). As demais frações analisadas foram obtidas previamente por FARIA (2002).

3.6.4. ENSAIO CITOTÓXICO

A viabilidade das células Vero frente às galactanas de M. gellidium e G.

griffthsiae foi medida pelo método do MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-

2,5-difeniltetrazolio]. As culturas, em placas de 96 poços, foram expostas a

diferentes concentrações dos polissacarídeos (com três poços para cada

concentração) e incubadas a 37°C por 1 h. Após este período, 10 µl de MM

contendo MTT (concentração final 5 µg/mL) foi adicionado em cada poço, sendo

as placas virais incubadas a 37°C. Após 2 h de incubação o sobrenadante foi

removido e 200 uL de etanol foi adicionado a cada poco, para solubilizar os

cristais de formazan. Após agitação vigorosa, a absorbância foi medida em leitor

de microplacas a 595 nm. A concentração citotóxica 50% (CC₅₀) foi calculada

como a concentração do polissacarídeo necessária para reduzir a viabilidade

celular em 50% quando comparada ao controle.

3.6.5. FORMAÇÃO DE PLACAS EM CÉLULAS Vero

Células Vero crescidas em monocamada foram infectadas com diluições

seriadas da amostra de vírus e mantidas a 37°C por 1 h com agitação a cada 20

minutos. Após adsorção, os inóculos foram retirados, e as monocamadas cobertas

com meio foram incubadas por 48 h a 37°C, em estufa com ambiente de CO₂.

Após este período o meio foi removido, as células fixadas com formol 10% durante

15 minutos e as monocamadas foram coradas com cristal violeta 1%, o que

permite contar as placas de lise produzidas pelo vírus.

Título (UFP/mL) = n/v.d

UFP: unidades formadoras de placas

n: número médio de placas

v: volume do inóculo

72

d: diluição na qual é possível contar corretamente as placas

Neste ensaio foram também determinados os números de placas de lise produzidos pelo vírus nas células Vero na ausência de qualquer composto, funcionando como controle negativo. O resultado é dado como unidades formadoras de placas (UFP). Este resultado é importante uma vez que a atividade antiviral (determinada posteriormente) expressará a percentagem (em relação ao controle) em que o composto (no caso as galactanas sulfatadas), em uma determinada concentração, reduz o número de placas virais.

3.6.6. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL in vitro

A atividade antiviral das frações polissacarídicas foi avaliada *in vitro* pelo método de redução do número de placas virais.

Monocamadas confluentes de células Vero crescidas sobre multiplacas de 24 poços, foram infectadas com aproximadamente 50 UFP (unidades formadoras de placas) de vírus por poço, na ausência ou presença de diferentes concentrações das frações polissacarídicas. Após 1h de incubação (37°C), os inóculos residuais foram removidos e adicionou-se o MM contendo metilcelulose (0,7% e 1% para HSV e DENV, respectivamente) e a correspondente dose de cada polissacarídeo. As placas foram incubadas a 37°C por 2 dias (HSV) e por 6-12 dias (DENV) de acordo com o sorotipo do vírus, em estufa com ambiente de CO₂. Após este período o meio foi removido e o número de placas virais formadas foi contado como descrito no item 3.6.5. A concentração inibitória 50% (IC₅₀) foi calculada como a concentração do polissacarídeo necessária para reduzir 50% da citopatogenicidade viral quando comparada ao controle. Cada determinação foi executada duas vezes em duplicada.

A atividade contra o vírus da dengue também foi avaliada pelo ensaio de redução do rendimento viral. Células Vero, HepG2, PH e C6/36 HT crescidas em placas de 24 poços foram infectadas com DENV-2 ou DENV-3 a uma multiplicidade de infecção (m o i) de 0,1 na presença de diferentes concentrações

das frações polissacarídicas, dois poços/concentração. Após 48 h de incubação a 37°C (Vero, HepG2 e PH) ou 33°C (C6/36HT) o meio foi removido e o rendimento dos vírus foi determinado pela formação de placas em células Vero. Os valores de IC₅₀ foram calculados como descrito acima.

Para a determinação do efeito do tempo de incubação na atividade antiviral das galactanas sulfatadas, as células Vero crescidas sobre multiplacas de 24 poços foram infectadas com 50 UFP de HSV-1 cepa F, em meio MM na presença ou na ausência de diferentes concentrações de polissacarídeo. Após incubação de 1 h a 4°C, o meio contendo os vírus não adsorvidos foram removidos e as culturas celulares foram lavadas (duas vezes) com PBS. Após adição de 0,5 mL de MM contendo 0,7% de metilcelulose, com ou sem o polissacarídeo, as placas foram incubadas por 48 h a 37°C. Após este período foi realizada a contagem do número de placas virais como descrito no item 3.6.5.

3.6.7. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE VIRUCIDA in vitro

Uma suspensão viral contendo 4 x 10⁵ UFP de HSV-1 cepa F foi incubada (90 min a 37°C) com igual volume de MM na presença de diferentes concentrações das frações polissacarídicas. Como controle foi incubada, nas mesmas condições, a suspensão viral com igual volume de meio MM, porém sem a presença das frações polissacarídicas. As amostras foram então diluídas em MM para determinar a infectividade residual pelo método de formação de placas. A concentração virucida 50% (VC₅₀) expressa a concentração de galactana requerida para inativar em 50% a carga viral total em relação ao controle.

3.6.8. DETERMINAÇÃO DO TEMPO DE ADIÇÃO DAS FRAÇÕES POLISSACARÍDICAS

Para avaliar o efeito do tempo de adição das frações polissacarídicas na sua atividade contra o vírus DENV-2, células Vero crescidas em placas de 24 poços foram infectadas com 100 UFP de DENV-2 em meio MM contendo 20μg/mL de cada fração polissacarídica (tempo zero) ou MM sem fração polissacarídica. Após 1 h de adsorção a 4°C, o meio contendo o vírus não adsorvido foi removido e as culturas de células lavadas duas vezes com PBS. Posteriormente o meio MM com a fração polissacarídica (20μg/mL) foi adicionado imediatamente (tempo zero e 1 hora após infecção (pi) ou em vários tempos após a infecção (de 2 a 10h p i) e incubado a 37°C até 11 h pi. Neste momento os sobrenadantes foram descartados, as monocamadas de células foram lavadas com PBS e recobertas com meio MM contendo 1% de metilcelulose. As placas foram contadas 6 dias após a infecção como descrito no item 3.6.5.

3.6.9. ENSAIO DE ADSORÇÃO VIRAL

As células Vero crescidas em placas de 6 poços foram infectadas com 500 UFP de DENV-2 na presença ou ausência de 20µg/mL das frações polissacarídicas e incubadas durante 0, 15, 30 ou 60 minutos a 4°C. O meio contendo o vírus não adsorvido foi removido, as células lavadas com PBS e recobertas com meio MM contendo 1% de metilcelulose. As placas virais foram contadas como descrito no ensaio do tempo de adição.

3.6.10. ENSAIO DE INTERNALIZAÇÃO VIRAL

As células Vero crescidas em placas de 6 poços foram infectadas com 500 UFP de DENV-2 a 4°C. Após 1 h de adsorção viral, os vírus não adsorvidos foram removidos, as células lavadas com PBS e incubadas a 37°C na presença ou

ausência de 20μg/mL das frações polissacarídicas. Em diferentes tempos após a adsorção (0, 30, 60 e 120 minutos), as células foram lavadas com PBS e tratadas com 0,1 mL de tampão citrato por 1 min para inativar adsorção mas não a internalização do vírus. As células foram então lavadas com PBS e recobertas com meio MM contento 1% de metilcelulose. As placas foram contadas como descrito no item 3.6.5.

4.1. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1.1. ANÁLISES ESTRUTURAIS DOS POLISSACARÍDEOS DA ALGA *Meristiella gelidium* (J. Agardh)

Como citado anteriormente, da alga *M. gelidium* (M) (FIGURA 6) foram obtidas as frações polissacarídicas M1 e M2, (extratos a 25 °C) e M3 – M5 (extratos a 100 °C). O fluxograma de extração está ilustrado na FIGURA 7.

FIGURA 6. FOTO DA ALGA Meristiella gelidium (J. Agardh)

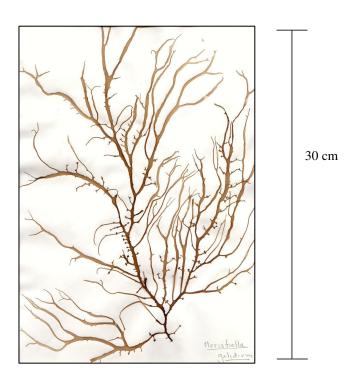
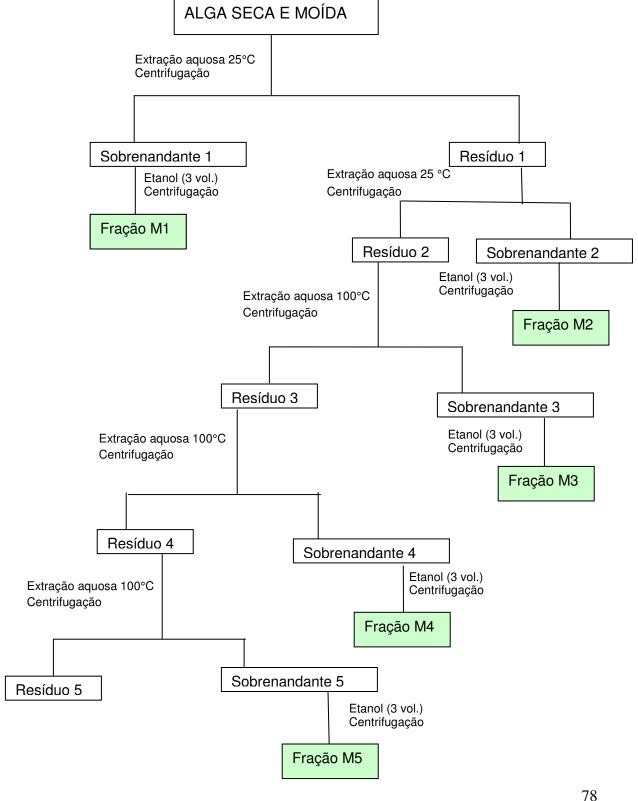


FIGURA 7. FLUXOGRAMA DE EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS DA ALGA VERMELHA Meristiella gelidium.



Os polissacarídeos solúveis em meio aquoso de *M. gelidium* (M1–M5) representaram aproximadamente 50% do material inicial. Esquema de extração semelhante foi utilizado para outras algas da família Solieriaceae ricas em carragenanas *Eucheuma spinosum*, *E. cottonii*, e para as algas da família Gigartinaceae, *Chondrus crispus* e *Gigartina stellata* (BELLION e BRIGAND, 1983). CHIOVITTI et al. (1997) utilizaram somente extração a quente (120°C, 2h) para extrair os polissacarídeos de algas do gênero *Callophycus* (Solieriaceae), porém nessas condições o rendimento permaneceu entre 11–26%.

As análises químicas demonstram que todas as frações brutas M1–M5 são sulfatadas, e os primeiros três extratos obtidos apresentaram semelhante e alta percentagem deste substituinte (29,5–33,1%). Proteína também foi encontrada em todos os extratos, em menor percentagem na fração M3 (TABELA 8).

TABELA 8. RENDIMENTO E ANÁLISE QUÍMICA DAS FRAÇÕES BRUTAS EXTRAÍDAS DA ALGA VERMELHA *Meristiella gelidium*.

Fração	Rendimento	Proteína	Carboidrato	Sulfato	[α] _D
	(%) ^a	(%)	(%)	(Na SO ₃) (%)	(°)
M1 ^b	12,0	16,6	23,3	29,5	+48
M2 ^b	6,2	14,9	25,3	32,3	+36
M3 ^c	25,3	8,3	40,0	33,1	+25
M4 ^c	3,0	19,1	46,8	20,0	+50
M5 ^c	1,0	19,7	66,1	11,3	+61

^a = rendimento em percentagem relativo a alga seca e moída.

b = M1 e M2, frações obtidas por extração aquosa à temperatura de 25°C.

^c = M3, M4 e M5, frações obtidas por extração aquosa à temperatura de 100°C.

A grande maioria das espécies de algas pertencentes à ordem Gigartinales são conhecidas como produtoras de carragenanas, em particular as algas da família Solieriaceae que são ricas fontes desses polímeros, como a alga *Kappaphycus alvarezii*, da qual é obtida a kappa-carragenana e a alga *Eucheuma denticulatum*, que produz majoritariamente iota-carragenana (DOTY, 1988). Como demonstrado na TABELA 8 todas as frações polissacarídicas brutas apresentaram rotação óptica positiva (+25° a +61°), sugerindo a presença predominante de carragenanas, uma vez que rotação óptica positiva é indicativo de unidades pertencentes a série estereoquímica D.

Utilizando hidrólise redutiva descrita por STEVENSON e FURNEAUX (1991),essas frações foram analisadas quanto à sua composição monossacarídica sendo possível quantificar conjuntamente por análise de CG as unidades (3,6-anidrogalactose de anidrogalactose 2-*O*-metil-3,6anidrogalactose) além das outras unidades monossacarídicas (TABELA 9). As três primeiras frações brutas (M1, M2 e M3) foram muito semelhantes quanto à sua composição monossacarídica. Elas apresentaram galactose (Gal) (46,0-57,0%), como principal monossacarídeo além de 3,6-anidrogalactose (AG) (24,0-37,0%) e menores quantidades de 6-O-metilgalactose (6Gal) (3,0-4,0%) e xilose (Xyl) (3,0-1,0%).

TABELA 9. COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES BRUTAS OBTIDAS DA ALGA VERMELHA *Meristiella gelidium*.

Fração		Composição monossacarídica (mol%) [*]							
	Gal	AG	6Gal	Xyl	Glc				
M1	57,0	26,0	4,0	3,0	10,0				
M2	66,0	24,0	3,0	1,0	6,0				
M3	46,0	37,0	4,0	1,0	11,0				
M4	35,0	9,0	3,0	2,0	51,0				
M5	13,0	2,0	-	1,0	84,0				

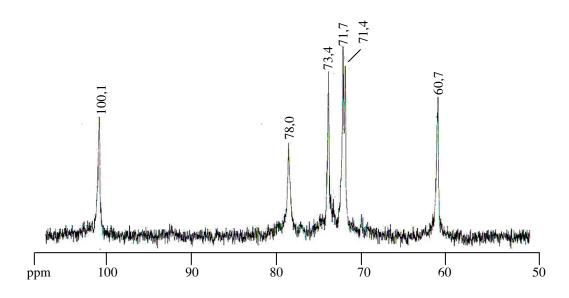
^{*} Monossocarídeos quantificados em mols%, na forma de acetados de alditóis, por CG-EM (STEVENSON & FURNEAUX, 1991).

80

Os extratos brutos de *M. gelidium*, M4 e M5 apresentaram significativo teor de glucose (TABELA 9). A presença deste monossacarídeo é geralmente proveniente da contaminação do polissacarídeo de reserva das algas vermelhas (amido das florídeas) (USOV, 1992).

O espectro de RMN de 13 C da fração M5 demonstrado na Figura 8, apresentou sinais em 100,1; 71,4; 73,4; 78,0; 71,7 e 60,7 ppm, característicos desta glucana de reserva das algas vermelhas, o que está de acordo com a sua composição monossacarídica (TABELA 9). Apesar dos valores mais elevados de glucose (10,0 e 11,0%) nas frações M1 e M3, comparada à M2, o espectro de RMN de carbono 13 dessas frações (FIGURA 9) não apresentaram os sinais correspondentes aos C1 – C6 das unidades de α -D-glucose (1 \rightarrow 4)-O-substituídas (CHIOVITTI et al., 1998a).

FIGURA 8. ESPECTRO DE RMN DE ¹³C DA FRAÇÃO M5 DE *M. gelidium.*



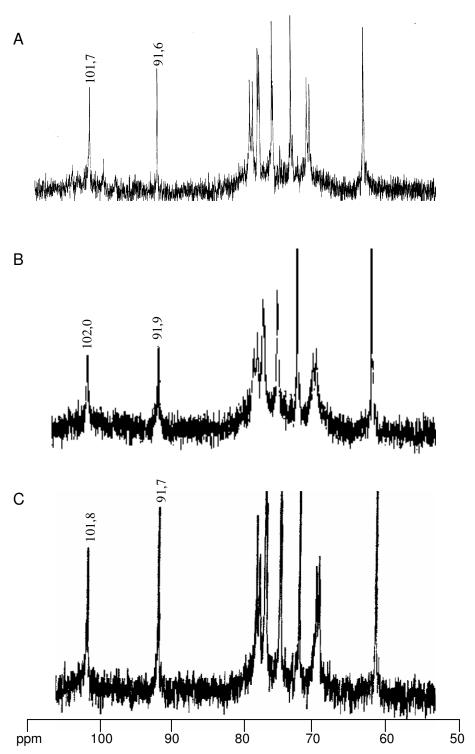
Análise realizada a 50 °C em D₂O, concentração da amostra 25 mg./mL.

Apesar dos baixos conteúdos de galactose mono-*O*-metilada, a presença deste monossacarídeo já foi utilizada como critério quimiotaxonômico para classificação das algas dentro da família Solieriaceae.

Os primeiros relatos de unidades de galactose monometilada foram descritos nas algas vermelhas *E. spinosum* (BELLION et al., 1983) e em algas do gênero *Erythroclonium*, (6-*O*-metilgalactose; 16,0–24,0 mol%). Em três espécies do gênero *Erythroclonium*, foram isoladas frações polissacarídicas de carragenanas com características estruturais complexas: uma alfa/iotacarragenana híbrida com altos conteúdos de metilação em C-6, menores proporções de piruvatação e metilação em C-3 (CHIOVITTI et al., 1998b).

O espectro de RMN de ¹³C das primeiras três frações obtidas é muito semelhante. Na Figura 9 estão demonstrados os espectros de RMN de ¹³C das frações brutas M1–M3. Baseado em diversos trabalhos anteriores, (USOV e SHASHKOV, 1985; FURNEAUX e MILLER, 1986; ESTEVEZ et al., 2000; ESTEVEZ et al., 2001), foi possível identificar que os deslocamentos específicos dos carbonos anoméricos correspondem à díade β-D-galactose 4-*O*-sulfatada ligada à 3,6-anidro-α-D-galactose 2-*O*-sulfatada. A espectroscopia de RMN de ¹³C, em conjunto com a análise de rotação óptica e composição monossacarídica, demonstraram que os extratos M1, M2 e M3 são constituídos principalmente por iota-carragenana.

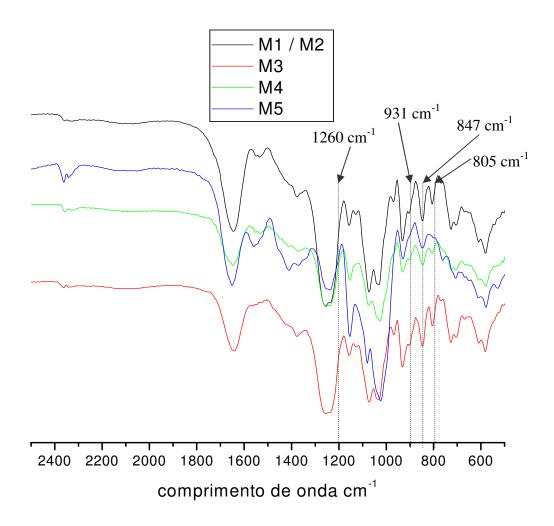
FIGURA 9. ESPECTROS DE RMN DE 13 C DAS FRAÇÕES BRUTAS M1 (A), M2 (B) E M3 (C) DE *M. gelidium.*



Análises realizadas a 50 °C em D_2O , concentração das amostras 40, 45 e 30 mg/mL, respectivamente.

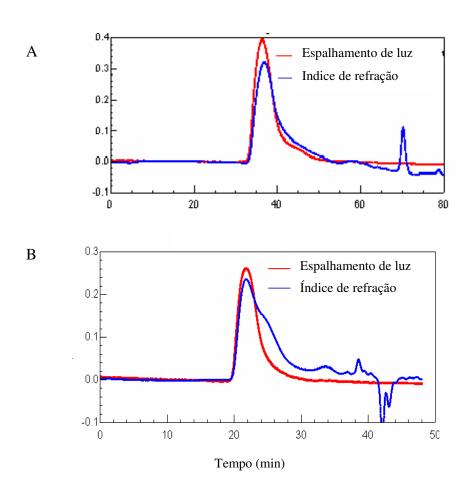
As frações brutas (M1–M5) também foram submetidas à análise de FT-IR. Os espectros obtidos apresentaram bandas de absorção que confirmam os dados de RMN de ¹³ C. Os espectros de FT-IR apresentaram bandas em 1260 cm⁻¹ (S=O de grupos sulfato) e na região diagnóstico (940–800 cm⁻¹) em 931 cm⁻¹ (C-O-C de 3,6-anidrogalactose), 847 cm⁻¹ (C-O-S de sulfato axial no C-4 das unidades de β-D-galactose) e 805 cm⁻¹ (sulfato em C-2 nas unidades de 3,6-anidrogalactose) (STANCIOFF e STANLEY, 1969; CRAIGIE e LEIGH, 1978; BELLION et al., 1983) (FIGURA 10). Essas bandas estão presentes com maior intensidade nas frações M1, M2 e M3, haja vista que M4 e M5 são constituídas principalmente por glucose.

FIGURA 10. ESPECTROS DE INFRAVERMELHO DAS FRAÇÕES BRUTAS (M1-M5) EXTRAÍDAS DE ALGA VERMELHA *M. gelidium.*



Para verificar a homogeneidade, as frações M1, M2 e M3 foram analisados por cromatografia de gel permeação utilizando como detectores o espalhamento de luz e o índice de refração. A análise de HPSEC-MALLS (FIGURA 11) mostra os perfis de eluição das frações M1 e M3. A fração M2 apresentou um perfil de eluição muito semelhante ao da fração M3. Por meio dessa análise foi possível constatar que nenhuma das frações estava homogênea. Dentre as frações analisadas M1 apresentou perfil de eluição menos heterogêneo.

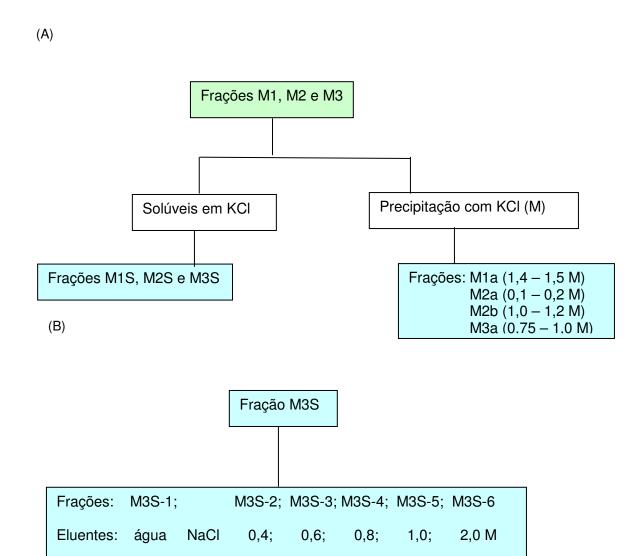
FIGURA 11. ANÁLISES DE HOMOGENEIDADE DAS FRAÇÕES M1 (A) e M3 (B) POR CROMATOGRAFIA DE GEL PERMEAÇÃO (HPSEC-MALLS).



Visando purificar as frações M1 – M3, elas foram submetidas à precipitação fracionada com KCl. Este processo baseia-se na propriedade apresentada pelas carragenanas de geleificarem na presença de cátions, como o íon potássio. Esta geleificação é dependente do teor de unidades 3,6-anidrogalactose e de grupos

sulfato presentes na molécula (CEREZO, 1967; NOSEDA, 1994; USOV, 1998). Carragenanas com maiores teores de 3,6-anidrogalactose e menores teores de grupos sulfato tendem a geleificar em menores concentrações de potássio. Após o tratamento das frações M1 — M3 foram obtidas as subfrações precipitadas M1a, M2a, M2b e M3a e as respectivas subfrações solúveis em KCl 2,0M: M1S, M2S e M3S (FIGURA 12).

FIGURA 12. FLUXOGRAMA (A) FRACIONAMENTO COM KCI; (B) PURIFICAÇÃO POR CROMOTOGRAFIA DE TROCA IÔNICA DAS FRAÇÕES DE *M. gelidium.*



Os extratos brutos M1, M2 e M3 foram solubilizados em água destilada na concentração 0,25 g% 0,20 g% e 0,25 g%, respectivamente e submetidos a fracionamento com KCl, com aumento gradual de sal até a concentração de 2,0M. Esta metodologia foi inicialmente descrita por CEREZO (1967) onde da alga vermelha *Gigartina skottsbergii* (ordem Gigartinales), foi possível realizar o fracionamento de um sistema de galactanas isolando diversas frações precipitadas em diferentes concentrações de KCl.

Na Tabela 10 estão demonstradas as faixas de fracionamento, teores de grupos sulfato, proteínas e carboidratos, rendimentos e rotação óptica específica das subfrações obtidas após este fracionamento.

TABELA 10. FAIXA DE FRACIONAMENTO, RENDIMENTO E ANÁLISES QUÍMICAS DAS SUBFRAÇÕES DE M1, M2 E M3 OBTIDAS APÓS FRACIONAMENTO COM KCI.

Fração	Faixa de	Rendimento	Sulfato	Carboidrato	Proteína	[α] _D
	Fracionamento	(%) ^a	$NaSO_3$	(%)	(%)	(°)
	KCI (M)		(%)			
M1a	1,4–1,5	76,0	24,0	58,0	4,0	+64
M1S	2,0 ^b	14,0	13,0	46,0	2,0	+22
M2a	0,1-0,2	7,0	nd	64,0	3,0	nd
M2b	1,0–1,2	79,0	25,0	54,0	6,0	+56
M2S	2,0 ^b	8,0	18,0	47,0	7,0	-38
МЗа	0,75–1,0	62,0	29,0	43,0	9,0	+51
M3S	2,0 ^b	11,0	13,0	70,0	10,0	+47

^a = em relação ao material inicial (M1, M2 e M3).

É possível observar que os extratos brutos M1, M2 e M3 são constituídos na sua maioria por galactanas geleificantes, uma vez que as frações precipitadas correspondem a 76,0, 86,0, 62,0% do material inicial, respectivamente. As frações

b = frações solúveis em KCl 2,0 M.

nd = não determinado.

solúveis apresentaram menores conteúdos de grupos sulfato (13,0–18,0%) quando comparadas com as frações precipitadas. O elevado teor de grupos sulfato (24,0–29,0%) encontrado nas frações precipitadas está de acordo com teores relatados (28,0–32,0%) para polissacarídeos do gênero *Meristiella* (SAITO e OLIVEIRA, 1990).

No que diz respeito à quantidade de proteínas, a concentração nos extratos brutos (TABELA 8, pág, 78) pode estar superestimada pela presença de outros compostos (por ex.: fenólicos) os quais podem interferir na dosagem (SMITH, 1982). Porém, esse processo de purificação possibilitou redução significativa no teor das mesmas.

As principais subfrações precipitadas M1a, M2b e M3a apresentaram rotação óptica positiva $(51 - 64^{\circ})$, o que está de acordo com os valores relatados para as kappa/iota-carragenanas $(56 - 65^{\circ})$ (STORTZ e CEREZO, 1993).

O fracionamento de galactanas com KCI permite separar frações polissacarídicas constituídas majoritariamente de carragenanas geleificantes (kappa/iota-), das frações constituídas das não geleificantes (mu/nu- e lambda-carragenanas), agaranas e galactanas DL-híbridas. O critério para o fracionamento desses polissacarídeos é baseado nas propriedades de formação de gel das cadeias regulares de kappa/iota-carragenanas, que, dependendo das interações específicas com o íon potássio, permitem a precipitação dessas galactanas, enquanto as cadeias mu/nu-carragenanas permanecem solúveis, juntamente com as agaranas e as galactanas DL-híbridas.

A estrutura primária das lambda-carragenanas (G2S – D2S,6S) assim como as mu/nu-carragenanas (G4S – D2S,6S) determina que estas apresentem uma estrutura secundária na qual as cadeias não formam hélices encontrando-se estendidas (tipo fita) com alguns dobramentos de um lado ao outro. Estas cadeias se repelem devido à alta densidade de cargas negativas dos grupos sulfato (REES, 1977). Por esta razão essas carragenanas necessitam de alta concentração de íons K⁺ (alta força iônica) para diminuir a repulsão das cargas negativas e permitir a formação de zonas de junção e agregados que possibilitam a geleificação. Essas carragenanas podem precipitar com altas concentrações de

KCI ou podem permanecer solúveis em KCI. De acordo com a definição de SMITH e COOK (1953) as lambda-carragenanas foram consideradas polissacarídeos que não apresentavam a propriedade de formar géis, permanecendo solúveis em solução de KCI.

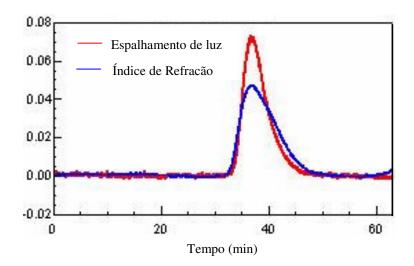
STORTZ e CEREZO (1988) isolaram da alga *Iridaea undulosa* uma fração, precipitada com altas molaridades de KCI, constituída de lambda- (~80%) e mu/nu-carragenana (~20%) que coprecipitaram com a mesma concentração de KCI.

Posteriormente em um estudo mais detalhado esta metodologia foi novamente aplicada por STORZ e CEREZO, (1993) para fracionar o sistema de carragenanas dos estágios cistocárpicos e tetraspóricos da alga *Iridaea undulosa*. Foi demonstrado que o sistema cistocárpico é composto de quantidades similares das geleificantes kappa/iota-carragenanas, e da solúvel, parcialmente ciclizada mu/nu-carragenana. O sistema tetraspórico é composto principalmente pela lambda-carragenana, mas também apresenta pequenas proporções de galactana sulfatada contendo L-galactose.

Frações contendo L-galactose também foram isoladas de amostras cistocárpicas da alga *Gigartina skottsbergii*, após a realização de tratamento alcalino e posterior fracionamento com KCl de ambas a kappa/iota-carragenana e a parcilamente ciclizada mu/nu-carragenanas (CIANCIA et al., 1997).

Com relação aos polissacarídeos de *M. gelidium*, o fracionamento com KCI foi muito eficiente no que diz respeito à separação de subfrações homogêneas, confirmando sua eficácia na separação de carragenanas. A homogeneidade das principais subfrações precipitadas (M1a, M2b e M3a) foi avaliada por HPSEC-MALLS e observou-se um único pico nos seus cromatogramas, confirmando a homogeneidade das mesmas. Com base no dn/dc, essas frações apresentaram massa molar média M1a (425.600 g/mol), M2b (950.800 g/mol) e M3a (956.700 g/mol). Na Figura 13 está demonstrado o cromatograma da subfração M3a.

FIGURA 13. ANÁLISE DE HOMOGENEIDADE DA SUBFRAÇÃO M3a HPSEC-MALLS.



As análises de composição monossacarídica (TABELA 11) demonstraram que as subfrações precipitadas, foram muito semelhantes, com exceção da subfração M2a. Galactose e 3,6-anidrogalactose foram os monossacarídeos dominantes, representando 92,0-98,0% do total dos monossacarídeos presentes nestas frações. Menores teores de 6-*O*-metilgalactose (5,0–6,0%) e glucose (2,0–3,0%) estavam presentes não em todas as frações.

Embora o amido das florídeas seja solúvel em água, segundo VAN DE VELDE et al. (2002), este polímero pode acompanhar as galactanas do tipo carragenana tanto no processo de extração como nos passos de precipitação. A subfração M2a é constituída majoritariamente por glucose correspondendo ao polissacarídeo de reserva das algas vermelhas (amido das florídeas). Em alguns estudos (FARIA, 2002; ZIBETTI, 2001) este polissacarídeo também foi precipitado em baixas molaridades de KCl. A análise de RMN de ¹³C desta fração (dado não mostrado) demonstrou a presença dos sinais característicos da α -D-glucopiranose C1-C6: 100,2; 72,2; 73,9; 78,0; 71,9 e 61,3 ppm (CHIOVITTI et al, 1998).

Em relação as frações solúveis, estas apresentaram composição monossacarídica distinta das precipitadas (TABELA 11), apresentando significativamente menores quantidades do derivado 3,6-anidrogalactose (AG)

(3,0–7,0%) e baixa percentagem (2,0%) de unidades de galactose naturalmente 4-O-metiladas (frações M1S e M3S). Destaca-se a grande quantidade de glucose presente na fração M3S, a qual pode ser proveniente do amido das florídeas.

TABELA 11. COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS SUBFRAÇÕES OBTIDAS APÓS FRACIONAMENTO COM KCI E TRATAMENTO ALCALINO.

Fração	Composição monossacarídica (mol%) [*]							
•	Gal	AG	4Gal	6Gal	Xyl	Glc		
M1a	51,0	41,0	-	5,0	-	3,0		
M1a-T	47,0	45,0	-	4,0	-	3,0		
M1S	73,0	7,0	2,0	2,0	5,0	11,0		
M2a	28,0	15,0	-	8,0	2,0	47,0		
M2b	55,0	37,0	-	6,0	-	2,0		
M2S	86,0	3,0	-	2,0	3,0	6,0		
МЗа	53,0	41,0	-	6,0	-	-		
М3а-Т	50,0	44,0	-	6,0	-	-		
M3S	45,0	3,0	2,0	-	7,0	43,0		

^{*} Monossocarídeos quantificados em mols%, na forma de acetados de alditóis, por CG-EM (STEVENSON e FURNEAUX, 1991).

Os espectros de RMN de ¹³C das frações M1a, M2b e M3a foram muito semelhantes e apresentaram os sinais anoméricos em 101,8 e 91,6 ppm correspondentes as unidades G4S ligadas à DA2S (iota-carragenana) (USOV e SHASHKOV, 1985). Os espectros dessas frações também apresentaram com menor intensidade os sinais 104,6 e 97,7 e 95,0 ppm, atribuídos as díades da nucarragenana (G4S-D2S,6S) (STORTZ et al., 1994) e kappa-carragenana (G4S-DA) (USOV e SHASHKOV, 1985). Na Tabela 12 estão descritos os assinalamentos das principais díades presentes nas frações M1a, M2b e M3a.

TABELA 12. ASSINALAMENTOS DAS PRINCIPAIS DÍADES PRESENTES NAS FRAÇÕES M1a, M2b e M3a OBTIDAS ATRAVÉS FRACIONAMENTO COM KCI DE *M. gelidium.*

Fração	Carrageenana			3- <i>O</i> -lig	3-O-ligadas			4-O-ligadas							
			Unidade B	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
M1a	iota ^a kappa ^a	G4S G4S	D2S DA	101,8 101,8	69,0 69,0	76,7	71,8 73,5	74,4	60,9 60,9	91,6 95,1	74,6	77,5 79,1	77,9	76,4 76,7	69,0 69,4
	nu ^b	G4S	D2S,6S	104,6		79,9		74,6	60,9	97,9		67,8		67,6	
M2b	lota Kappa nu	G4S G4S G4S	D2S DA D2S,6S	101,8 101,8 104,6	69,0 68,8 69,9	76,6 78,3	71,7	74,5 74,3 74,3	60,9 60,9 60,9	91,7 95,0 97,7	74,5	77,4 79,2 67,6	77,8 78,2	76,7 76,7 67,6	69,0 69,7
МЗа	lota Kappa	G4S G4S	D2S DA	101,8 101,8	69,0 68,8	76,6 78,3	71,7	74,5 74,3	60,9 60,6	91,7 95,3	74,5	77,5 79,2	77,8	76,6 76,7	69,0 69,7
	Nu	G4S	D2S,6S	104,6	69,9	79,9		74,3	60,9	97,7	75,1	67,6	78,2	67,6	55,7

^a De acordo com USOV e SHASHKOV, (1985)

^b De acordo com STORTZ et al. (1994).

Os espectros de FT-IR das frações (M1a, M2b e M3a) foram muito similares entre si e com os das frações brutas que as originou (M1, M2 e M3) (FIGURA 10, pág. 83). Apresentaram intensa banda de absorção em 1260 cm⁻¹ indicativa da presença de éster sulfato, o que está de acordo com o teor destes grupos determinado fotocolorimetricamente (TABELA 10). Também estão presentes bandas diagnóstico em 848–847 cm⁻¹ características de éster sulfato axial localizados em *O*-4 das unidades β-D-galactopiranosil, 805 cm⁻¹ correspondentes a éster sulfato axial localizados em *O*-2 das unidades 3,6-anidrogalactopiranosil e a banda em 931 cm⁻¹, devido à presença deste anidroaçúcar (STANCIOFF e STANLEY, 1969; CRAIGIE e LEIGH, 1978).

Com o objetivo de determinar a percentagem de unidades precursoras presentes, (α -D-galactose 2,6-sulfato e/ou α -D-galactose 6-sulfato), as frações M1a e M3a foram submetidas ao tratamento alcalino (CIANCIA et al., 1993) originando as frações M1a-T e M3a-T, respectivamente. A análise de composição monossacarídica demonstrou que estes polissacarídeos modificados apresentaram aumento das unidades 3,6-anidro- α -D-galactose (\sim 5% e \sim 3%, respectivamente) com a concomitante diminuição da quantidade de galactose (TABELA 11).

Os espectros das frações modificadas M1a-T e M3a-T apresentaram somente sinais de iota-carragenana com os deslocamentos químicos C1–C6 de G4S: 101,8, 69,0, 76,7, 71,8, 74,4, 60,9 ppm e C1–C6 de DA2S: 91,6; 74,6; 77,5; 77,9; 76,4; 69,0 ppm (USOV e SHASHKOV, 1985).

Para determinar a percentagem das unidades correspondentes à iota-kappa- e nu-carragenanas, as frações M1a e M3a foram submetidas à análise de metilação conforme o método descrito por CIUCANU e KEREK (1984). Previamente as galactanas foram tratadas com trietilamina (STEVENSON e FURNEAUX, 1991), com a finalidade de se obter os respectivos polissacarídeos na forma de sal de trietilamônio, os quais são solúveis no solvente (DMSO) utilizado no processo de metilação.

Os resultados das análises de metilação estão mostrados na Tabela 13. Os principais derivados metilados obtidos foram 2,6-di-O-metil-galactose e o derivado Eles 3-O-ligadas 3,6-anidrogalactose. indicam que as unidades galactopiranosil estão principalmente 4-O-sulfatadas e as unidades 4-O-ligadas anidrogalactopiranosil estão principalmente 2-O-sulfatadas. Estes resultados estão de acordo com os dados obtidos de FT-IR e RMN de ¹³C, confirmando que as díades de iota-carragenana são as principais estruturas dissacarídicas repetitivas presentes nessas frações. A presença do derivado 3-mono-O-metilgalactitol (4 e 3 mol%, respectivamente) demonstrou que estas frações também contém as unidades precursoras da iota-carragenana (D2S,6S). Estas percentagens estão de acordo com o aumento das unidades de 3,6-anidrogalactose após tratamento alcalino (TABELA 11). Este resultado demonstra também que a condição alcalina utilizada durante o processo de metilação não ocasionou a ciclização das unidades precursoras.

TABELA 13. ANÁLISES DE METILAÇÃO DAS FRAÇÕES M1a E M3a DE M. gelidium.

Derivado metilado ^a	Fração (mol%)		Padrão de substituição ^c
	M1a	МЗа	
3-O-ligados			
2,4,6-Gal	2,0 (0,51) ^b	2,0 (0,51) ^b	G e/ou G6M
2,6-Gal	47,0 (0,60)	46,0 (0,60)	G4S + G6M,4S
4-O-ligados			
2,3,6-Gal	2,0 (0,52)	1,0 (0,52)	D
3-Gal	4,0 (0,95)	3,0 (0,95)	D2S,6S
2-AGal	2,0 (0,47)	2,0 (0,47)	DA
AGal	42,0 (0,61)	42,0 (0,61)	DA2S
3 e/ou 4-O-ligados			
2-Gal	1,0 (0,83)	3,0 (0,83)	G4S,6S e/ou D3S,6S
6-Gal	-	1,0 (0,76)	G2S,4S (6M) e/ou
			D2S,3S (6M)

^a = Mol % dos monossacarídeos contendo grupos metil nas posições indicadas.

As carragenanas M1a e M3a, contém ainda menores quantidades de 2,4,6-Gal e 2,3,6-Gal correspondente as unidades 3-*O*- e 4-*O*-ligadas não sulfatadas, respectivamente. Adicionalmente, os derivados 2-Gal e 6-Gal foram detectados (TABELA 13) e poderiam ser originados da presença de unidades desviantes no polímero, ou alternativamente poderiam ser provenientes de submetilação.

Resultados semelhantes foram descritos recentemente por VIANA et al. em 2004 para a iota/nu-carragenana isolada da alga vermelha *Eucheuma denticulatum*. Além da iota-carragenana e dos seus precursores biológicos, a

^b = Retenção relativa à galactose.

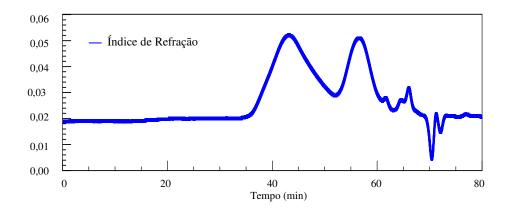
^c = Nomenclatura segundo KNUTSEN et al. (1994).

análise de metilação demonstrou que estas frações contêm pequenas percentagens (~ 2 mol%) de 2AGal que poderia ser proveniente da presença de estruturas de kappa-carragenana. Esses resultados demonstram a presença de unidades desviantes comumente encontradas em carragenanas, uma vez que estruturas "ideais repetitivas" de carragenanas não existem.

Portanto, o conjunto de análises químicas, cromatográficas e espectroscópicas demonstraram que as carragenanas precipitadas com KCI da alga vermelha *M. gelidium* são constituídas por unidades dissacarídicas repetitivas de iota- (80–90%), nu- (6–8%) e kappa- (4%).

Com relação às frações que permaneceram solúveis em KCl 2M a fração M3S foi selecionada para ser estudada neste trabalho. Esta fração foi avaliada quanto a sua homogeneidade. O cromatograma (FIGURA 14) demonstrou seu caráter heterogêneo, apresentando-se como uma mistura de componentes com diferentes massas molares, observado pelo perfil no detector de índice de refração.

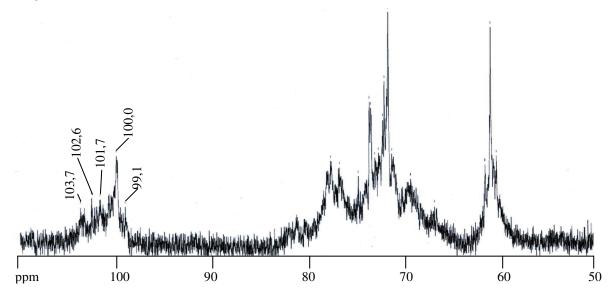
FIGURA 14. ANÁLISE DE HOMOGENEIDADE DA SUBFRAÇÃO M3S POR CROMATOGRAFIA DE GEL PERMEAÇÃO (HPSEC).



O espectro de RMN de 13 C da fração M3S apresentou baixa resolução e alta complexidade. Na região anomérica estão presentes o sinal em 103,7 ppm, que pode corresponder às unidades de β -D-xilose (X) substituindo o C-6 das unidades β -D-galactose (FURNEAUX et al., 1990) e o sinal em 101,7 ppm,

indicativo de unidades β -D-galactose 2-O-sulfatadas (G2S) (MILLER et al., 1996). Este espectro ainda apresenta um sinal largo em 100,0 ppm, referente à sobreposição de C-1 de α -L-galactose (LAHAYE et al., 1989) e C-1 de unidades α -D-glucopiranose (4-O-ligadas), correspondente ao amido das florídeas (FALSHAW et al., 1998), o que está de acordo com a alta percentagem de glucose (43,0 mol%) na composição monossacarídica dessa fração (TABELA 11, pág. 90).

FIGURA 15. ESPECTRO DE RMN DE 13 C DA FRAÇÃO M3S SOLÚVEL EM KCI 2M DE M. gelidium.



Análise realizada a 70 °C em D₂O, concentração da amostra 40 mg/mL.

Com a finalidade de fracionar os polissacarídeos presentes na fração M3S foi utilizada cromatografia de troca-iônica em DEAE-Sephacel. Desse fracionamento foram obtidas as frações M3S-1, M3S-2, M3S-3, M3S-4, M3S-5 e M3S-6, as quais foram eluídas com água e soluções de NaCl 0,4; 0,6; 0,8; 1,0 e 2,0M, respectivamente conforme descrito na Figura 12B (pág. 85).

A Tabela 14 demonstra que este processo de purificação permitiu a separação de diferentes frações, com rotação óptica específica negativa, indicativo da presença de agaranas.

TABELA 14. RENDIMENTO E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DAS FRAÇÕES OBTIDAS DA COLUNA DE TROCA IÔNICA DEAE-SEPHACEL A PARTIR DA FRAÇÃO M3S.

Fração	Rendimento ^a	Proteína	Carboidrato	Sulfato	[α] _D
	(%)	(%)	(%)	NaSO ₃ (%)	(°)
M3S-1	6,8	0,4	78,9	nd	nd
M3S-2	8,5	5,3	34,5	3,2	-69°
M3S-3	13,7	2,2	69,1	16,5	-42°
M3S-4	12,5	2,4	48,2	20,6	-61°
M3S-5	10,7	0,2	29,7	11,4	-22°
M3S-6	5,6	1,9	10,3	6,1	n.d

a = rendimento em percentagem relativo a fração M3S submetida a cromatografia de troca iônica.
 n.d = não determinado

Observa-se que na fração M3S-1 (eluída com água), grande parte da contaminação pela glucana de reserva presente na fração original (M3S) (TABELA 11), foi removida. As demais frações são constituídas principalmente por galactose (58,7 – 88,3 mol%), e em menores proporções estão presentes galactose mono-*O*-metilada, xilose, manose, glucose e 3,6-anidrogalactose (TABELA 15).

TABELA 15. COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES OBTIDAS POR CROMATOGRAFIA DE TROCA-IÔNICA DEAE-SEPHACEL E DAS FRAÇÕES DESSULFATADAS M3S-3D E M3S-4D.

Fração	Composição monossacarídica (mol%)						
	Gal	AG	4Gal	6Gal	Man	Xil	Glc
M3S-1	2,4	-	-	4,9	2,6	2,2	87,9
M3S-2	63,2	1,7	18,1	-	-	9,1	5,4
M3S-3	78,8	-	2,9	-	-	16,4	1,9
M3S-3D ^a	76,6	-	3,1	-	-	18,0	2,3
M3S-4	88,3	1,6	-	-	-	7,9	2,2
M3S-4D ^a	87,4	1,7	-	-	-	8,2	2,7
M3S-5	83,7	4,3	-	4,3	1,6	5,1	2,4
M3S-6	58,7	13,1	-	4,9	3,0	5,4	4,9

Monossocarídeos quantificados em moles%, na forma de acetados de alditóis, por CG-EM (STEVENSON e FURNEAUX, 1991).

A análise por HPSEC-MALLS das frações de maior rendimento (M3S-3 e M3S-4) demonstra o caráter homogêneo dessas frações (dado não mostrado) e a massa molar das frações M3S-3 e M3S-4 foi determinada com base no dn/dc = 0,125 e 0,164, respectivamente, apresentando massa molar média 187.100 g/mol (M3S-3) e 61.430 g/mol (M3S-4).

Com a finalidade de determinar a estrutura química fina e o posicionamento dos grupos substituintes no polissacarídeo, a galactana M3S-3 foi submetida à análise de metilação antes e após dessulfatação solvolítica, conduzidos de acordo com CIUCANU e KEREK (1984) e NAGASAWA et al. (1979) respectivamente.

A determinação do posicionamento dos grupos sulfato foi realizada por meio da análise comparativa dos produtos de metilação da galactana nativa e dessulfatada. Adicionalmente, este processo solvolítico possibilita uma

a = Frações dessulfatadas por solvólise (NAGASAWA et al., 1979).

simplificação do espectro de RMN de ¹³C, uma vez que os espectros de galactanas com altos teores de substituintes são geralmente complexos e de difícil interpretação.

De acordo com a metodologia de solvólise de NAGASAWA et al. (1979), primeiramente o polissacarídeo é transformado em sal de piridônio, para então ser solubilizado na mistura reativa (DMSO: metanol: piridina) e aquecida a 100 °C.

A fração M3S-3 (16,5% de Na₂SO₃) foi submetida a tratamento solvolítico, por 4 horas originando a fração modificada M3S-3D. Devido à pequena quantidade de amostra, o teor de grupos sulfato não foi determinado neste polissacarídeo modificado, mas o seu espectro de RMN de ¹³C (FIGURA 16), assim como a análise de metilação (TABELA 16) demonstraram que este processo foi eficiente na remoção dos grupos sulfato.

Uma possível dificuldade encontrada na remoção dos grupos sulfato é que este processo pode levar a uma hidrólise dos polissacarídeos. Podemos observar na Tabela 15, que o tratamento solvolítico não modificou significativamente a composição monossacarídica desta fração, o que é favorecido pela ausência do anel anidrogalactose, uma vez que as ligações anidrogalactosídicas são mais lábeis e consequentemente mais vulneráveis à hidrólise.

Os resultados das análises de metilação dos polissacarídeos nativo (M3S-3) e dessulfatado (M3S-3D) estão apresentados na Tabela 16.

TABELA 16. ANÁLISE DE METILAÇÃO DAS FRAÇÕES M3S-3 E M3S-D.

Derivado Metilado ^a	Fração (m	nol %)	Padrão de Substituição ^c	
	M3S-3	M3S-3D	_	
Unidades 3-O-ligadas				
2,4,6-Gal	16,2 (0,51) ^b	46,0 (0,51) ^b	G	
2,4-Gal	3,0 (0,74)	-	G6S	
4,6-Gal	18,8 (0,61)	-	G2S	
4-Gal	6,0 (0,95)	-	G2S,6S	
Unidades 4-O-ligadas				
2,3,6-Gal	4,6 (0,52)	24,3 (0,52)	L	
6-Gal	23,2 (0,70)	-	L2S,3S + LGal 3S,2	
2-Gal	1,5 (0,83)	-	L3S,6S	
2,6-Gal	14,6 (0,60)	2,7 (0,60)	L3S	
3,6-Gal	-	14,4	L2X	
3-Gal	1,0 (0,95)	-	L2S,6S	
Unidades 3- e/ou 4-O-ligadas	3			
2,3,4-XiI	11,1 (0,37)	12,6 (0,37)	X	

^a = Mol % dos monossacarídeos contendo grupos metil nas posições indicadas.

A análise dos produtos de metilação da galactana M3S-3 nativa demonstraram que as unidades A (β-galactose-3-*O*-substituída) estão principalmente sulfatadas em C-2 (18,8 mol%) e não sulfatada neste carbono (16,2 mol%) (TABELA 16). Em menores proporções a unidade A é constituída por G6S e G2S,6S (9,0 mol %).

^b = Rentenção relativa à galactose.

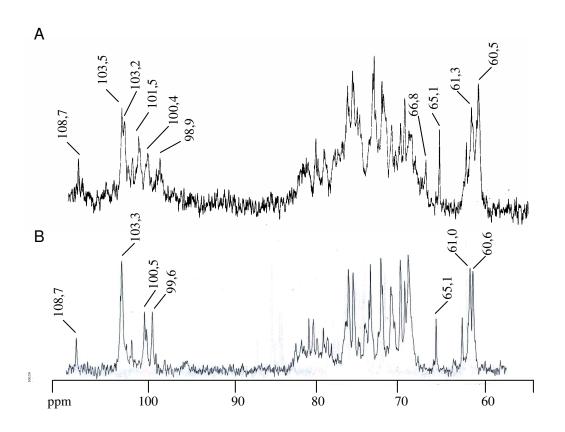
^c = Nomenclatura segundo KNUTSEN et al., 1994.

Após dessulfatação e análise de metilação podemos comprovar que o derivado 6-O-metilgalactose (23,2 mol%) presente entre os produtos de metilação da galactana nativa corresponde a unidades de α -L-galactose 2,3-substituída (L2S,3S e L3S,2X). Unidades mono sulfatadas em C-3 juntamente com as anteriores perfazem 37,8 mol% das unidades B deste polissacarídeo.

Podemos observar ainda que, após dessulfatação solvolítica a presença de 46,0 mol% de 2,4,6-Gal é condizente com a remoção dos grupos sulfato em C-2 e/ou C-6 das unidades β-galactose. O aparecimento do derivado 3,6-Gal entre os produtos de metilação do polímero dessulfatado comprova que parte (14,4 mol%) da galactana é glicosilada em C-2 por unidades simples de xilose. Esta percentagem está de acordo com a percentagem de 2,3,4-Xil (12,6 mol%) (TABELA 16).

Os resultados das análises de metilação foram confirmados pelas análises de RMN de ¹³C do polímero nativo e dessulfatado (FIGURA 16).

FIGURA 16. ESPECTRO DE RMN DE 13 C (A) FRAÇÃO NATIVA M3S-3 E (B) FRAÇÃO DESSULFATADA M3S-3D.



Análise realizada a 50 °C em D₂O, concentração da amostra 40 e 35 mg./mL, respectivamente.

Podemos observar no espectro da galactana nativa (FIGURA 16A) os sinais anoméricos na região 103,5 - 103,2 ppm, referente às unidades $\beta\text{-D-galactose}$ (LAHAYE et al., 1985), em 101,5 ppm unidades $\beta\text{-D-galactose}$ sulfatadas em C-2 (MILLER et al., 1996), em 100,4 ppm $\alpha\text{-L-galactose}$ 3-sulfato (CONTRERAS et al., 1988; ESTEVEZ et al., 2001; DUARTE et al., 2002) e 98,9 ppm está unidade ($\alpha\text{-L-galactose}$) substituída no C-2 (USOV et al., 1997). É possível observar também a presença do sinal em 66,8 ppm (correspondente a C-6 sulfatado) e os sinais referentes aos C-6 livres de $\beta\text{-D-galactose}$ (61,3 ppm) e $\alpha\text{-L-galactose}$ (60,5 ppm) (DUARTE et al., 2002).

O espectro de RMN de 13 C da galactana dessulfatada (M3S-3D) (FIGURA 16B) apresentou os sinais anoméricos em 103,3 ppm referente às unidades β -D-galactose (USOV et al., 1980; LAHAYE et al., 1985). Na região 100,5-100,4 ppm estão os sinais referentes ao C-1 de α -L-galactose (USOV et al., 1980; DUARTE et al., 2002) e também ao C-1 de xilose substituindo o C-2 dessas unidades. Nesse espectro ainda foi possível observar o sinal em 99,6 ppm correspondente às unidades α -L-galactose 2-O-substituídas (USOV et al., 1997). É importante destacar o desaparecimento do sinal referente ao C-6 substituído (66,8 ppm) no polímero dessulfatado. Esses assinalamentos estão de acordo com os dados obtidos nas análises de metilação.

A ausência de sinais correspondentes a unidades de 3,6-anidro-α-L-galactose, na região 98,3 – 97,8 ppm (LAHAYE et al., 1989) está de acordo com a composição monossacarídica desta fração (TABELA 15). Galactanas com baixa percentagem deste derivado foram isoladas da alga *Georgiella confluens* (KOLENDER e MATULEWICZ, 2002) e de espécies de *Sarcodia* (LAHAYE et al.,1989).

Trabalhos recentes relataram a presença de unidades B 3-*O*-sulfatadas como nos polímeros da alga *Bostrychia montagnei* (DUARTE et al., 2002), nas galactanas de *Sarcodia montagneana* e *S. flabellata* (MILLER 2003), nos polissacarídeos isolados de *Pterocladiella capillacea* (ERREA e MATULEWICZ, 2003) e nos polímeros isolados de *Georgiella confluens* (KOLENDER e MATULEWICZ, 2002). A galactana (M3S-3) de *Meristiella gelidium* apresentou semelhança estrutural com o polissacarídeo da alga *Champia nova-zealandiae* (MILLER et al., 1996) no que diz respeito à presença da díade G2S – L2S,3S.

Unidades simples de xilose foram detectadas substituindo o C-6 das unidades β -D-galactose por FURNEAUX et al. (1990), USOV et al. (1997), MILLER e BLUNT (2000) e ERREA e MATULEWICZ (2003), substituindo o C-3 das unidades α -L-galactose no polissacarídeo isolado da alga *Chondria macrocarpa* (FURNEAUX e STEVENSON, 1990) e na galactana de *Laurencia nipponica*

(USOV e ELASHVILI, 1991). Substituição por xilose no C-4 foi detectada na galactana da alga *Georgiella confluens* (KOLENDER e MATULEWICZ, 2002).

Além desses sinais principais, na fração M3S-3 ainda está presente o sinal em 108,7 ppm que pode corresponder a unidades β-galactose furanosídica. O espectro de RMN de ¹³C da fração polissacarídica obtida de *Kappaphycus alvarezii* (ESTEVEZ et al., 2004) apresentou um sinal em 109,6 ppm, que poderia ser correspondente a presença de uma única unidade de β-D-galactofuranose. A presença deste tipo de unidade na fração M3S-3 de *M. gelidium* não pôde ser confirmada, pois o espectro de massa dessa fração metilada, hidrolisada e acetilada, não apresentou fragmentação correspondente a 2,3,5,6-tetra-*O*-metilgalactitol. Fato similar foi observado para a fração polissacarídica de *K. alvarezii*, possivelmente a presença de β-galactose furanosídica é decorrente de contaminação fúngica nessas algas.

A segunda fração de maior rendimento (M3S-4) também foi submetida a análise de metilação para caracterização da sua estrutura fina. Ambas as frações (M3S-3 e M3S-4) foram semelhantes quanto a sua composição monossacarídica e com base na análise de metilação da fração M3S-4 (TABELA 17) podemos observar algumas semelhanças estruturais no que diz respeito a substituição por grupos sulfato.

TABELA 17. ANÁLISE DE METILAÇÃO DA FRAÇÃO M3S-4.

Derivado Metilado ^a	Mol% ^b	Padrão de Substituição ^c
Unidades 3-O-ligadas		
2,4,6-Gal	12,3 (0,51)	G
2,4-Gal	2,4 (0,74)	G6X
4,6-Gal	28,2 (0,61)	G2S
4-Gal	3,6 (0,95)	G2S,6X
Unidades 4-O-ligadas		
2,3,6-Gal	5,3 (0,52)	L
2,6-Gal	37,2 (0,60)	L3S
Unidades 3- e/ou 4-O-ligadas		
2-Gal	1,6 (0,83)	G4S,6S/ L3S,6S
2,3,4-Xyl	9,4 (0,37)	Х

^a = Mol % dos monossacarídeos contendo grupos metil nas posições indicadas.

Os resultados da análise de metilação demonstraram que aproximadamente 60,0% das unidades A desta galactana estão 2-O-sulfatadas e 26,0% não substituídas. As unidades B estão aproximadamente 87,0% 3-O-sulfatadas e unidades simples de xilose glicosilam o C-6 das unidades β -D-galactose.

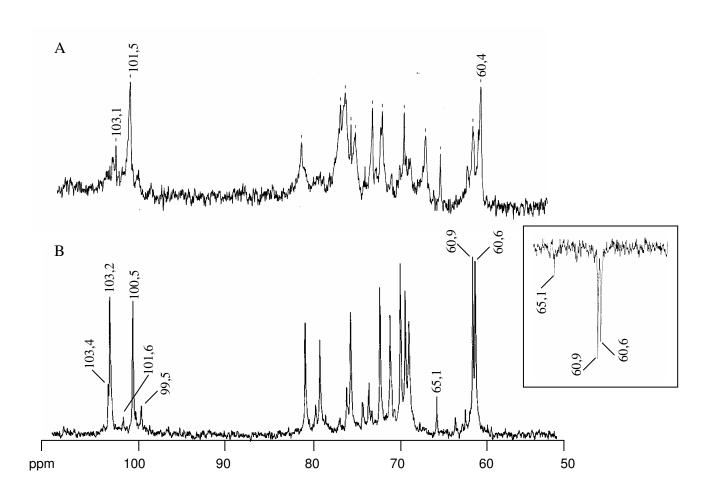
A fração M3S-4 foi submetida à dessulfatação solvolítica e posteriormente metilada pelo método de CIUCANU e KEREK (1984) para confirmar o posicionamento dos grupos sulfato. Apesar do processo de dessulfatação ter sido efetivo na remoção dos grupos sulfato, observado pela comparação dos espectros

^b = Retenção relativa à galactose.

^c = Nomenclatura segundo KNUTSEN et al. (1994).

de RMN de ¹³C, FIGURA 17, devido a pequena quantidade de material não foi possível analisar os derivados metilados desta fração modificada.

FIGURA 17. ESPECTROS DE RMN DE ¹³C (A) FRAÇÃO NATIVA M3S-4 E (B) FRAÇÃO DESSULFATADA M3S-4D E ANÁLISE DE DEPT.



Análises realizadas a 50 °C em D₂O, concentração das amostras 50 mg./mL.

Os deslocamentos químicos observados nas frações antes e após o processo solvolítico (FIGURA 17), confirmam os resultados obtidos na análise de metilação do polímero nativo. O espectro de RMN de 13 C da fração nativa apresenta os sinais anoméricos na região de 103,4-103,1 ppm de β -D-

galactopiranose (LAHAYE et al., 1985) e de β -D-xilose glicosilando o C-6 dessas unidades (ERREA e MATULEWICZ, 2003), em 101,5 ppm o sinal referente as unidades β -D-galactopiranose 2-*O*-sulfatadas (MILLER et al., 1996) e em 100,5 ppm referente as unidades α -L-galactose 3-*O*-sulfatada (CONTRERAS et al., 1988; DUARTE et al., 2002; ESTEVEZ et al., 2001).

Na região de 81,2 – 76,2 ppm estão os sinais de C-2 de β -D-galactose 2-sulfato e C-3 de α -L-galactose 3-sulfato, que desaparecem após o processo solvolítico. O sinal em 68,8 ppm presente no espectro da fração M3S-4D corresponde ao C-2 de unidades de α -L-galactose, condizente com o efeito β (1,9 ppm) da sulfatação em C-3, como observado no polímero original M3S-4 (C-2 em 66,9 ppm) (CONTRERAS et al., 1988; MILLER e BLUNT, 2000).

O espectro da fração dessulfatada (FIGURA 17B) demonstra claramente que este processo solvolítico foi eficiente na remoção dos grupos sulfato, pois podemos observar os sinais majoritários correspondentes as unidades β -D-galactose ligada à α -L-galactose, assim como os sinais de xilose glicosilando o C-6 das unidades A (TABELA 18). Sinal de baixa intensidade como em 101,6 ppm podem corresponder a poucas unidades β -D-galactose ainda 2-O-sulfatadas.

A presença de CH_2 não substituído foi confirmada pela análise de DEPT 135, observada pela inversão dos sinais 60,9 e 60,6 ppm, C-6 de β -D-galactose e α -L-galactose, respectivamente, assim como do sinal 65,1 ppm (C-5 da xilose).

TABELA 18. ASSINALAMENTOS QUÍMICOS DE RMN DE 13 C OBSERVADOS NA FRAÇÃO M3S-4D de M. gelidium.

Unidade	Assinal	Assinalamentos (ppm)				
	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
→3)-β-D-Gal p -(1→ →4)- α-L-Gal p -(1→ β-D-Xil p -(1→	103,2 100,5 103,4	69,3 68,8 73,0	80,4 70,5 75,6	68,3 78,7 69,3	75,1 71,7 65,1	60,9 60,6

Estas análises demonstram a semelhança estrutural das duas principais galactanas solúveis em KCl 2M sintetizadas pela alga M. gelidium. Em ambas, as unidades A são estão principalmente 2-O-sulfatadas e não substituída e as unidades B (α -L-galactose) estão 3-O-sulfatadas (FIGURA 18).

As unidades B da galactana M3S-3, adicionalmente possuem substituição no C-2 por sulfato ou xilose. O posicionamento da xilose também é distinto em cada galactana, glicosilando o C-6 das unidades de β -galactose na galactana M3S-4 e o C-2 das unidades α -L-galactose na galactana M3S-3 (FIGURA 18).

Xilose é um substituinte frequente em galactanas de alga marinhas. Em *Chondria macrocarpa* e *Laurencia nipponica* as unidades de xilose glicosilam o C-3 das unidades de L-galactose-6-sulfato (FURNEAUX e STEVENSON, 1990) e USOV e ELASHIVILI (1991), respectivamente. Em *Laingia pacifica* parte das unidades de 3,6-anidro-α-L-galactose e de β -D-galactose estão substituídas por xilose em C-2 e em C-6, respectivamente, (KOCHETKOV et al., 1973). Em *Laurencia undulata* foi isolado um dissacarídeo constituído por β -D-galactose e 2-D-metil 3,6-anidrogalactose onde C-4 (da unidade A) apresentava xilose (HIRASE

et al., 1982). As galactanas de *B. montagnei* também apresentaram unidades de β -D-xilopiranose (C-1–C-5 em 103,9 ppm, 72,8 ppm, 75,7 ppm, 69,4 ppm e 65,2 ppm) glicosilando o C-6 de algumas unidades de β -D-galactopiranose (DUARTE et al., 2002).

Embora a presença de xilose tenha sido relatada em diversas galactanas de algas, são poucas as que tiveram o posicionamento desta unidade definitivamente determinado e até o momento não há relatos na literatura de xilose substituindo o C-2 das unidades α -L-galactose, como foi observado na galactana de M. gelidium.

É importante destacar também que unidades α-L-galactose 3-*O*-sulfatadas já foram relatadas (ESTEVEZ et al., 2001; DUARTE et al., 2002; ERREA e MATULEWICZ 2002, 2003; MILLER 2003). Ressalta-se que a díade G2S – L3S presente nas agaranas de *M. gelidium* não haviam sido descritas em nenhum polissacarídeo estudado até o momento.

FIGURA 18. PRINCIPAIS UNIDADES MONOSSACARÍDICAS PRESENTES NAS AGARANAS M3S-3 E M3S-4.

 β -D-galactopiranose-2-sulfato

 α -L-galactopiranose-3-sulfato

 β -D-galactopiranose-6-xilose

$$\begin{array}{c|c} HO & O \\ \hline \\ OSO_3 & O \\ \hline \\ OH & OH \\ \end{array}$$

α-L-galactopiranose-2-xilose 3-sulfato

α-L-galactopiranose-2,3-sulfato

4.1.2. ANÁLISES REOLÓGICAS DAS GALACTANAS DE Meristiella gelidium

No que diz respeito à composição em carragenanas os resultados obtidos demonstraram que a alga vermelha *Meristiella gelidium* é uma rica fonte de iotacarragenana (FIGURA 19). Esta carragenana geleificante é amplamente utilizada principalmente na indústria alimentícia, devido as suas particulares propriedades reológicas. Como a alga *M. gelidium* é uma fonte desse polímero de grande interesse industrial e elevado custo, as características reológicas das carragenanas de *M. gelidium* foram avaliadas.

FIGURA 19. ESTRUTURA REPETITIVA DA IOTA-CARRAGENANA.

Para selecionar qual fração obtida seria utilizada nas análises reológicas, inicialmente foi determinado o comportamento viscoelástico linear para a amostra contendo iota-carragenana, denominada ι-CAR nesta parte do trabalho, que está presente no extrato bruto M1 e na fração M3a precipitada com KCI.

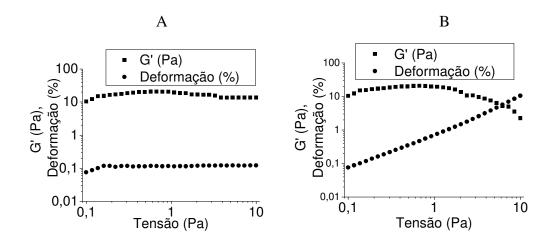
Vários estudos são encontrados na literatura, acerca do efeito de alguns cátions sobre a capacidade geleificante das carragenanas (NILSSON et al., 1989; PICULLEL et al., 1992; MEUNIER et al., 1999; MICHEL et al., 1997; HERMANSSON et al., 1991). Como a presença de íons afeta a transição conformacional e a geleificação das carragenanas, inicialmente foi avaliada por espectroscopia de absorção atômica a razão molar dos íons naturalmente presentes nessas frações. A análise de cátions demonstrou que a ι-CAR presente em ambas às frações contêm íons potássio (K⁺, 57,0 mol%) além de Na⁺ (30,0

mol%), Ca²+ (6,2 mol%) e Mg²+ (6,8 mol%). A principal forma iônica encontrada (K⁺) também foi detectada em amostras de iota-carragenana obtidas de *Eucheuma denticulatum*, em kappa-carragenana de *Kappaphycus. alvarezii*, e em carragenanas utilizadas na indústria possuindo 2,33 mol% (razão molar K⁺/Na⁺) (PARKER et al., 1993); a razão molar desses íons para a ι-CAR de *M. gelidium* apresentou valor próximo 1,90 mol%, demonstrando a semelhança iônica entre esses polímeros.

Dois fatores devem ser levados em consideração para que as carragenanas estejam em condições geleificantes: a concentração do polissacarídeo e a presença de íons. Para obter condições geleificantes de 1-CAR foi utilizada a concentração de 1% (10 g/L) e a concentração de 120 mM de sal (KCI).

A região de comportamento viscoelástico linear foi a mesma para as duas frações (extrato M1 e a fração M3a). As determinações foram realizadas nos extremos de varredura de freqüência (0,01 e 10 Hz). Na FIGURA 20 está representado o comportamento da fração M1.

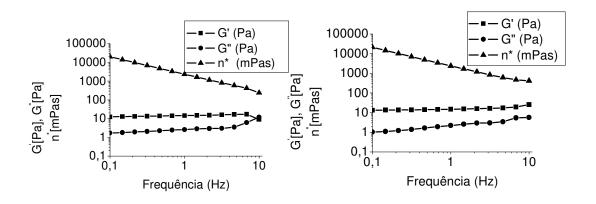
FIGURA 20. REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA REGIÃO DE COMPORTAMENTO VISCOELÁSTICO LINEAR PARA A FRAÇÃO M1 (10 g/L) EM PRESENÇA DE 120Mm de KCI. (A) FREQUÊNCIA DE 0,01 Hz E (B) FREQUÊNCIA DE 10 Hz, TEMPERATURA DE 25 °C.



Com o comportamento acima o valor de tensão escolhido para os testes de varredura de freqüência nas análises da galactana foi de 0,5 Pa, onde a deformação nessa tensão foi inferior a 10% para ambas as amostras. Nessas condições, as carragenanas apresentaram comportamento viscoelástico linear, ou seja, a tensão ou a deformação aplicadas não alteram a estrutura física do sistema em estudo.

Em condições geleificantes (concentração da amostra e presença de sal) pôde-se determinar a força do sistema gelatinizado, avaliando o módulo de perda ou viscoso (G") e o módulo de armazenamento ou dinâmico (G'). O perfil reológico das duas frações foi praticamente o mesmo, o módulo dinâmico (G') foi superior ao viscoso (G") em toda a faixa de frequência analisada, e ambos foram independentes da variação de frequência, indicando, portanto, um caráter de gel rígido para as duas amostras (FIGURA 21).

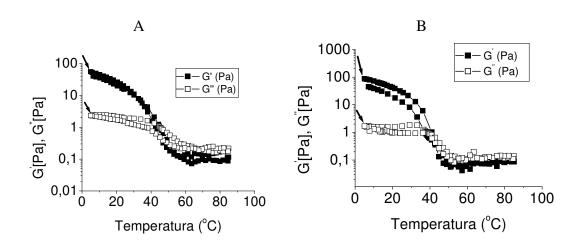
FIGURA 21. MÓDULO ELÁSTICO (G'), MÓDULO VISCOSO (G") EM FUNÇÃO DA FREQUÊNCIA (A) FRAÇÃO M1 (10g/L) EM PRESENÇA DE KCI 120 mM; (B) FRAÇÃO M3a (10g/L) EM PRESENÇA DE KCI 120 mM. SENSOR C60/2°C, DEFORMAÇÃO DE 1%, A 25°C.



Posteriormente, foi avaliado o efeito da temperatura sobre o comportamento viscoelástico dos géis das carragenanas solubilizadas em 120mM de KCI. O reograma demonstrou que o gel sofre fusão, pois há inversão dos módulos em temperaturas acima de 40°C; todavia após o resfriamento ele recupera o caráter de sólido (FIGURA 22). A transição fita-hélice para kappa- e iota-carragenana ocorre em distintas temperaturas, ~25°C para kappa- e 57°C para iota-carragenana (VAN DE VELDE et al., 2005). A temperatura de transição observada para a iota-carragenana de *M. gelidium* está de acordo com dados de literatura observados para géis de iota-carragenana (STEPHEN, 1995). Outra observação importante é a ausência de histerese na fração M1, uma vez que, após o aquecimento, os módulos retornam praticamente sobre os mesmos valores e a fração M3a apresenta uma leve histerese. Isso demonstra que na transição fita para hélice da ι-CAR não ocorre agregação das hélices formadas, uma característica particular dos géis de iota-carragenana (PICULLEL et al., 1987).

Recentemente VAN DE VELDE et al. (2005) demonstraram que a força do gel, expressa em termos do módulo elástico (G'), de carragenanas híbridas kappa/iota- diminui com a diminuição do conteúdo de kappa-carragenana. Por outro lado, a temperatura de geleificação de carragenanas kappa/iota-híbridas é independente da proporção de kappa-carragenana.

FIGURA 22. MÓDULO ELÁSTICO (G'), MÓDULO VISCOSO (G") EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA (→ AQUECIMENTO DE 5 - 85 °C E RESFRIAMENTO DE 85 - 5 °C). (A) FRAÇÃO M1 (10 g/L) EM PRESENÇA DE KCI 120 mM; (B) FRAÇÃO M3a (10 g/L) EM PRESENÇA DE KCI 120mM. SENSOR C-60/2°, EM FREQUÊNCIA DE 1 Hz E DEFORMAÇÃO DE 1%.



PICULELL et al., (1997) demonstraram que segmentos de iota-carragenana na presença do contra íon potássio, apresentaram somente uma transição conformacional (fita para hélice) sem nenhuma histerese térmica, como foi observado para ι-CAR de *M. gelidium* (FIGURA 22) e que a adição de kappacarragenana ao sistema acrescentou uma segunda transição conformacional que apresentou histerese. A transição no resfriamento geralmente reflete o equilíbrio entre as fitas e as hélices presentes na solução, enquanto que a transição no aquecimento reflete maior estabilidade das hélices associadas (PICULELL, 1995).

Com base nessas observações as análises reológicas podem determinar a pureza de amostras de kappa- e iota-carragenana, onde a presença de dois passos de transição em modelos de iota-carragenanana ocorre devido a presença de kappa-carragenana nessas amostras (PARKER et al., 1993). É importante lembrar que modelos ideais de kappa- e iota-carragenana não existem, mas sim híbridos dessas estruturas com maior ou menor percentagem de uma delas, então

a observação de uma nova etapa de transição conformacional depende da concentração de kappa-carragenana na amostra.

A ausência de histerese é particular dos géis de iota-carragenana, comportamento diferente é observado nos géis de kappa-carragenana onde a geleificação termoreversível envolve a mudança conformacional fita para hélice, seguida de agregação das hélices formadas, o que leva a histerese térmica (REES et al., 1982).

Visto que as duas frações de *M. gelidium* apresentaram perfis reológicos muito semelhantes, o que está de acordo com a similaridade composicional dessas frações, constituídas majoritariamente por iota-carragenana, a fração M1 foi selecionada para dar continuidade às análises reológicas.

4.1.3. ANÁLISES REOLÓGICAS DOS AMIDOS E DAS MISTURAS COM 1-CAR.

Uma vez que os amidos estão entre os principais polímeros utilizados na indústria alimentícia, devido não somente às suas propriedades reológicas como também ao baixo custo, e que ambos, amidos e carragenanas são hidrosolúveis, foi então analisado o comportamento reológico das misturas de \tau-CAR com quatro diferentes tipos de amido (CS = amido de milho comum; MS = amido de milho com altos teores de amilose; WS = amido de milho com altos teores de amilopectina e YS = amido de Cará). Foram analisadas as características reológicas dos polímeros frente às variações no modo de preparo do material e a presença de sal no sistema.

Inicialmente, o material foi preparado como descrito abaixo para avaliar as diferenças no comportamento reológico dos amidos (25 g/L) e das misturas ι-CAR (5 g/L) – Amidos (20 g/L), determinando assim com que amido a ι-CAR poderia apresentar melhor interação e melhores características reológicas.

- (i) Preparo dos amidos: os amidos foram solubilizados a 25°C durante 90 min, posteriormente foram autoclavados durante 30 minutos e mantidos sob refrigeração por aproximadamente por 18 h.
- (i) Preparo das misturas: os amidos foram solubilizados a 25°C durante meia hora, a ι-CAR foi adicionada, e o sistema ficou sob agitação mecânica durante 1h. Posteriormente as misturas foram autoclavadas durante 30 minutos, mantidas sob refrigeração aproximadamente por 18 h.

As análises químicas dos amidos demonstraram diferentes graus de amilose, variando de 27,6 – 66,0% (TABELA 19). Essas diferenças são significativas, uma vez que a avaliação da real capacidade dos modelos de amidos interagirem com a carragenana está baseada na proporção de amilose / amilopectina dos mesmos, o que influencia na capacidade de solubilização das amostras.

TABELA 19. COMPOSIÇÃO QUÍMICA (g%) DAS AMOSTRAS DE AMIDO.

Amostra	Carboidrato	Proteína	Umidade	Cinzas	Amilose
MS ^a	91,5	0,19	8,5	0,045	66,0
WS^a	89,0	0,26	9,0	0,04	0
YS^b	88,0	0,1	12,9	0,09	36,0
CS^a	88,0	0,2	10,7	tr	27,5

^a Descrito por FREITAS, et al. (2003).

Primeiramente foi determinado o comportamento viscoelástico linear para as amostras de amido na concentração 25 g/L (FIGURA 23). As determinações foram realizadas nos extremos de varredura de freqüência (0,01 e 10 Hz).

^b Descrito por FREITAS, et al. (2004).

FIGURA 23. REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA REGIÃO DE COMPORTAMENTO VISCOELÁSTICO LINEAR PARA O AMIDO DE MILHO COMUM (CS) (25 g/L). (A) FREQUÊNCIA DE 0,01 Hz E (B) FREQUÊNCIA DE 10 Hz, TEMPERATURA DE 25 °C.

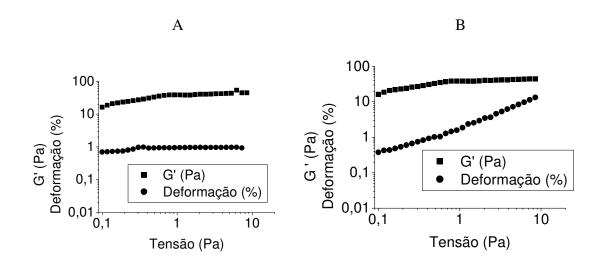


FIGURA 24. REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA REGIÃO DE COMPORTAMENTO VISCOELÁSTICO LINEAR PARA O AMIDO DE MILHO COM ALTOS TEORES DE AMILOSE (MS) (25 g/L). (A) FREQUÊNCIA DE 0,01 Hz E (B) FREQUÊNCIA DE 10 Hz, TEMPERATURA DE 25 °C.

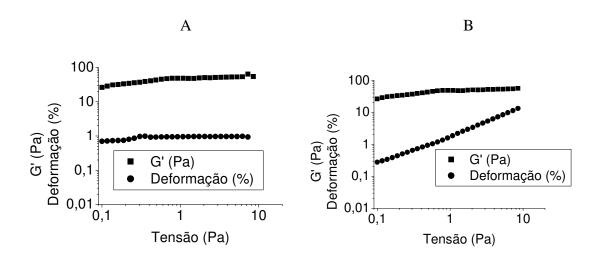


FIGURA 25. REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA REGIÃO DE COMPORTAMENTO VISCOELÁSTICO LINEAR PARA O AMIDO DE MILHO COM ALTOS TEORES DE AMILOPECTINA (WS) (25 g/L). (A) FREQUÊNCIA DE 0,01 Hz E (B) FREQUÊNCIA DE 10 Hz, TEMPERATURA DE 25 °C.

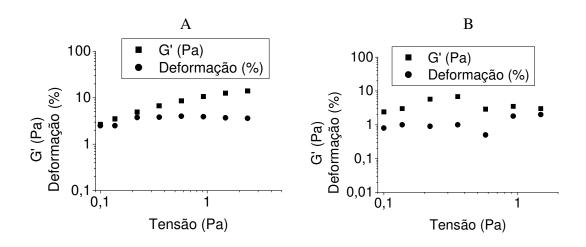
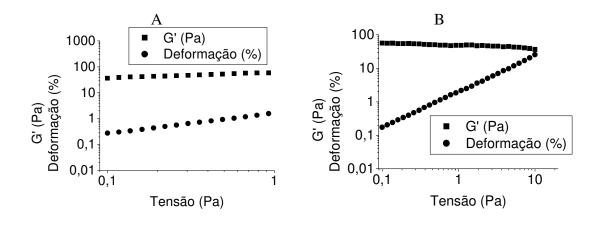
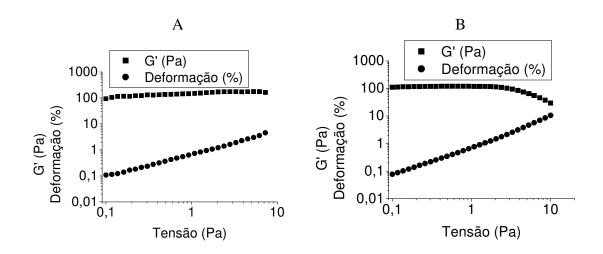


FIGURA 26. REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA REGIÃO DE COMPORTAMENTO VISCOELÁSTICO LINEAR PARA O AMIDO DE CARÁ (YS) (25 g/L). (A) FREQUÊNCIA DE 0,01 Hz E (B) FREQUÊNCIA DE 10 Hz, TEMPERATURA DE 25 °C.



Foi determinada também a região viscoelástica linear para as misturas amidos (20 g/L) – ι -CAR (5 g/L), cujo comportamento viscoelástico linear foi muito semelhante para os todos os sistemas. Na FIGURA 27 está demonstrado o comportamento da mistura amido de Cará (20 g/L) – ι -CAR (5 g/L).

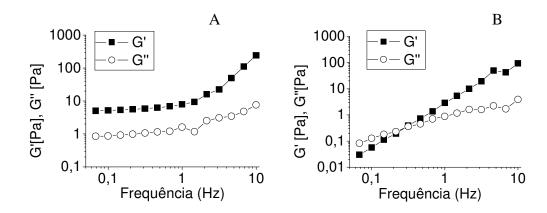
FIGURA 27. REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA REGIÃO DE COMPORTAMENTO VISCOELÁSTICO LINEAR PARA A MISTURA AMIDO DE CARÁ (20 g/L) - 1-CAR (5 g/L). (A) FREQUÊNCIA DE 0,01 Hz E (B) FREQUÊNCIA DE 10 Hz, TEMPERATURA DE 25 °C.



Com os resultados acima foi definido o valor de tensão escolhida para os testes de varredura de freqüência, que foi de 0,1 Pa, tanto para as amostras de amido quanto para as misturas com o hidrocolóide, onde a deformação nessa tensão foi inferior a 10%, ou seja, a tensão ou a deformação aplicada não altera a estrutura física do sistema em estudo.

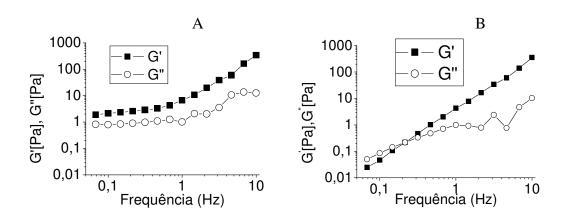
Na Figura 28 está demonstrado a variação dos módulos G' e G" em função da freqüência para o amido de milho comum (CS) (25 g/L) e para a mistura ι-CAR (5 g/L) – CS (20 g/L). O espectro mecânico de CS demonstrou que o módulo de armazenamento (G') foi aproximadamente três vezes superior ao módulo de perda (G"), em toda a faixa de freqüência analisada, entretanto os módulos demonstraram dependência da freqüência acima de 1 Hz (FIGURA 28A). A presença de ι-CAR (5 g/L) na mistura alterou a estrutura de gel formada pelo amido sozinho, uma vez que originou uma solução viscoelástica, demonstrada pelo cruzamento dos módulos (G' e G") acima de 0,2 Hz (FIGURA 28B).

FIGURA 28. MÓDULO ELÁSTICO (G'), MÓDULO VISCOSO (G'') EM FUNÇÃO DA FREQUÊNCIA PARA (A) CS (25 g/L) E (B) MISTURA 1-CAR (5 g/L)-CS (20 g/L), SENSOR pp35/Ti, DEFORMAÇÃO DE 1%, A 25 °C.



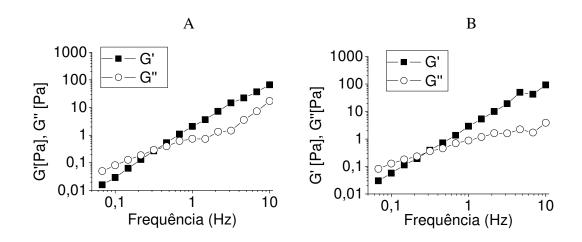
Comportamento semelhante foi observado para o amido de milho com altos teores de amilose (MS) sozinho, e para a mistura desse amido com ι-CAR. A diferença entre os módulos na pasta formada por MS (25 g/L) caracteriza o sistema como um gel fraco, e após a adição da carragenana as propriedades físicas foram modificadas, originando uma solução viscoelástica (FIGURA 29B).

FIGURA 29. MÓDULO ELÁSTICO (G'), MÓDULO VISCOSO (G'') EM FUNÇÃO DA FREQUÊNCIA PARA (A) MS (25 g/L) E (B) MISTURA 1-CAR (5 g/L)-MS (20 g/L), SENSOR pp35/Ti, DEFORMAÇÃO DE 1%, A 25 °C.



O próximo amido analisado foi o de amido de milho com altos teores de amilopectina (WS) e o sistema binário (amido e carragenana). Para o WS (25g/L) e para a mistura ι-CAR (5 g/L) – WS (20 g/L), ambos os módulos foram dependentes da freqüência. Nesse caso a presença da iota-carragenanan não alterou o sistema com o WS sozinho, uma vez que o mesmo já apresentava comportamento típico de solução viscoelástica (FIGURA 30).

FIGURA 30. MÓDULO ELÁSTICO (G'), MÓDULO VISCOSO (G") EM FUNÇÃO DA FREQUÊNCIA PARA (A) WS (25g/L) E (B) MISTURA ι-CAR (5 g/L)-WS (20 g/L), SENSOR pp35/Ti, DEFORMAÇÃO DE 1%, A 25 °C.

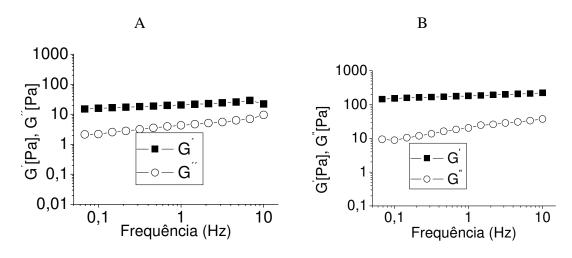


Nas misturas CS ou MS a presença de 1-CAR (5 g/L) alterou a viscoelasticidade quando comparada com os amidos sozinhos, e com WS a mistura originou uma solução com maior caráter viscoelástico. Em todos os reogramas das misturas, os módulos foram dependentes da freqüência e o cruzamento do módulo de armazenamento G' ocorreu em freqüências superiores a 0,2 Hz.

Quando foi avaliado o amido de Cará (YS) sozinho e na presença de ι-CAR, os reogramas do YS (25 g/L) e da mistura ι-CAR (5 g/L) – YS (20 g/L) demonstraram comportamento diferente em relação aos outros amidos analisados. O espectro mecânico do YS sozinho demonstrou típico

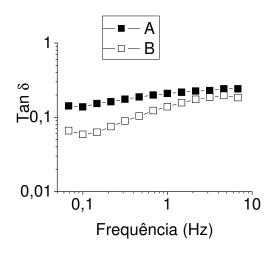
comportamento de gel, com G' superior ao G' e o módulo elástico com menor dependência da freqüência (FIGURA 31A). Comportamento praticamente idêntico, apesar do valor maior dos módulos, foi observado com a mistura ι-CAR – YS.

FIGURA 31. MÓDULO ELÁSTICO (G'), MÓDULO VISCOSO (G") EM FUNÇÃO DA FREQUÊNCIA PARA (A) YS (25 g/L) E (B) MISTURA ι -CAR (5 g/L)-YS (20 g/L), SENSOR C60/2° Ti, DEFORMAÇÃO DE 1%, A 25 °C.



Para se determinar a força de um sistema gelatinizado, deve-se avaliar não apenas módulo de armazenamento ou dinâmico (G'), mas a relação apresentada entre o módulo de perda ou viscoso (G'') e o módulo de armazenamento ou dinâmico (G'), obtendo-se assim o Tan δ . Quanto menor for o valor dessa tangente, menor será o valor de G'' e maior o de G', indicando assim uma estrutura mais rígida ou um gel mais forte. Na Figura 32 pôde-se observar claramente que os valores de Tan δ foram maiores para o YS sozinho (0,21 em 1 Hz), caracterizando esta pasta como um gel forte. Na mistura o valor de Tan δ foi menor comparado com o amido sozinho, o que caracteriza o gel formado pela mistura mais forte que o gel formado pelo amido sozinho, resultado proveniente da presenca de ι -CAR no sistema.

FIGURA 32. GRÁFICO DE Tan δ EM FUNÇÃO DA FREQUENCIA PARA (A) YS (25 g/L) e (B) MISTURA 1-CAR (5 g/L) – YS (20 g/L).



Esses resultados demonstraram que a ι-CAR não apresentou o mesmo grau de interação com os diferentes amidos. A presença do ficocolóide enfraqueceu a rede formada com CS, MS e WS, mas com YS na mesma concentração, a presença de ι-CAR proporcionou aumento da rigidez do gel.

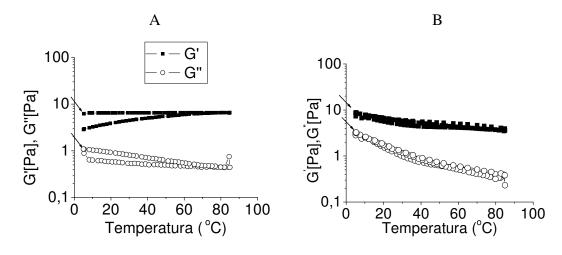
Enquanto as descrições sobre a geleificação de amilose têm sido relatadas na literatura (CLARK et al., 1989; DOUBLIER e CHOPLIN, 1989; DOUBLIER et al., 1990) existem poucos estudos que discutem as propriedades reológicas de misturas amidos-hidrocolóides, e principalmente, no caso das carragenanas a grande maioria dos trabalhos foram realizados com a kappa-carragenana (TECANTE e DOUBLIER, 2002; TESTER e SOMMERVILLE, 2003; VERBEKEN et al., 2004; SHI e BeMILLER, 2002; LAI et al., 1999; TYE, 1988).

Em relação a geleificação das carragenanas esta ocorre em função da formação da hélice, embora nem sempre esse processo leve a geleificação (PICULELL et al., 1997). Considerando que as condições de geleificação de ambas (kappa- e iota-carragenanas) estão diretamente relacionadas com as condições necessárias para que ocorra a transição conformacional de fita para hélice e, uma vez que essa transição ocorre em função da temperatura (REES et

al., 1982) ou pela adição de sal (ROCHAS e RINAUDO, 1984), posteriormente foi avaliado o efeito da temperatura no comportamento reológico dessas misturas, pois essas variações podem melhorar a interação entre os polímeros.

O comportamento do amido de milho com altos teores de amilose (MS 25 g/L) demonstrou que o gel formado não fundiu na faixa de temperatura analisada (5 – 85°C), porém no resfriamento, em temperaturas inferiores a 50°C, houve uma diminuição proporcional de ambos os módulos (G´ e G´´), o que demonstra que essa pasta de amido sozinho apresenta histerese térmica (FIGURA 33A). No entanto, a substituição de 20% de MS pela 1-CAR possibilitou a melhora de algumas características, demonstrado pela ausência de histerese (FIGURA 33B).

FIGURA 33. MÓDULO ELÁSTICO (G´), MÓDULO VISCOSO (G'') EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA PARA (A) MS (25 g/L) E (B) MISTURA 1-CAR (5 g/L) – MS (20 g/L). SENSOR pp35/Ti, FREQUÊNCIA DE 1 Hz E DEFORMAÇÃO DE 1%. (\rightarrow AQUECIMENTO DE 5-85 °C E RESFRIAMENTO DE 85-5 °C)

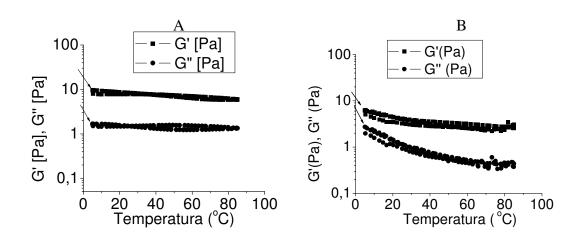


Foi possível observar que a variação de temperatura influenciou no comportamento reológico dos biopolímeros, uma vez que efeito sinérgico mais intenso ocorreu na faixa de temperatura entre 45 – 85°C, nessa faixa a diferença entre os módulos foi maior. A presença da ι-CAR refletiu na ausência de histerese

o que confere maior resistência da mistura à variação térmica. Esses resultados demonstraram que a pasta de amido sozinho é altamente susceptível à variação de temperatura e na presença da 1-CAR, houve uma pronunciada interação, o que resultou em uma melhora na estabilidade do gel quando comparado com o gel de MS sozinho.

Comportamento muito semelhante foi observado com o amido de milho comum sozinho (CS) assim como para a mistura (ι -CAR – CS) (FIGURA 34) com a diferença que a pasta de CS não apresentou histerese. Neste contexto a presença de ι -CAR não alterou essa característica, porém géis mais macios foram obtidos entre 45 – 85°C (FIGURA 34B).

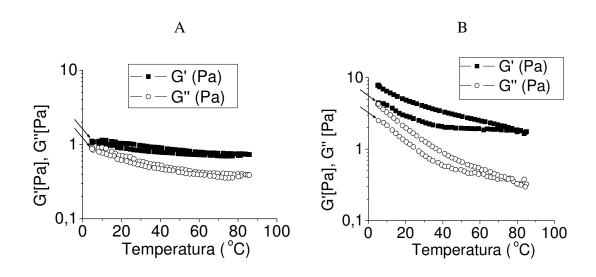
FIGURA 34. MÓDULO ELÁSTICO (G´), MÓDULO VISCOSO (G") EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA PARA (A) CS (25 g/L) E (B) 1-CAR (5 g/L) – CS (20 g/L). SENSOR pp35/Ti, FREQUÊNCIA DE 1 Hz E DEFORMAÇÃO DE 1%. (\rightarrow AQUECIMENTO DE 5-85 °C E RESFRIAMENTO DE 85-5 °C).



Quando foi avaliado o efeito da temperatura na pasta formada pelo amido de milho com altos teores de amilopectina sozinho (WS) a pasta não fundiu em toda a faixa de temperatura analisada (5 – 85°C) e não apresentou histerese

(FIGURA 35). O reograma da pasta formada pela mistura ι-CAR (5 g/L) – WS (20 g/L) apresentou comportamento diferente do observado na interação entre WS e xiloglucana (FREITAS et al., 2003), pois com a ι-CAR houve aumento dos módulos no resfriamento (FIGURA 35B). Adicionalmente, a presença de ι-CAR (5 g/L) não modificou a estabilidade térmica da mistura, ausência de fusão, e maior diferença entre os módulos foi observada em temperaturas superiores a 50°C. Aparentemente, nesse caso, o aquecimento no reômetro foi necessário e importante, proporcionando maior estabilidade e rigidez ao sistema, pois valores mais elevados de ambos os módulos (G´e G´´) foram obtidos durante o aquecimento de 5 – 85°C e seqüencialmente no resfriamento a 5°C.

FIGURA 35. MÓDULO ELÁSTICO (G´), MÓDULO VISCOSO (G") EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA PARA (A) WS (25 g/L) E (B) MISTURA 1-CAR (5 g/L) – WS (20 g/L). SENSOR pp35/Ti, FREQUÊNCIA DE 1 Hz E DEFORMAÇÃO DE 1%. (\rightarrow AQUECIMENTO DE 5-85°C E RESFRIAMENTO DE 85-5°C).



Dependendo da razão dos biopolímeros e da técnica de geleificação, um dos polímeros forma uma fase contínua na qual o outro está disperso ou pode ser

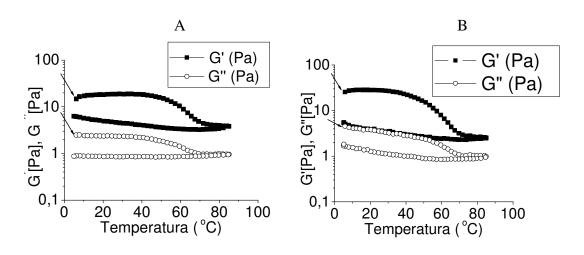
formado um sistema bi-contínuo, duas redes contínuas (AUTIO et al., 2002). Embora, a presença da ι-CAR tenha alterado o comportamento, de ambos os amidos MS e WS, influenciada pela temperatura, algumas diferenças puderam ser observadas.

O aumento dos módulos foi muito semelhante nas duas misturas, embora a mistura ι-CAR-WS tenha sido aparentemente maior após o aquecimento no reômetro. O perfil reológico não foi alterado pelo reaquecimento de 5 – 85°C (dado não mostrado), demonstrado pela ausência de histerese no sistema. De maneira diferente na mistura com MS, as características reológicas e, aparentemente, a interação entre os polímeros foram independentes do aquecimento ou do resfriamento.

Em contraste, a pasta formada pelo amido de Cará sozinho (YS) (25 g/L) e pela mistura 1-CAR (5 g/L) – YS (20 g/L) formou um gel forte demonstrado pela diferença dos valores dos módulos (FIGURA 31, pág. 124). O comportamento reológico dessa mistura não foi alterado em toda a faixa de temperatura analisada de 5 – 85°C representado pelo maior valor do módulo elástico (G´) em relação ao módulo viscoso (G´´). Porém, intensa histerese térmica foi observada em ambos os géis, uma vez que houve variação dos módulos durante o processo de aquecimento-resfriamento, o que pode indicar agregação das hélices do amido após o resfriamento (FIGURA 36).

Para avaliar se esse comportamento poderia ser decorrente da retrogradação do amido, o material teria que ser analisado após 120 hs de armazenamento (MUNHOZ; WEBER; CHANG, 2004) uma vez que o processo de retrogradação se trata da reconstrução de uma estrutura mais rígida devido às cadeias de amilose ficarem mais disponíveis para se rearranjarem durante o *shelf-life* (tempo de patreleira) do produto alimentício, resultando em maior perda de água do sistema e endurecimento do produto final.

FIGURA 36. MÓDULO ELÁSTICO (G´), MÓDULO VISCOSO (G´´) EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA PARA (A) YS (25 g/L) E (B) MISTURA ι -CAR (5 g/L) – YS (20 g/L). SENSOR C60/2° Ti, EM FREQUÊNCIA DE 1 Hz E DEFORMAÇÃO DE 1%. (\rightarrow AQUECIMENTO DE 5-85 °C E RESFRIAMENTO DE 85-5°C).



Outro aspecto avaliado foi grau de inchamento dos géis formados pelo YS (25 g/L) e pela mistura ι-CAR (5g/L) – YS (20 g/L), determinado pelo teste de inchamento (*sweelling*) (POLNOK et al., 2004). Esse experimento demonstrou que a presença da ι-CAR alterou o taxa de inchamento (Q) do gel. Foi observado que os valores para YS (25 g/L) e para a mistura ι-CAR (5g/L) – YS (20 g/L) foram 0,8 (± 0,12) e 2,4 (± 0,11), respectivamente. Este comportamento demonstra que a capacidade de captação de água da mistura foi três vezes superior em relação ao gel formado somente pela YS (25 g/L). A ι-CAR origina um gel com maior capacidade de absorção de água resultando na melhora no inchamento do gel. Não foi avaliada, no entanto, a capacidade de retenção de água nesse sistema. A intensa histerese observada no reograma pode indicar que há perda de água do sistema.

Os experimentos demonstraram que as características de todas as misturas foram dependentes do processo aquecimento-resfriamento. No sistema CS e MS géis mais macios e estáveis foram obtidos em faixas de temperaturas variando

entre 45 – 85°C e o módulo elástico foi menos dependente da temperatura nessa região.

Com WS melhores características foram obtidas durante o resfriamento, após o aquecimento no reômetro. Essa melhor interação pode ser decorrente da formação de um sistema mais homogêneo obtido após o aquecimento, o qual permitiu a presença de maior concentração da carragenana na fase contínua intensificando a interação entre os polímeros.

A presença de histerese térmica observada na mistura ι-CAR (5 g/L) – YS (20 g/L) (FIGURA 35) poderia ser reflexo da incompatibilidade termodinâmica dos polímeros (ALLONCLE e DOUBLIER, 1991), mas como o gel de YS sozinho também apresentou histerese, a presença dessa característica não representa incompatibilidade dos polissacarídeos, mas sim poderia ser reflexo da agregação das hélices do amido após sua formação, semelhante ao que acontece com os géis de kappa-carragenana.

Nos sistemas com CS e YS, os quais apresentam conteúdo de amilose mais próximo (27,5 e 36,0%, respectivamente), maior aumento na força do gel foi observado no sistema formado pela mistura ι-CAR – YS. Uma possível explicação para a melhor interação entre ι-CAR – YS são as distintas características da amilopectina presente no amido de cará (YS), onde menos pontos de ramificação estão presentes e as cadeias de amilopectina nesse amido apresentam menor massa molar (MALI et al., 2004) quando comparada com a amilopectina presente no amido de milho comum (CS). Desse modo, os poucos pontos de ramificações no amido de Cará lhes conferem uma estrutura mais linear, o que pode proporcionar uma melhor interação com ι-CAR.

Considerando o conteúdo de amilose, outra possibilidade desse comportamento, segundo ALLONCLE et al., 1989,; quando amidos contendo amilose são misturados com outras macromoléculas, efeitos sinérgicos podem surgir proporcionando aumento da viscosidade das pastas, como resultado da concentração do polímero adicionado na fase contínua. ALLONCLE e DOUBLIER (1991) sugerem que esse comportamento seja devido à separação de fases, e

que ocorra como conseqüência da incompatibilidade termodinâmica entre a amilose e o hidrocolóide adicionado, o qual torna-se predominante na fase contínua. Porém nesse caso, comportamento semelhante seria esperado para a mistura ι-CAR com amido de milho comum (que apresenta valor próximo de amilose, pág. 118) o que não foi observado.

Como géis de amido geralmente compreendem um sistema complexo de grânulos parcialmente gelatinizados em uma matriz de amilose, as características reológicas observadas são dependentes da origem do amido, características do granulo degradado, e a proporções de interação dos componentes no sistema (TECANTE e DOUBLIER, 2002).

Uma vez que o gel mais forte foi obtido no sistema formado pela mistura 1-CAR (5 g/L) - YS (20 g/L) e como o nível de interação entre os biopolímeros está relacionado à concentração dos componentes na fase contínua, posteriormente foi avaliada a influencia da autoclavação nas propriedades reológicas do YS sozinho e na sua interação com a 1-CAR (5 g/L).

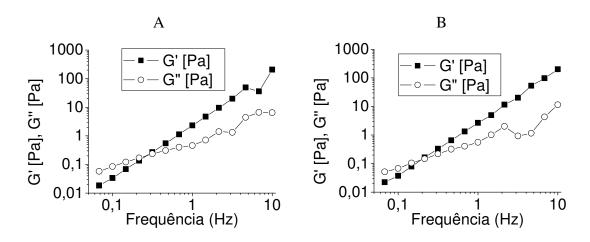
O comportamento reológico da mistura 1-CAR – YS foi avaliado quando a carragenana não foi autoclavada e quando foi autoclavada separadamente.

- (iii) Preparo da mistura (ι-CAR não autoclavada): o amido (20 g/L) e a ι-CAR (5 g/L) separadamente foram solubilizados a 25 °C durante 1 h e meia sob agitação mecânica, o amido foi autoclavado e após autoclavação a ι-CAR foi adicionada. A mistura foi refrigerada por aproximadamente 18 h e mantida a temperatura ambiente antes de iniciar as análises.
- (iv) Preparo da mistura (ι-CAR autoclavada separado): o amido e a ι-CAR foram separadamente solubilizados a 25 °C durante 1 h e meia sob agitação mecânica. Posteriormente o amido e a ι-CAR foram autoclavados separadamente durante 30 minutos. Após autoclavação os polímeros foram misturados e mantidos sob refrigeração por aproximadamente 18 h para posterior análise.

O comportamento das misturas foi muito semelhante em ambos os modos de preparo, originando soluções viscoelásticas (FIGURA 37). Isso demonstrou que

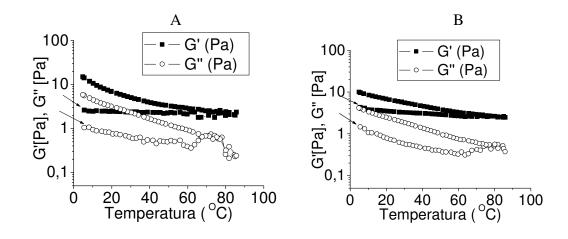
a autoclavação da ι-CAR junto com o amido foi importante, uma vez que originou um gel forte (FIGURA 31, pág. 124).

FIGURA 37. MÓDULO ELÁSTICO (G'), MÓDULO VISCOSO (G") EM FUNÇÃO DA FREQUÊNCIA PARA (A) MISTURA 1-CAR (5 g.L¹) – YS (20 g.L¹), 1-CAR NÃO AUTOCLAVADA E (B) MISTURA 1-CAR (5 g.L¹) – YS (20 g.L¹), 1-CAR AUTOCLAVADA SEPARADO. SENSOR pp35/Ti, DEFORMAÇÃO DE 1%, A 25 °C.



Quando foi avaliada a influencia da temperatura no comportamento das misturas, os sistemas apresentaram comportamentos semelhantes. O comportamento reológico confirmou que a autoclavação da ι-CAR junto com o YS é necessária, para a interação entre os biopolímeros, pois como pode ser observado na Figura 38 o aquecimento no reômetro proporcionou um aumento dos valores dos módulos, possivelmente, devido a maior interação dos polissacarídeos obtida após esse processo. Comportamento semelhante ao observado na mistura ι-CAR – WS (FIGURA 35, pág. 128).

FIGURA 38. MÓDULO ELÁSTICO (G'), MÓDULO VISCOSO (G") EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA PARA (A) MISTURA ι-CAR (5 g/L) – YS (20 g/L), ι-CAR NÃO AUTOCLAVADA E (B) MISTURA ι-CAR (5 g/L) – YS (20 g/L), ι-CAR AUTOCLAVADA SEPARADO. SENSOR pp35/Ti, DEFORMAÇÃO DE 1%, A 25°C.



Como já citado, dependendo da razão dos biopolímeros e da técnica de geleificação, um dos polímeros forma uma fase contínua na qual o outro está disperso (AUTIO et al., 2002). O processo de autoclavação pode estar influenciando no razão dos polímeros na fase contínua, pois quando a carragenana não foi autoclavada, ou foi autoclavada separado do amido, aparentemente menos 1-CAR está dispersa na fase contínua.

Estabelecido com qual amido a 1-CAR apresentou melhor interação, e que a autoclavação dos biopolímeros juntos é importante para a interação dos mesmos, e considerando que a concentração dos polímeros presentes na fase contínua é importante no que diz respeito ao aumento da viscosidade das pastas, seqüencialmente foi avaliada a influência da temperatura antes da autoclavação (pré-aquecimento) nas propriedades reológicas do YS e na mistura com 1-CAR. O modo de preparo das amostras esta descrito abaixo:

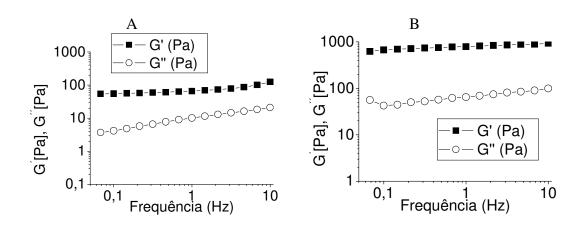
(v) Preparo do amido com pré-aquecimento: YS (25 g/L) foi solubilizado a 85°C durante 1 h e meia sob agitação mecânica, posteriormente foi autoclavado

durante 30 minutos, mantido sob refrigeração aproximadamente 18 h e deixado à temperatura ambiente antes de iniciar as análises.

(v) Preparo da mistura com pré-aquecimento: o amido foi solubilizado com a ι-CAR a 85°C durante 1 h e meia, sob agitação mecânica durante 1 h. Posteriormente a mistura foi autoclavada durante 30 minutos, mantida sob refrigeração aproximadamente 18 h e deixada à temperatura ambiente antes de iniciar as análises.

Os reogramas do YS e da mistura t-CAR-YS, pré-aquecidos (85°C) foram muito similares entre si (FIGURA 39) e com aqueles observados sem o pré-aquecimento. A análise da variação dos módulos em função da freqüência demonstrou que o sistema pré-aquecido resultou em um aumento dos módulos, tanto do YS sozinho como da mistura, quando comparado com os mesmos sem o pré-aquecimento (FIGURA 31, pág. 124).

FIGURA 39. SISTEMAS PRÉ-AQUECIDOS A 85°C. MÓDULO ELÁSTICO (G'), MÓDULO VISCOSO (G") EM FUNÇÃO DA FREQUÊNCIA PARA (A) YS (25 g/L) E (B) MISTURA ι -CAR (5 g/L) – YS (20 g/L) COM PRÉ-AQUECIMENTO. SENSOR pp35/Ti, DEFORMAÇÃO DE 1%, A 25 °C.



TECANTE e DOUBLIER, (2002) demonstraram que o módulo de armazenamento (G') dependente fortemente da concentração da kappa-carragenana nas misturas realizadas com amilose. Os resultados desses autores

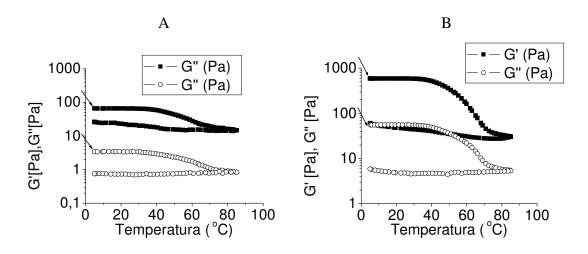
sugerem a existência de pelo menos duas diferentes condições sob as quais forma-se uma fase contínua e uma dispersa, dependendo da concentração de ambos os polímeros.

A mistura pré-aquecida apresentou maior valor do módulo elástico (G') possivelmente porque o pré-aquecimento permitiu a maior solubilidade do amido, aumentando a concentração de amido solúvel e carragenana presentes na fase contínua.

Os perfis das pastas frente à variação de temperatura também foram muito semelhantes, como foi observado para a variação dos módulos em função da freqüência. Assim como para a YS e mistura 1-CAR-YS sem pré-aquecimento (FIGURA 36, pág. 130), os reogramas das pastas pré-aquecidas (FIGURA 40) apresentaram o módulo de armazenamento (G') superior ao módulo de perda (G''), porém a histerese térmica continuou presente em ambos os sistemas, mais intensamente na mistura.

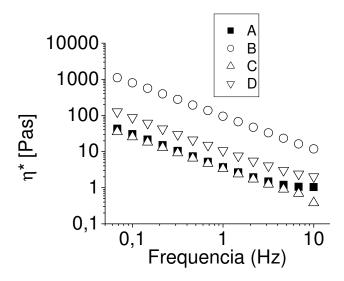
De acordo com ROCHAS e RINAUDO (1980) a concentração de 0,5% de κ-carragenana e a presença de íons é suficiente para promover a geleificação e sob esta condição em um sistema binário (mistura de dois componentes) o comportamento reológico da carragenana é predominante. Neste contexto a mistura ι-CAR – YS apresentou maior histerese térmica possivelmente porque a condição de geleificação utilizada para a ι-CAR (concentração de 0,5%), não foi suficiente para possibilitar a transição fita para hélice. Sendo assim nesse sistema nessas condições há predomínio do comportamento do amido na fase contínua. Foi possível observar que, após o aquecimento, houve dissociação das zonas de junção dentro da rede do gel em ambos os sistemas (amido sozinho e mistura), devido à presença de histerese térmica, essa histerese possivelmente ocorreu devido à agregação das hélices do amido depois de formadas.

FIGURA 40. SISTEMAS PRÉ-AQUECIDOS A 85°C. MÓDULO ELÁSTICO (G´), MÓDULO VISCOSO (G'') EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA PARA (A) YS (25 g/L) E (B) MISTURA 1-CAR (5 g/L) – YS (20 g/L) COM PRÉ-AQUECIMENTO. SENSOR pp35/Ti, EM FREQUÊNCIA DE 1 Hz E DEFORMAÇÃO DE 1%. (\rightarrow AQUECIMENTO DE 5-85 °C E RESFRIAMENTO DE 85-5 °C).



Analisando a viscosidade dinâmica do YS e das misturas 1-CAR-YS preparados com e sem pré-aquecimento, pode-se observar que há um intenso efeito sinérgico no que diz respeito ao aumento da viscosidade quando o sistema foi pré-aquecido (FIGURA 41). Os resultados demonstraram que a interação entre os polissacarídeos foi mais favorável após o aquecimento, o que sugere a cooperação entre ambos os polímeros e posterior agregação das hélices do amido, ocasionando histerese. Outra possibilidade que poderia ser abordada é o aumento da interação decorrente do efeito de exclusão, o que permite maior contração da rede amilose forçada pela presença da 1-CAR. O pré-aquecimento permite uma cooperação entre os biopolímeros, seguida do efeito de exclusão (separação das fases) que aumenta a concentração de 1-CAR na fase contínua.

FIGURA 41. VISCOSIDADE DINÂMICA DAS AMOSTRAS DE (A) MISTURA 1-CAR-YS, SEM PRÉ-AQUECIMENTO (B) MISTURA 1-CAR-YS, PRÉ-AQUECIDA (C) YS, SEM PRÉ-AQUECIMENTO E (D) YS, PRÉ-AQUECIDO. SENSOR pp 35.Ti, EM FREQUÊNCIA DE 1 Hz E DEFORMAÇÃO DE 1%.



Para melhor caracterizar as propriedades reológicas das preparações préaquecidas (YS sozinho e ι-CAR – YS), foi realizada a análise de Cox-Merz, onde se observa a relação demonstrada na equação abaixo:

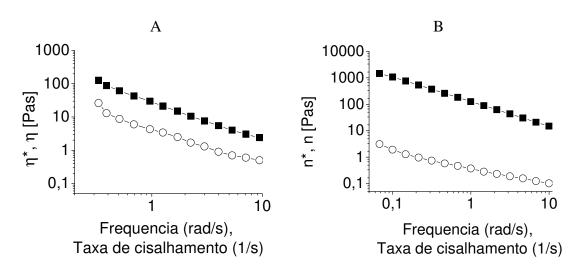
$$\eta^*(\omega) = \eta(\dot{\gamma})\omega = \dot{\gamma}$$
 (Equação 1)

onde η^* representa a viscosidade complexa, η é a viscosidade aparente, ω a freqüência de oscilação (rad/s), e $\dot{\gamma}$ é a taxa de cisalhamento (1/s). Plotando em gráfico se os valores da viscosidade complexa contra a frequência forem maiores do que os da viscosidade aparente contra a taxa de cisalhamento há a formação

de uma estrutura de gel verdadeiro no sistema (HAN et al., 2002; BOT et al., 2001; MARTIN et al., 2003).

Para ambos os sistemas (amido sozinho e mistura) a viscosidade complexa foi maior do que a viscosidade aparente (FIGURA 42), confirmando a formação de um gel forte. Adicionalmente esses gráficos demonstraram que a natureza elástica observada como a razão entre a viscosidade complexa e a aparente foi muito maior na mistura demonstrando, então, um caráter mais sólido nesse sistema.

FIGURA 42. COX-MERZ DO (A) YS (25 g/L) E (B) ι -CAR (5 g/L) – YS (20 g/L) (\blacksquare) VISCOSIDADE COMPLEXA, (O) VISCOSIDADE APARENTE.



A transição do estágio desordenado (fita) para ordenado (hélice) é frequentemente o primeiro passo na geleificação das carragenanas. A conformação de hélice é promovida pela adição de sal ou pela diminuição da temperatura. Pôde-se observar que a condição de geleificação utilizada, concentração (0,5%) de ι-CAR, aparentemente não foi suficiente para permitir a geleificação (transição fita para hélice) e, principalmente, a estabilização da hélice formada. Outra característica importante observada no sistema ι-CAR – YS foi a intensa histerese, que é um fenômeno indesejável encontrado em várias aplicações na indústria de alimentos contendo biopolímeros misturados.

Apesar da formação de um gel mais forte com o pré-aquecimento tanto para YS como para a mistura ι-CAR – YS, ambos os sistemas apresentaram elevada histerese. Como a influência dos sais na formação de hélices das carragenanas já foi relatada (ROCHAS e RINAUDO, 1980; PICULELL et al., 1987) apesar de ainda não ter sido determinada a especificidade deste sal para a iotacarragenana, sequencialmente foi avaliada a influencia do KCI (120 mM), nas misturas ι-CAR (5 g/L) – YS (20 g/L) preparadas com e sem o pré-aquecimento. Para facilitar a compreensão dos resultados foram realizadas as seguintes comparações.

- Mistura ι-CAR YS: sem pré-aquecimento sem sal;
- Mistura ι-CAR YS: sem pré-aquecimento com sal;
- Mistura 1-CAR YS: com pré-aquecimento sem sal;
- Mistura 1-CAR YS: com pré-aquecimento com sal.

Os resultados das misturas sem sal já foram descritos, serão aqui repetidos para facilitar a compreensão. O preparo das misturas com sal foi realizado da seguinte maneira.

- (vi) Preparo da mistura sem pré-aquecimento com sal: o YS foi solubilizado com a ι-CAR a 25°C em uma solução de KCl 120 mM, sob agitação mecânica durante 1 hora e 30 minutos. Posteriormente, a mistura foi autoclavada durante 30 minutos, mantida sob refrigeração por aproximadamente 18 h e deixada a 25°C antes de iniciar as análises.
- (vi) Preparo da mistura com pré-aquecimento com sal: o YS foi solubilizado com a ι-CAR a 85°C em uma solução de KCI 120 mM sob agitação mecânica durante 1 hora e 30 minutos. Posteriormente, a mistura foi autoclavada durante 30 minutos, mantida sob refrigeração por aproximadamente 18 h e deixada a 25°C antes de iniciar as análises.

Quando foi avaliada a influência do sal no sistema ι-CAR (5 g/L) – YS (20 g/L) sem pré-aquecimento os valores dos módulos: elástico (G') e do viscoso (G'')

foram inferiores no sistema preparado na presença de sal (FIGURA 43). O que foi confirmado pelos valores de Tan δ , valores inferiores foram obtidos para a mistura sem aquecimento e sem sal indicando a formação de um gel mais forte nesse sistema (FIGURA 44).

FIGURA 43. MÓDULO ELÁSTICO (G'), MÓDULO VISCOSO (G") EM FUNÇÃO DA FREQUÊNCIA PARA MISTURA 1-CAR (5 g.L¹) -B YS (20 g.L¹) SEM PRÉ-AQUECIMENTO (A) SEM SAL (KCI 120 mM) (B) COM SAL (KCI 120 mM) SENSOR pp35/Ti, DEFORMAÇÃO DE 1%, A 25 °C.

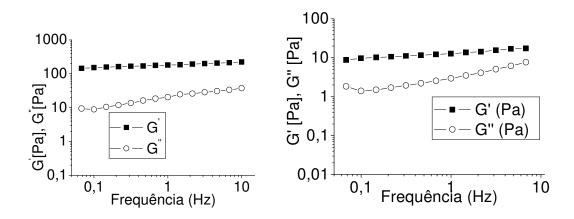
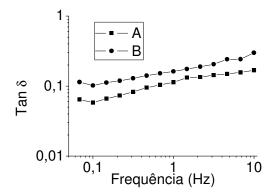
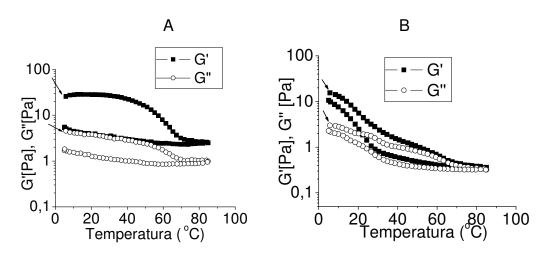


FIGURA 44. GRÁFICO DE Tan δ EM FUNÇÃO DA FREQUÊNCIA PARA (A) MISTURA ι -CAR (5 g/L) – YS (20 g/L), (A) SEM SAL, (B) COM SAL (KCI 120mM).



Aparentemente o sal diminuiu a força do gel, porém quando foi avaliada a influência da temperatura, o sal permitiu maior estabilidade no que diz respeito à diminuição da histerese, que foi significativamente diminuída no sistema com sal, uma vez que a diferença nos módulos elástico e viscoso (G' e G", respectivamente) foi semelhante após o resfriamento (FIGURA 45).

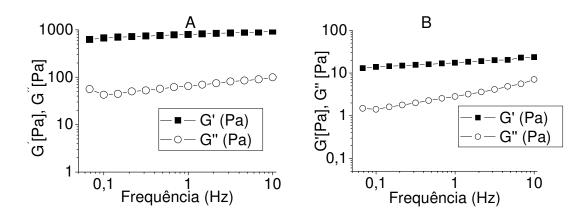
FIGURA 45. MÓDULO ELÁSTICO (G'), MÓDULO VISCOSO (G") EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA PARA 1-CAR (5 g.L¹) – YS (20 g.L¹) SEM PRÉ-AQUECIMENTO (A) SEM SAL (KCI 120 mM) (B) COM SAL (KCI 120 mM) SENSOR pp35/Ti, DEFORMAÇÃO DE 1%, A 25 °C.



A intensa redução na histerese térmica para a mistura preparada com sal, possivelmente ocorre porque a presença de 120 mM de KCl permitiu a transição conformacional fita para hélice, originando estruturas estáveis durante o resfriamento formando uma rede (FIGURA 45). A presença de sal permite a transição conformacional e faz com que haja predomínio do comportamento da ι-CAR no sistema.

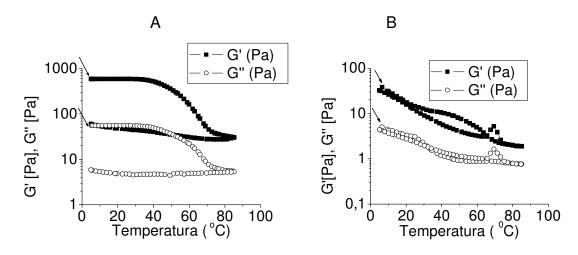
A presença de sal na mistura pré-aquecida, apesar de proporcionar uma redução na histerese, diminuiu a força do gel, observada pelo comportamento reológico demonstrado na Figura 46B.

FIGURA 46. MÓDULO ELÁSTICO (G'), MÓDULO VISCOSO (G") EM FUNÇÃO DA FREQUÊNCIA PARA 1-CAR (5 g.L¹) – YS (20 g.L¹) COM PRÉ-AQUECIMENTO (A) SEM SAL (KCI 120 mM) (B) COM SAL (KCI 120 mM) SENSOR pp35/Ti, DEFORMAÇÃO DE 1%, A 25 °C.



Quando foi avaliada a influência da temperatura no sistema formado, considerando que a diminuição da temperatura e a adição de sal são condições para geleificação da carragenana, a adição do sal permitiu a completa ausência de histerese, no resfriamento, demonstrando a importância do sal (condição geleificante) que permite a transição (fita-hélices) da ι-CAR e a formação de uma rede estável formada pelas hélices do amido e da carragenana (FIGURA 47). Nessas condições um sistema termoestável sem nenhuma histerese foi formado, pois não houve agregação das hélices do amido após sua formação.

FIGURA 47. MÓDULO ELÁSTICO (G'), MÓDULO VISCOSO (G") EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA PARA A MISTURA 1-CAR (5 g.L 1) – YS (20 g.L 1) COM PRÉAQUECIMENTO (A) SEM SAL, (B) COM SAL (KCI 120 mM) SENSOR pp35/Ti, DEFORMAÇÃO DE 1%, A 25 °C.



Correlacionando a estrutura química fina da 1-CAR obtida da alga *M. gelidium* com as propriedades reológicas observadas é importante considerar a presença de unidades precursoras nu-carragenana neste polímero. O hidrocolóide iota-carragenana utilizado industrialmente extraído da alga vermelha *Eucheuma denticulatum* pode conter quantidades de nu-carragenana variando de 0-23 mol%. A nu-carragenana é o precursor biológico da iota-carragenana e a capacidade de formação de hélice da iota-carragenana tende a diminuir proporcionalmente com o aumento da quantidade de unidades nu-carragenana (VAN DE VELDE et al., 2001).

Para avaliar o efeito da presença deste precursor nas propriedades reológicas de iota-carragenana extraída de *E. denticulatum* (VAN DE VELDE et al., 2002b) preparou amostras com variáveis quantidades de nu-carragenana, por tratamento alcalino durante diferentes tempos.

Em contraste à formação de hélices, as propriedades reológicas da iotacarragenana são efetivamente melhoradas pela presença de pequenas quantidades de nu-carragenana. VAN DE VELDE et al (2002b) obtiveram um valor máximo de G' com as amostras de iota-carragenana que apresentaram até 3% de unidades nu-carragenana.

Considerando que a estrutura química fina da 1-CAR de *M. gelidium* é constituída por iota/nu-carragenana (84,0 e 8,0%, respectivamente) quando se avalia a transição conformacional de fita para hélice da iota-carragenana em função da regularidade da sua cadeia, a pequena quantidade de nu-carragenana, presente sem a necessidade de ciclização por tratamento alcalino, possivelmente, influenciou positivamente nas propriedades reológicas.

Foi demonstrado que a capacidade da iota-carragenana de formar uma estrutura ordenada (rede), contendo pequena quantidade de nu-carragenana, é significativamente maior do que de amostras de iota-carragenana puras obtidas por tratamento alcalino (VAN DE VELDE et al., 2002b).

Esse fenômeno pode ser explicado em termos do balanço entre o conteúdo de unidades com capacidade de formação de hélice (iota-carragenana) e o número de ligações cruzadas entre as cadeias. Levando em consideração o fato que unidades de nu-carragenana introduzem na molécula "kinks", pontos de junção na conformação da cadeia permitindo o contato com cadeias vizinhas. Aumentando a quantidade de nu-carragenana há aumento no número de ligações cruzadas na rede, resultando em um aumento na força do gel.

As características estruturais naturalmente encontradas na iota-caragenana de *M. gelidium* lhe conferem importantes características para formação de gel, tanto em sistema isolado, como em associação com diferentes tipos de amido, que apresentam baixo custo e ampla utilização. As associações entre macromoléculas são importantes, pois normalmente determinam a textura e as propriedades dos géis formados conferindo-lhes propriedades funcionais mais atraentes, como por exemplo, a ausência de histerese.

4.1.4. ATIVIDADE ANTIVIRAL DAS GALACTANAS SULFATADAS

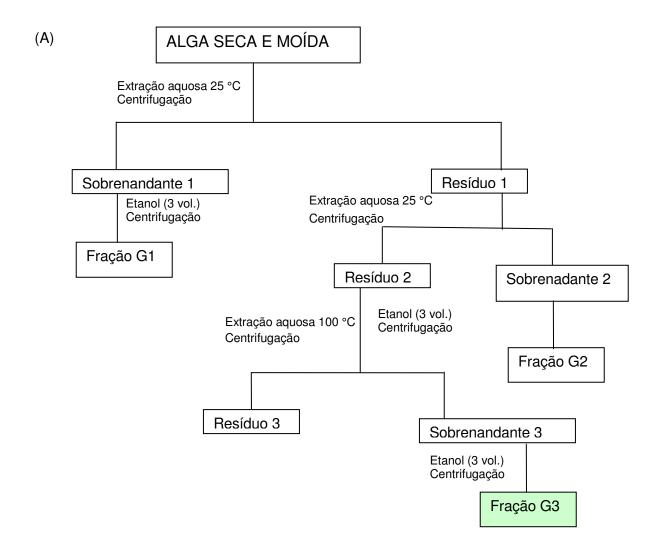
O amplo espectro de atividades biológicas que os polissacarídeos sulfatados apresentam como ação anticoagulante (CARLUCCI et al, 1997, FARIAS et al., 2000), antiviral (DUARTE et al., 2001, 2004; TALARICO et al., 2004, 2005; DAMONTE et al., 1996; CÁCERES et al., 2000), antitumoral (FERNANDEZ et al., 1989; ZHOU et al., 2004) entre outras, motivou a avaliação da atividade antiviral dos polissacarídeos biossintetizados pelas algas *Gymnogongrus griffithsiae* e *Meristiella gelidium*.

O aparecimento de cepas virais resistentes após tratamento prolongado em pacientes imunocomprometidos são as principais razões para se continuar a busca de novos agentes antiherpéticos e avaliar a capacidade que os polissacarídeos sulfatados de algas marinhas apresentam como compostos promissores na terapia antiviral.

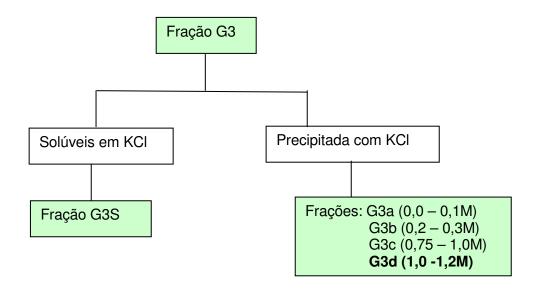
4.1.5. ATIVIDADE ANTIHERPÉTICA E ANTIDENGUE DAS GALACTANAS DE G. griffithsiae

Estudos prévios demonstraram que a alga *Gymnogongrus griffithsiae* (Phylophoraceae) sintetiza majoritariamente carragenana kappa/iota/nu- e agaranas metiladas (FARIA 2002). Com a finalidade de avaliar a atividade antiherpética e antidengue desses polissacarídeos e compará-la com a atividade desempenhada pelos políssacarídeos de *Meristiella gelidium*, a alga *G. griffithsiae* foi submetida ao esquema de extração e purificação para obtenção da fração G3d, conforme descrito na Figura 48. A fração G3d foi submetida a análise de metilação e demonstrou proporção 5:1:1 de iota/nu/kappa -. As demais frações analisadas foram obtidas previamente por Faria (2002).

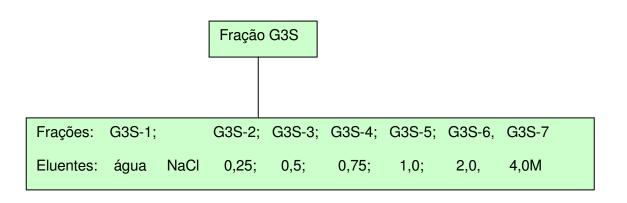
FIGURA 48. FLUXOGRAMA (A) EXTRAÇÃO; (B) FRACIONAMENTO COM KCI E (C) PURIFICAÇÃO POR CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA DAS GALACTANAS DE *G. griffithisiae*.



(B)



(C)



As análises de atividade antiviral que serão mostradas a seguir foram realizadas pelo grupo de Virologia da Universidade de Buenos Aires, sob orientação da Dr^a. Elsa B. Damonte. A análise dos resultados foi feita em colaboração com o nosso Laboratório de Algas Marinhas e publicados por TALARICO et al. (2004, 2005) onde a metodologia encontra-se descrita. Serão discutidos inicialmente os resultados obtidos contra o vírus herpes simplex.

As frações de *G. griffithsiae* foram avaliadas quanto a sua citotoxicidade. O ensaio de viabilidade celular foi realizado através do método do MTT, onde as culturas de células Vero foram expostas a diferentes concentrações de cada fração, para se determinar a concentração citotóxica 50% (CC $_{50}$ concentração que reduz em 50% o número de placas em células Vero) (Tabela 20). Nenhum efeito citotóxico às células Vero foi observado, mesmo em concentrações de 1000 μ g/Ml. Deste modo o valor de CC $_{50}$ foi > 1000 μ g/mL.

Inicialmente foi realizada a avaliação antiherpética das frações polissacarídicas, através de um *screening* antiviral, pelo ensaio de redução de placas virais (HSV-1 estirpe F) em células Vero. Os resultados são demonstrados na Tabela 20, representados na forma de IC₅₀.

O extrato bruto G3 e a fração G3d correspondente a iota/kappa/nu-carragenana (70/14/16 %, respectivamente) obtida a partir do extrato G3 por precipitação fracionada com KCI apresentaram ação antiviral mais efetiva e maiores índices de seletividade inclusive em relação aos compostos de referência (heparina e dextran sulfato) (TABELA 20).

TABELA 20. ATIVIDADE ANTI-HSV-1 E ENSAIO CITOTÓXICO DE GALACTANAS ISOLADAS DE *G. griffithsiae* ^a.

Frações	CC ₅₀ b	IC ₅₀ c	SI ^d	VC ₅₀ e	Sulfato ^f
	$(\mu g/mL)$	$(\mu g/mL)$		$(\mu g/mL)$	NaSO ₃ (%)
G3	>1000	1,1	>909	8,5	33,1
G3d	>1000	1,0	>1000	>20	29,4
G3S	>1000	4,3	>233	>20	9,1
G3S-1	>1000	4,1	>244	n.d.	7,0
G3S-2	>1000	>200	Inativo	n.d.	4,2
G3S-3	>1000	100	>10	n.d.	12,1
G3S-4	>1000	2,4	>417	n.d.	10,5
G3S-5	>1000	5,6	>179	n.d.	21,0
G3S-6	>1000	2,2	>455	>20	35,0
G3S-7	>1000	>200	Inativo	n.d.	20,6
Heparina	>1000	3,0	>333	>20	Nd
DS8000	>1000	2,8	>357	n.d	Nd

^a Tabela de TALARICO et al. (2004).

Dados obtidos de 3 ensaio em duplicata.

nd não determinado

^b Concentração citotóxica, ou concentração necessária para reduzir em 50% a viabilidade celular de células Vero após 48 horas de incubação com cada fração.

^c Concentração inibitória, ou concentração que reduz em 50% o número de placas virais em células Vero.

 $^{^{\}rm d}$ Indice de seletividade ou (CC₅₀/IC₅₀).

^e Concentração virucida, ou concentração necessária para inativar os vírus em 50%, após 1 h e 30 min de incubação com as frações

^fExpresso como NaSO₃

Os extratos mais ativos contra o HSV-1 foram as frações G3, G3d, G3S-4 e G3S-6 com valores de IC $_{50}$ 1,1; 1,0; 2,4; 2,2 µg/mL. O aumento da atividade antiviral de polímeros sulfatados está correlacionado, entre outros fatores, com o grau de sulfatação dessas moléculas. Esta correlação está de acordo com os dados de FARIA (2002) e pôde-se observar que essas galactanas mais ativas estão entre as frações que apresentam maior teor de grupos sulfatado (TABELA 20).

Porém outros fatores estruturais, como o grau de polimerização e a posição de grupos sulfato na estrutura polissacarídica, também podem estar correlacionados com a atividade antiviral.

São cinco glicoproteínas virais (gB, gC, gD, gH e gL) que medeiam a interação e entrada do vírus na célula hospedeira. O passo inicial é a união de gC (HEROLD et al., 1991) e também de gB (HEROLD et al., 1994), com a superfície celular de glicosaminoglicanas, particularmente com o heparan sulfato (SHIEH et al., 1992). Uma vez que o mecanismo de união e entrada do vírus na célula é bastante conhecido, FREYZI et al. (1997), demonstraram que a mínima seqüência na interação do heparan sulfato (HS) da célula hospedeira com a glicoproteína gC do HSV-1 é a seqüência $[\rightarrow 4)$ - β -L-(1 C₄)-IdoA2-OSO₃ -($1\rightarrow 4$)- α -D-(4 C₁)-GlcNR6'-OSO₃ -($1\rightarrow 1$) com no mínimo 10-12 unidades repetitivas (FIGURA 49A).

DUARTE et al. (2004), de maneira comparativa, determinaram que as agaranas de *Acanthophora spicifera*, constituídas por unidades de β -galactopiranose 2-sulfato ligadas a α -galactose 6-sulfato [\rightarrow 3)- β -L-(4 C₁)-Galp2-OSO₃ –(1 \rightarrow 4)- α -L-(1 C₄)-Galp6'-OSO₃ -(1 \rightarrow] (FIGURA 49B), apresentam uma conformação de unidades sulfatadas similar à mínima seqüência do heparan sulfato, e estas unidades podem ser responsáveis pela formação do complexo polissacarídeo-gC e assim pela atividade antiherpética destas galactanas.

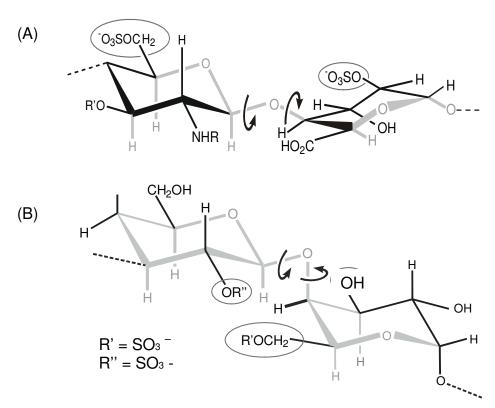
Da mesma forma as galactanas de *C. crenulata*, apresentaram a díade β-D-galactose 2-sulfato ligada a α-L/D-galactose 6-sulfato, o que, por analogia, poderia justificar a atividade antihérpetica desempenhada pelas mesmas (ZIBETTI et al., 2005).

Entre os estudos que têm demonstrado a correlação da atividade antiviral, não somente com o grau de sulfatação, mas também com o posicionamento dos grupos sulfato nas galactanas, CARLUCCI et al., (1997) observaram que as carragenanas de *Gigartina skottsbergii*, submetidas a tratamento alcalino, apresentaram uma atividade antiherpética menor que os polímeros originais. De modo similar a agarana de *Acanthophora spicifera* também apresentou menor atividade antiherpética da galactana tratada com álcali (IC $_{50}$ > 5 μ g/mL) que a respectiva fração original (IC $_{50}$ > 1,4 μ g/mL) (DUARTE et al., 2004). Estes resultados demonstram a importância do posicionamento dos grupos sulfato em C-6 das unidades α -galactose no desempenho da atividade antiviral.

De maneira distinta, a agarana metilada obtida da alga *Georgiella confluens* não apresentou nenhuma atividade antiviral (KOLENDER et al., 2002). Esta galactana possui baixo conteúdo de 3,6-anidrogalactose e ramificação por unidade de xilose ligada no C-4 de β -D-galactose, baixo teor de grupos sulfato (12,8%), os quais estão principalmente (~8 – 9%) ligados na posição C-3 de α -L-galactose, com menores quantidades de sulfatação no C-4 de β -D-galactose (~3 – 4%).

A interação entre as galactanas sulfatadas e a glicoproteína externa do vírus pode levar à inativação viral e/ou bloquear a ligação do vírus ao receptor da célula hospedeira durante a adsorção viral. Para elucidar estas duas possibilidades foi realizado o ensaio de atividade virucida contra o vírus HSV-1. Com exceção da galactana G3 as demais frações avaliadas foram incapazes de inativar o vírus HSV-1 até a concentração de 20 μg/mL. A fração G3 demonstrou fraco efeito virucida com concentração VC₅₀ (8,5 μg/mL) excedendo muito a correspondente concentração antiviral IC₅₀ 1,1 μg/mL (TABELA 20). A lambda-carragenana de *G. skottsbergii*, além da atividade antiviral, é a única relatada que apresenta atividade virucida (CARLUCCI et al., 1997).

FIGURA 49. (A) ESTRUTURA DA MÍNIMA SEQÜÊNCIA DE LIGAÇÃO DO HEPARAN SULFATO. (B) MÍNIMA ESTRUTURA DE LIGAÇÃO DA AGARANA DE *A. spicifera*ª



^a Figura de DUARTE et al. (2004).

As frações G3, G3S, G3d e G3S-6 foram avaliadas através do ensaio de redução de número de placas virais em células Vero, frente a diferentes cepas de HSV, inclusive a uma cepa resistente a aciclovir (B-2006), bem como cepas de HSV-2 (G e MS), sendo determinado a IC₅₀ destes polímeros.

De acordo com os valores observados na Tabela 21, todas as frações polissacarídicas de *G. griffithsiae* foram efetivas contra todos os diferentes tipos de herpes vírus ensaiados. Especificamente todos os compostos foram eficientes inibidores contra cepas B-2006, uma cepa resistente ao aciclovir. Quando avaliada a atividade antiviral contra HSV-2 cepa MS, os valores obtidos

demonstraram que esta cepa foi significativamente mais susceptível a ação inibitória das galactanas (IC_{50} de 0,1-0,4 $\mu g/mL$).

TABELA 21. ATIVIDADE ANTI-HSV-1 E HSV-2 DE GALACTANAS ISOLADAS DE *G. griffithsiae* ^a.

Fração	IC ₅₀ ^b (μg/mL)					
•	HSV-1	HSV-1	HSV-1	HSV-2	HSV-2	
	B 2006	1C3-syn 13-8	1C3-syn 14-1	G	MS	
G3	0,7	3,1	2,7	1,2	0,1	
G3S	2,8	3,4	4,1	3,3	0,4	
G3d	0,4	0,3	3,4	1,0	0,1	
G3S-6	0,8	2,3	16,7	3,2	0,1	
Heparin	1,6	1,1	12,3	1,8	0,6	
DS8000	2,1	0,9	15	2,5	0,6	

^a.Tabela de TALARICO et al. (2004).

Como estas galactanas não apresentaram ou apresentaram baixa atividade virucida (fração G3, TABELA 21), para confirmar o efeito inibitório na etapa de adsorção viral foi realizado um ensaio de redução de placas, adicionando as galactanas em diferentes etapas da replicação viral. Quando a galactana foi omitida na etapa de adsorção viral e foi adicionada somente após a adsorção, nenhuma redução significativa foi observada no número de placas, mesmo em altas concentrações. Por outro lado, quando as galactanas estavam presentes somente na etapa de adsorção viral, ocorreu uma redução de placas significativa e eficaz, bem como na presença das galactanas durante e após adsorção viral. Estes dados indicam que a adsorção viral é o principal alvo antiviral destes polissacarídeos (TABELA 22).

^b Concentração inibitória, ou concentração que reduz em 50% o número de placas em células Vero.

TABELA 22. INFLUÊNCIA DOS DIFERENTES PERIODOS DE TRATAMENTO NA ATIVIDADE DAS GALACTANAS DE *G. griffithsiae* CONTRA HSV-1 ^a.

Fração	IC ₅₀ ^b (μg/mL)			
-	Durante adsorção viral	Após adsorção viral	Durante e após adsorção viral	
G3	0,6	>10	0,7	
G3S	2,8	>10	1,9	
G3d	1,0	>10	1,1	
G3S-6	2,0	>10	0,7	

^a Tabela de TALARICO et al. (2004).

As diferenças observadas na concentração (μg/mL) necessária para atividade antiherpética das galactanas de *G. griffithsiae* corroboram para a já reportada correlação do aumento da atividade antiviral com o aumento do grau de sulfatação dos polímeros. As galactanas G3, G3d e G3S-6 apresentaram elevados teores de grupos sulfato (33,1, 29,4 e 35,0%, respectivamente) e alta atividade antiviral. A galactana G3S apresentou 9,1% de sulfato e baixa atividade antiviral (TABELA 22).

Como já reportado por FARIA (2002) o extrato bruto G3, a galactana precipitada com KCl G3d e a galactana solúvel em KCl 2M posteriormente purificada por cromatografia de troca iônica (FIGURA 47) apresentam algumas semelhanças estruturais. Aproximadamente 50,0% do extrato bruto G3 é composto pela galactana G3d, nessa galactana iota/kappa/nu- homogênea com massa molar de 845.000 g/mol as unidades A estão 4-*O*-sulfatadas (β-D-galactose

^bConcentração inibitória, ou concentração que reduz em 50% o número de placas em células Vero. As células Vero foram infectadas com 50 PFU (unidades formadoras de placas) de HSV-1 na ausência ou presença dos compostos. Após 1 hora de adsorção viral a 4°C, os compostos e os vírus não adsorvidos foram removidos. As células foram então cobertas com meio de manutenção contendo 0,7% de metilcelulose com ou sem os compostos, e então foram incubados por 2 dias a 37 °C. Cada valor representa a média dos ensaios em duplicata.

4-sulfato) e as unidades B na forma do derivado 3,6-anidro- α -D-galactose, estão 70% 2-O-sulfatadas e 13,0% não substituídas e as unidades de galactose 17,0% são sulfatadas no C-2 e C-6 (α -D-galactose 2,6-sulfato). A galactana G3S-6 possivelmente devido a sua massa molar apresentou menor atividade antiviral quando comparada com a galactana G3d.

Assim como as carragenanas de *G. griffithsiae* outras carragenanas têm apresentado potente atividade antiviral, como as kappa/iota de *G. skottsbergii*, (IC₅₀ entre 1,6 - 4,1 μ g/mL, CARLUCCI et al., 1997), as kappa/iota de *G. torulosus* (IC₅₀ entre 2,1 - 0,6 μ g/mL) (ESTEVEZ, 2003) e as iota/alpha de *Stenogramme interrupta* (Phyllophoraceae) (IC₅₀ entre 1,9 - 9,3 μ g/mL) (CÁCERES et al., 2000).

Outro ponto que merece destaque é que essas galactanas foram efetivas contra todas as cepas testadas, inclusive contra as variantes sinciciais de HSV-1, isolados após várias passagens nas células Vero da cepa F de HSV-1 na presença da carragenana antiviral 1C3 (mu/nu-carragenana) (CARLUCCI et al., 2002) e a cepa resistente a aciclovir (B-2006).

A galactana sulfatada G3d de *G. griffithsiae* foi selecionada para a avaliação da atividade antiviral contra quatro sorotipos do vírus da dengue (TALARICO et al., 2005).

Inicialmente foi realizado um *screening* para verificar contra qual sorotipo viral a galactana apresentaria mais atividade (TABELA 23). Heparina e DS8000 (dextran sulfato), dois polissacarídeos comerciais conhecidos pelas suas propriedades antivirais contra vários vírus envelopados, foram utilizados como controles positivos.

TABELA 23. ESPECTRO DE ATIVIDADE ANTI-DENGUE DA GALACTANA G3d EM CÉLULAS VERO^a.

Composto	IC ₅₀ (μg/mL) ^b			
	DENV-1 HW	DENV-2 NGC	DENV-3 H87	DENV-4- 8124
G3d	>50	0.9 ± 0.4	$13,9 \pm 0,3$	>50
Heparina	>50	$1,9\pm0,2$	$10,8 \pm 2,5$	>50
DS8000	>50	0.9 ± 0.1	$18,3 \pm 1,2$	$31,2\pm2,4$

^a Tabela de TALARICO et al. (2005).

Foi possível observar que a atividade antiviral dos polissacarídeos sulfatados foi dependente do sorotipo viral. A galactana G3d inibiu a multiplicação em células Vero do vírus DENV-2 com valor de IC₅₀ por volta de 0,9 μg/mL , enquanto que para heparina o valor necessário foi maior (1,9 μg/mL). Nenhuma citotoxidade foi observada para nenhum dos compostos (CC₅₀ >1000), e o índice de seletividade (SI) foi >1000 (TALARICO et al., 2005). Baseado nestes resultados, a galactana G3d pode ser considerada efetiva e seletiva contra o vírus DENV-2.

Quando foi avaliada a atividade contra o vírus DENV-3, o valor de IC₅₀ contra este sorotipo foi aproximadamente 15 vezes maior do que o valor obtido contra o vírus DENV-2, porém o índice de seletividade obtido contra DENV-3 foi >70, indicando também seletiva inibição deste sorotipo. Contra DENV-1 e DENV-4 a galactana G3d não apresentou atividade.

A variação na susceptibilidade dos sorotipos do vírus da dengue a galactana G3d pode ser devido a diferenças no crescimento destes sorotipos nas células Vero. Para avaliar esta possibilidade o crescimento dos quatro sorotipos do vírus em células Vero foi analisado durante 72 h após a infecção (72 h pi.). Todos os sorotipos replicaram com similar eficiência nas células Vero, não

^b Concentração inibitória 50%: concentração necessária para reduzir o número de placas virais em células Vero em 50%. Cada valor representa a média dos ensaios em duplicata ± o desvio padrão.

podendo ser atribuído o crescimento diferencial à diferença na susceptibilidade a galactana (TALARICO et al., 2005).

Já é conhecido que o vírus da dengue pode infectar diferentes tipos de células e este tropismo celular parece estar diretamente relacionado à patogênese viral (McBRIDE e BIELEFELDT-OHMANN, 2000). Desse modo o efeito inibitório da galactana G3d foi avaliado utilizando duas linhagens de células humanas, PH (fibroblastos) e HepG2 (hepatoma) e em uma linhagem de célula do mosquito C6/36 HT (TABELA 24). Os vírus utilizados neste ensaio foram os mais susceptíveis, os sorotipos 2 e 3.

TABELA 24. ATIVIDADE ANTI-DENGUE DA GALACTANA G3d EM CÉLULAS VERO, HEPG2, PH E C6/36 HT^a.

Composto	IC ₅₀ (ug/mL) ^b			
	Vero	HepG2	PH	C6/36 HT
DENV-2				
G3d	$1,0 \pm 0,1$	$1,8 \pm 0,3$	$0,31 \pm 0,01$	>50
Heparina	$1,6 \pm 0,6$	$6,0 \pm 0,4$	$2,1\pm0,1$	>50
DS8000	$1,8\pm0,2$	$3,6\pm0,2$	$2,\!4\pm0,\!2$	>50
DENV-3				
G3d	$5,2\pm0,1$	$10,\!4\pm1,\!2$	9.5 ± 0.7	>50
Heparina	$9,7\pm1,2$	$6,2\pm0,3$	$3,2\pm0,5$	>50
DS8000	$4,1 \pm 0,5$	$13,9 \pm 1,2$	$6,3\pm0,5$	>50

^a Tabela de TALARICO et al. (2005).

^b Concentração inibitória 50%, ou concentração necessária para inibir o rendimento viral em 50% até 48 h pós infecção (pi). Cada valor representa a média dos ensaios em duplicata \pm o desvio padrão.

A galactana G3d foi um efetivo inibidor do DENV-2 e DENV-3 em células humanas HepG2 e PH. No ensaio com as células HepG2 o efeito antiviral foi semelhante ao observado em células Vero. Nenhuma toxicidade foi detectada em ambas as linhagens de células humanas após a exposição à galactana até concentração de 1000 μg/mL. O valor de SI determinado para G3d nas células humanas contra DENV-2 e DENV-3 foi entre >555 e 6250. Estes dados indicaram que a galactana G3d de *G. griffithsiae* apresentou inibição seletiva para ambos os sorotipos em células humanas, apresentando maior efetividade contra o sorotipo 2, do mesmo modo como descrito para células Vero. Em contraste, nenhum efeito foi observado na multiplicidade de ambos os sorotipos nas células do mosquito C6/36 HT, até a concentração de 50 μg/mL (TABELA 24).

O modo de ação desta galactana foi avaliado utilizando células Vero e DENV-2. Para localizar o alvo da atividade antiviral durante o ciclo de multiplicação do vírus, foi determinada a influência do tempo de adição do polissacarídeo na formação de placas em células Vero. O polissacarídeo foi adicionado simultaneamente com o vírus ou em intervalos de 1 h após a exposição das células ao vírus. Maior efeito inibitório foi observado quando o polissacarídeo foi adicionado às células junto com o vírus (tempo zero) (95,0% de inibição). Quando adicionado imediatamente após a adsorção (1 h pi), a galactana também inibiu efetivamente, reduzindo aproximadamente 75,0% as placas virais. Porém nenhum efeito foi observado em tempos superiores.

Estes resultados sugerem que a etapa de adsorção viral é o principal alvo da galactana contra DENV-2 em células Vero, e a etapa do ciclo viral ocorrendo imediatamente após a adsorção, durante a primeira hora de infecção; provavelmente a internalização viral também parece ser afetada.

Para certificar a ação antiviral nos primeiros estágios do ciclo de multiplicação viral do DENV-2, posteriormente foi avaliada a cinética de adsorção do vírus na presença da galactana.

Os resultados obtidos confirmaram que a galactana G3d inibiu a adsorção do vírus, uma vez que a quantidade de vírus ligados às células foi intensivamente

diminuída nas células tratadas com G3d em comparação com as células infectadas não tratadas (controle) (25 UFP e 100 UFP em 30 minutos de adsorção, respectivamente) (TALARICO et al., 2005). Quando analisada a ação inibitória da galactana na etapa subseqüente do ciclo viral pós-adsorção, pôde-se observar que a determinação do número de placas formadas após a inativação do vírus extracelular, mas não do vírus internalizado, foi significativamente reduzida na presença da galactana, aproximadamente 50 UFP contra 150 UFP em 60 minutos pós-adsorção (TALARICO et al., 2005).

Estes resultados demonstraram que a galactana iota/kappa/nu- de *G. griffithsiae* possui efetiva e seletiva atividade contra os vírus da dengue sorotipos 2 e 3. É importante ressaltar que devido ao comportamento diferencial desta galactana na internalização do vírus na célula, este composto pode ser uma ferramenta útil na elucidação do mecanismo de ligação e internalização dos sorotipos da dengue em células de vertebrados e invertebrados.

Foi importante avaliar a resposta contra diferentes sorotipos, uma vez que os quatro sorotipos analisados co-circulam em regiões epidêmicas e já é bem estabelecido que a reinfecção com diferentes sorotipos representa uma significativa ameaça para a saúde humana devido ao desenvolvimento de formas severas da doença hemorrágica da dengue e síndrome de choque da dengue. É interessante ressaltar este ponto, pois esta seletividade também pode ser observada com outras substâncias antivirais.

4.1.6. ATIVIDADE ANTIHERPÉTICA E ANTIDENGUE DAS GALACTANAS DE *M. gelidium* E COMPARAÇÃO COM AS GALACTANAS DE *G. griffithsiae*.

Os extratos brutos M1 (extração a 25 °C), M3 (extração a 100 °C) e a carragenana iota/kappa- homogênea (M3a), Mw: 956.700 g/mol, obtidos da alga *M. gelidium* foram selecionados para avaliação da sua atividade antiviral contra os vírus HSV-2 e DENV-2. Heparina e dextran sulfato (DS 8000) foram utilizados como polissacarídeos antivirais de referência.

Nenhuma toxicidade foi observada com qualquer dos polissacarídeos avaliados até a concentração de 1000 μg/mL (TABELA 25).

TABELA 25. ATIVIDADE ANTIVIRAL CONTRA VÍRUS HERPES SIMPLEX E VÍRUS DA DENGUE DAS FRAÇÕES DE *M. gelidium*.

Fração	CC ₅₀ ^a (µg/mL)	IC ₅₀ ^b (μg/mL)	
		HSV-2 (MS)	DENV-2 (NGC)
M1	> 1000	0,06 ± 0,01	0,79 ± 0,04
M3	> 1000	0.05 ± 0.02	0,14 ± 0,01
МЗа	> 1000	0.04 ± 0.01	$0,21 \pm 0,04$
Heparin	> 1000	0.6 ± 0.1^{c}	$1,9 \pm 0,2^{d}$
DS 8000	> 1000	0,6 ± 0,1°	0,9 ± 0,1 ^d

^a Concentração citotóxica 50%: concentração do composto necessária para reduzir viabilidade das células Vero em 50% após 48 h de incubação.

Estes compostos apresentaram elevada atividade antiherpética com IC $_{50}$ de $0,04-0,06~\mu g/mL$. A efetividade dos extratos brutos de M. gelidium foi superior ao correspondentes extratos de G. griffithsiae (TABELA 20). O valor de IC $_{50}$ do extrato bruto G3 (1,1 $\mu g/mL$) foi duas vezes maior que os valores obtidos para M1 e M3. No entanto, quando consideramos as galactanas obtidas após precipitação com KCI, as carragenanas G3d e M3a das duas algas apresentaram o mesmo nível de atividade (TABELA 25 e 20). O índice de seletividade (SI) foi muito maior (25000) para M3a, do que para G3d (SI = >1000).

^b Concentração inibitória 50%: concentração do composto necessária para reduzir o número de placas virais nas células Vero em 50%.

A atividade antiviral das galactanas de $\it M.~gelidium$ contra o vírus da dengue, sorotipo 2 (DENV-2) foi menor do que a detectada contra o vírus herpes simplex (HSV-2) (TABELA 25). Estas galactanas apresentam valores de IC $_{50}$ entre 0,14 – 0,16 µg/mL. Os extratos brutos e a fração homogênea de $\it M.~gelidium$ foram inibidores mais efetivos do DENV-2 do que os polissacarídeos de $\it G.~griffithsiae$ (TABELA 23).

Os resultados demonstraram que a carragenana M3a da alga *M. gelidium* foi, entre os polissacarídos sulfatados obtidos de algas vermelhas, o mais potente, considerando o seu efeito inibitório contra o herpes vírus (HSV-2) (DAMONTE et al., 2004).

As carragenanas G3d (Mw = 845.000 g/mol) e M3a (Mw: 956.700 g/mol) constituídas por iota/kappa/nu- 70/14/16 % e 84/4/6 %, respectivamente, apresentam sulfatação no C-4 das unidades β-D-galactopiranose é responsável pela atividade antiviral das carragenanas do tipo kappa- (CARLUCCI et al., 1997, 1999; DAMONTE et al., 2004). Nas carragenanas do tipo iota- a presença de grupos carregados no C-2 das unidades 3,6-anidrogalactose podem contribuir para atividade antiviral.

Como ambas galactanas apresentam similar massa molar, estrutura química e grau de sulfatação (G3d = 29,4% e M3a = 29,0%), fatores conformacionais decorrentes da distribuição das díades de iota/kappa- e nucarragenana ao longo destes polímeros podem ser responsáveis pela atividade diferencial destas carragenanas. A maior percentagem de iota- e menor percentagem de kappa- e nu-carragenana podem conferir à galactana M3a conformação mais efetiva para interação com a glicoproteína gC, responsável pela inibição da adsorção viral.

Em resumo, as carragenanas de *G. griffithsiae* e *M. gelidium* são potentes inibidores da adsorção do vírus da herpes simplex à célula hospedeira, apresentam alto índice de seletividade e por estas razões são promissores agentes profiláticos para uso tópico contra infecções genitais pelo HSV-2.

5.0. CONCLUSÕES

1- A partir da alga vermelha *Meristiella gelidium* (Solieriaceae, Gigartinales) mediante extração aquosa a 25°C e a 100°C e tratamento com KCI, foram obtidas as carragenanas M1a, M2b e M3a com massa molar média (Mw) 425.600 ; 950.800 e 956.700 g/mol, respectivamente.

Análises espectroscópicas (RMN de ¹³C e FT-IR) e as análises de metilação confirmaram que estas carragenanas são constituídas: 84% das díades em M1a e M3a são de iota-carragenana e díades de kappa- e nu-carragenana, estão presentes em baixa percentagem 4 % e 6-8%, respectivamente.

Além das carragenanas a alga *M. gelidium* sintetiza agaranas solúveis em KCl 2M que foram purificadas mediante cromatografia DEAE-Sephacel originando as agaranas M3S-3 e M3S-4.

A agarana M3S-3 (Mw = 187.000 g/mol) apresenta ~40% das unidades A 2-O-sulfatadas enquanto as unidades B são ~87% substituídas em C-3 por grupos sulfato, as quais estão em parte substituídas em C-2 por unidades simples de xilose (~30%) ou grupos sulfato (~18%).

Características estruturais semelhantes, em relação ao padrão de sulfatação foram determinadas para agarana M3S-4 (Mw = 61.430 g/mol). Nesta, \sim 60% das unidades A estão representadas por β -D-galactose 2-sulfato e, \sim 75% das unidades B por α -L-galactose 3-sulfato. De modo diferente, unidades simples de xilose glicosilam o C-6 de parte das unidades A. Ressalta-se que estas características estruturais (β -D-galactose 2-sulfato ligada à α -L-galactose 3-sulfato) são descritas pela primeira vez.

2- O extrato bruto M1 obtido da alga *M. gelidium*, constituído majoritariamente por iota-carragenana (1,0%; 120mM de KCl) forma gel, com temperatura de transição acima de 45 °C e sem histerese.

As misturas iota-carragenana (5 g/L) e amidos (20 g/L), quando os biopolímeros foram autoclavados juntos sem pré-aquecimento e sem sal, soluções viscoelásticas foram obtidas com os amidos de milho comum, amido de milho rico

em amilose e amido de milho rico em amilopectina. De modo distinto com o amido de cará um gel foi formado.

Nos sistemas iota-carragenana e amido de milho comum, amido de milho rico em amilose e amido de milho rico em amilopectina, efeito sinérgico mais intenso ocorreu em função da temperatura, entre 45 – 85°C, nesta faixa a diferença entre os módulos foi maior.

A iota-carragenana evitou a histerese térmica na mistura com o amido de milho rico em amilose Com o amido de milho comum não ocorreu alteração do comportamento e com o amido de cará a histerese não foi evitada na pasta formada.

O processo de autoclavação dos polissacarídeos juntos (amido de cará e iota-carragenana) é importante, pois permite maior solubilização do amido originando um gel e não solução viscoelástica.

O pré-aquecimento dos biopolímeros influência aumentando a força do gel, possivelmente ocasionado pela maior solubilidade do amido originando um gel mais forte, porém com intensa histerese térmica.

Já a presença de sal (KCl 120 mM) no sitema estabiliza a hélice da carragenana e a rede formada entre os biopolímeros é melhor, forma-se uma rede mais estável e um gel sem histerese térmica.

Nos sistemas avaliados destacam-se as pastas formadas entre a iotacarragenana e amido de milho rico em amilose e amido de Cará que apresentam propriedades reológicas mais interessantes para fins industriais (ausência de histerese e aumento da força do gel, respectivamente).

3- Atividade antiviral contra o vírus da herpes simplex e vírus da dengue foi avaliada utilizando as carragenanas e/ou agaranas de *Meristiella gelidium* e *Gymnogongrus griffithsiae*.

Diversas frações obtidas de *G. griffithsiae* apresentaram atividade antiherpética frente a diferentes cepas de HSV-1 e HSV-2 e são desprovidas de citotoxicidade contra células Vero (CC₅₀ >1000 μg/mL). O extrato bruto G3 e a

carragenana G3d (iota/kappa/nu-carragenana 70/14/16%, respectivamente) apresentaram potente atividade antiherpética ($IC_{50} \sim 1 \mu g/mL$). Estes compostos atuam inibindo a etapa de adsorção do vírus à células hospedeira.

As carragenanas M1, M3 e M3a isoladas de *M. gelidium* apresentam potente atividade contra HSV-2 (IC₅₀ 0,04 – 0,06 μ g/mL) e são desprovidas de atividade citotóxica (CC₅₀ > 1000 μ g/mL).

A carragenana M3a de *M. gelidium* apresentou maior atividade contra HSV-2 e DENV-2 (frente à células Vero) que a carragenana G3d de *G. griffithsiae*. Ambas galactanas apresentam similar grau de sulfatação, massa molar e estrutura química. Fatores conformacionais decorrentes da proporção e distribuição das díades de iota/kappa- e nu-carragenana ao longo destes polímeros podem ser responsáveis pela atividade diferencial destas carragenanas.

A carragenana M3a isolada de *M. gelidium* é o composto que apresenta maior índice de seletividade relatado na literatura (IS 25000) sendo, portanto um composto promissor na profilaxia contra o herpes genital HSV-2.

6.0. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLONCLE, M.; LEFEBVRE, J.; LLAMAS, G.; DOUBLIER, J.L. A rheological characterization of cereal starch-galactomannan mixtures. **Cereal Chem.**, v. 2, p. 90-93, 1989.

ALLONCLE, M.; DOUBLIER, J.L. Viscoelastic properties of maize starch/hydrocolloid pastes and gels. **Food Hydrocol.**, v. 5, p. 455-467, 1991.

ARAKI, C. Some recent studies on polysaccharides of agarophytes. **Proc. Int. Seaweed Symp.,** v. 5, p. 3-16, 1966.

ARMISEN, R. Agar and agarose biotechnological applications. **Hydrobiologia.**, v. 221, p. 157-166, 1991.

ASPINALL, G.O. **Polysaccharides**, First edition. Pergamon Press, New York. 228 pp, 1970.

AUTIO, K., VESTERINEN, E., STOLT, M. Rheological properties of mixed starch-κ-carrageenan gels in relation to enzymatic digestibility. **Food Hydrocol., Oxford.,** v. 16, p. 169-174, 2002.

BABA, M., SNOECK, R. PAUWELS, R., De CLERCQ, E. Sulfated polysaccharides are potent and selective inhibitors of various enveloped viruses, including herpes simplex virus, cytomegalovirus, vesicular stomatitis virus and human immunodeficienty virus. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy.**, v. 32, p. 1742-1745, 1988.

BALFOUR, H. H. Antiviral drugs. **Drug Therapy**, v. 340, p. 1255-1268, 1999.

BARNES, A., HUTTON, J.F., WALTERS, K., **An introduction to Rheology.** Netherlands: Elsevier, 199p. 1989.

BELLION, C., BRIGAND, G., PROME, JC., BOCIEK, D.W. Identification et caractérisation des précurseurs biologiques des carraghénanes par spectroscopie de RMN – ¹³C. **Carbohydr. Res.,** Amsterdam, v.119, p. 31-48, 1983.

BIRD, R.B., STEWART, W. E., LIGHTFOOT, E. N. *Fenomena Transport*. Editorial Reverté, S.A; 1960.

BIXLER, H.J. Recent developments in manufacturing and marketing carrageenan. **Hydrobiologia**, v. 326/327, p. 35-57, 1996.

BOT, A., SMORENBURG, H.E., VREEKER, R., PÂQUES, M., CLARK, A.H. Melting behaviour of schizophyllan extracelular polysaccharide gels in the temperature range between 5 and 20 °C. **Carbohydr. Polymers.,** Essex, v. 45, 363-372, 2001.

BOURGOUGNON, N., LAHAYE, M., CHERMANN, J.C., KORNPROSBST, J.M. Composition and antiviral activities of a sulfated polysaccharides from *Schizymenia dubji* (Rhodophyta, Gigartinales). **Bioorg. Med. Chem. Letters.,** v. 3, p. 1141-1146, 1993.

BOURNE, M. C., *Food texture and viscosity: concept and measurement.* New York: Academic Press, p.325, 1982.

BRASIL, Ministério da Saúde. Fundação Nacional da Saúde. Guia de Vigilância Epidemiológica: Dengue (CID-10 A90). Disponível em: http://www.funasa.gov.br/pub/GVE/PDF/GVE0504.pdf, acessado novembro, 2005.

CÁCERES, P.J.; CARLUCCI, M.J.; DAMONTE, E.B.; MATSUHIRO, B.; ZUÑIGA, E.A. Carrageenans from Chilean samples of *Stenogramme interrupta* (Phyllophoraceae): structural analysis and biological activity. **Phytochem.**, Oxford, v. 53, p. 81-86, 2000.

CARLUCCI, M.J.; PUJOL, C.A.; CIANCIA, M.; NOSEDA, M.D.; MATULEWICZ, M.C.; DAMONTE, E.B.; CEREZO, A.S. Antiherpetic and anticoagulant properties of carrageenans from the red seaweed *Gigartina skottsbergii* and their cyclized derivatives: correlation between structure and biological activity. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 20, p. 97-105, 1997.

CARLUCCI, M.J.; CIANCIA, M.; MATULEWICZ, M.C.; CEREZO, A.S.; DAMONTE, E.B. Antiherpetic activity and mode of action of natural carrageenans of diverse structural types. **Antivir. Res.**, v. 43, p. 93-102, 1999.

CARLUCCI, M. J.; SCOLARO, L. A.; DAMONTE, E.B. Herpes simples virus type 1 variants arising after selection with an antiviral carrageenan: lack of correlation between drug susceptibility and syn phenotype. **J. Med. Virol.**, v. 68, p. 92-98, 2002.

CEREZO, A. S. The carrageenan system of *Gigartina skottsbergii* S. *et* G. Part I. Studies on a fraction of kappa-carrageenan. **J. Chem. Soc. Sect. C. Org. Chem.:** p. 992-997, 1967.

CHARGAF, E.; BRANCROFT, F. W.; STANLEY-BROWN, M. Studies on the chemistry of blood coagulation II. On the inhibition of blood clotting by substances of high molecular weight. **J. Biol. Chem.**, v.115, p.155- 161, 1936.

CHEN, Y., MAGUIRE, T., HILEMAN, R.E., FROMM, J.R., ESKO, J.D., LINHARDT, R.J., MARKS, R,M. Dengue virus infectivity depends on envelope protein binding to target cell heparan sulfate. **Nature Medicine**., v. 3, p. 866–871, 1997.

CHIOVITTI, A.; LIAO, M-L.; KRAFT, G.T.; MUNRO, S.L.A.; CRAIK, D.; BACIC, A. Cell wall polysaccharides from australian red algae of family Solieriaceae (*Gigartinales*, Rhodophyta): Highly methylated carrageenans from the genus *Rhabdonia*. **Bot. Mar.**, Berlin, v.37, p.47-59, 1996.

CHIOVITTI, A.; BACIC, A.; CRAIK, D.J.; MUNRO, S.L.A.; KRAFT, G.T.; LIAO, M-L. Cell-wall polysaccharides from red algae of the family Solieriaceae (*Gigartinales*, Rhodophyta): Novel, highly pyruvated carrageenans from the genus *Callophycus*. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 299, p. 229-243, 1997.

CHIOVITTI, A.; BACIC, A.; CRAIK, D.J.; KRAFT, G.T.; LIAO, M-L.; FALSHAW, R.; FURNEAUX, R.H. A pyruvated carrageenan from Australian specimens of the red alga *Sarconema filiforme*. **Carbohydr. Res.,** Amsterdam, v. 310, p. 77-83, 1998a.

CHIOVITTI, A.; BACIC, A.; CRAIK, D.J.; MUNRO, S.L.A.; KRAFT, G.T.; LIAO, M-L. Carrageenans with complex substitution patterns from red algae of the genus *Erythroclonium*. **Carbohydr. Res.**, Amsterdan, v. 305, p. 243-252, 1998b.

CHIOVITTI, A.; KRAFT, G.T.; BACIC, A.; CRAIK, D.J.; MUNRO, S.L.A.; LIAO, M.-L. Carrageenans from Australian representatives of the family Cystocloniaceae (Gigartinales, Rhodophyta), with description of *Calliblepharis celatospora* sp. nov. and transfer of *Austroclonium* to the family Areschougiaceae. **J. Phycol.**, v. 34, p. 515-535, 1998c.

CHIOVITTI A.; BACIC A.; KRAFT G.T.; CRAIK D.J.; LIAO M.-L. Pyruvated carrageenans from *Solieria robusta* and its adelphoparasite Tikvahiella Candida. **Hydrobiologia.**, v. 398/399, p. 401-409, 1999.

CHIOVITTI, A.; KRAFT, G.T.; BACIC, A.; CRAIK, D.J.; LIAO, M.-L. Chemistry, properties and phylogenetic implications of the methylated carrageenans from red

algae of the genus *Areschougia* (Areschougiaceae, Gigartinales, Rhodophyta). **J. Phycol.,** v. 37, p. 1127-1137, 2001.

CHIOVITTI, A.; BACIC, A.; CRAIK, D.J.; KRAFT, G.T.; LIAO, L.M. A nearly idealized 6'-O-methylated ι-carrageenan from Australian red alga *Claviclonium ovatum* (Acrotylaceae, Gigartinales). **Carbohydr. Res.,** Amsterdam, v. 339, p. 1459-1466, 2004.

CHOPIN, T.; HANISAK, M.D.; CRAIGIE, J.S. Carrageenans from *Kallymenia westii* (Rhodophyceae) with a review of the phycocolloids produced by Cryptonemiales. **Bot. Mar.,** Berlin, v. 37, p. 433-444, 1994.

CHOPIN, T.; KERIN, B.F.; MAZEROLLE, R. Phycocolloid chemistry as a taxonomic indicator of phylogeny in the Gigartinales, Rhodophyceae. **Phycol. Res.**, v. 47, no. 3, p. 167-188, 1999.

CHRASTIL, J. Improved colorimetric determination of amylose in starches or flours. **Carbohydr. Res.,** Amsterdam, v.159, p.154-158, 1987.

CIANCIA, M.; NOSEDA, M.D.; MATULEWICZ, M.C.; CEREZO, A.S. Alkali modification of carrageenans: mechanism and kinetics in the kappa/iota-, mu/nu-and lambda-series. **Carbohydr. Polym.,** Essex, v. 20, p. 95-98, 1993.

CIANCIA, M.; MATULEWICZ, M.C.; CEREZO, A.S. A L-galactose-containing carrageenan from *Gigartina skottsbergii*. **Phytochem.**, Oxford, v. 45, p. 1009-1013, 1997.

CIUCANU, I.; KEREK, F. A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. **Carbohydr. Res.,** Amsterdam, v. 131, p. 209-217,1984.

CLARK, A.H., GIDLEY, M.J., RICHARDSON, R.K., ROSS-MURPHY, S.B. Rheological studies of aqueous amylase gels: the effect of chain length and concentration on gel modulus. **Macromolecules.**, v. 22, p. 346-351, 1989.

CLARKE, M.T. **Rheological Additives.** In: Rheology Properties of Cosmetics and Toiletries. New York: Dennis Laba (Ed). p. 55-151, 1993.

CONTRERAS, R.R, KAMERLING, J.P., BREG, J., VLIEGENTHART, J.F.G. 1 H- and 13 C-NMR spectroscopy of synthetic monosulphated methyl α -D-galactopyranosides. **Carbohydr. Res.,** Amsterdam, v. 179, p. 411-418, 1988.

CRAIGIE, J.S., LEIGH, C. Carrageenans and agars. In: Hellbust, J.A., Craigie, J.S. **Handbook of Phycological Methods**: *Physiological and Biochemical Methods*; Eds.; Cambridge University Press, Cambridge. pp. 109-131, 1978.

CRAIGIE, J. **Cell walls.** In: Biology of the Red Algae. Cambridge University Press, pp.221-257, 1990.

DAMONTE, E.B.; MATULEWICZ, M.C.; CEREZO, A.S.; COTO, C.E. Herpes simplex virus-inhibitory sulfated xylogalactans from the red seaweed *Nothogenia fastigiata*. **Chemotherapy**, v. 42, p. 57-64, 1996.

DAMONTE, E.B.; MATULEWICZ, M.C.; CEREZO, A.S. Sulfated seaweed polysaccharides as antiviral agents. **Current Medicinal Chemistry**, v. 11, p. 2399-2419, 2004.

DE RUITER, G. A.; RUDOLPH, B. Carrageenan biotechnology. **Trends in Food Science & Techonol.**, Amsterdam, v. 8, p. 389-395, 1997.

DESLANDES, E.; POTIN, P.; ZINOUN, M., FLOCH, J.Y. Contribution on the content and nature of the phycocolloid from *Kallymenia reniformes* (Cryptonemiales, Rhodophyta), **Hydrobiol.**, Bucharest, v. 204, p. 603-608, 1990.

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

DOTY, M.S. Prodromus ad systematica Eucheumatoideorum: a tribe of commercial seaweeds related to *Eucheuma* (Solieriaceae, Gigartinales). In: Taxonomy of economic seaweeds with special reference to Pacific and Caribbean species. (Ed.) A. Abbott, p.159-207, 1988.

DOTY, M.S. *Betaphycus philippinensis* ge et sp. Nov. and related species (Solieriaceae, Gigartinales). In Abbott, I.A. (Ed.) Taxonomy of Economic Seaweeds with Reference of Some Pacific Species. California Sea Grant College Program, p. 237-245, 1995.

DOUBLIER, J.L.; CHOPLIN, L. A rheological description of amylase gelation. **Carbohydr. Res.,** v. 193, p. 215-226, 1989.

DOUBLIER, J.L.; LLAMAS, G.; CHOPLIN, L. Amylose gelation in low-concentration conditions. **Makromolekulare Chemie Macromolecular Symposia.**, v. 39, p. 171-177, 1990.

DUARTE, M.E.R.; NOSEDA, M.D; TULIO, S.; PUJOL, C.A.P.; DAMONTE, E.B. Inhibitory effect of sulfated galactans from the marine alga *Bostrychia montagnei* on herpes simplex virus replication in vitro. **Phytomedicine**, v. 8 (1), p. 53-58, 2001.

DUARTE, M.E.R.; NOSEDA, M.D.; CARDOSO, M.A.; TULIO, S.; CEREZO, A.S. The structure of a galactan sulfate from the red seaweed *Bostrychia montagnei*. **Carbohydr. Res.,** Amsterdam, v. 337, p. 1137-1144, 2002.

DUARTE, M.E.R.; CAUDURO, J.P.; NOSEDA, M.D.; GOLÇALVEZ, A.G.; PUJOL, C.A.; DAMONTE, E.B; CEREZO, A.S. The structure of the agaran sulfate from *Acanthophora spicifera* (Rhodomelaceae, Ceramiales) and its antiviral activity. Relation between structure and antiviral activity in agarans. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 339, p. 335-347, 2004.

DUBOIS, M.K.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Anal. Chem.**, v. 28, p. 350-356, 1956.

DUCKWORTH, M.; YAPHE, W. Definitive assay for pyruvic acid in agar and other algal polysaccharides. **Chem. Ind.**, v. 23, p. 747-748, 1970.

EHRESMANN, D.W.; DIEG, E.F.; HATCH, M.T.; DISALVO, L.H.; VEDROS, N.A. Antiviral substances from California marine algae. **J. Phycol.** v. 13, p. 37-40, 1977.

EIDAM, D., KULICKE, W.-M., KUHN, K., STUTE, R. Formation of maize starch gels selectively regulated by the addition of hydrocolloids. **Starch.,** v. 10, p. 378-384, 1995.

ERREA, M.I., MATULEWICZ, M.C. Unusual structures in the polysaccharides from the red seaweed *Pterocladiella capillacea* (Gelidiaceae, Gelidiales). **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 338, p. 943-953, 2003.

ESTEVEZ, J.M. Aspectos biológicos y químicos del alga roja *Gymnogongrus* torulosus (Hooker et Harvey) Schmitz (Phyllophoraceae, Rhodophyta).

Buenos Aires, 2003, 238f. Tese (Doutorado) – Departamento de Biodiversidade e Biologia Experimental, Universidade de Buenos Aires.

ESTEVEZ, J.M.; CIANCIA, M.; CEREZO, A.S. The system of low-molecular-weight carrageenans and agaroids from the room-temperature-extracted fraction of *Kappaphycus alvarezii*. **Carbohydr. Res.,** Amsterdam, v. 325, p. 287-299, 2000.

ESTEVEZ, J.M.; CIANCIA, M.; CEREZO, A.S. DL-Galactan hybrids and agarans from gametophytes of the red seaweed *Gymnogongrus torulosus*. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 331, p. 27-41, 2001.

ESTEVEZ, J.M.; CIANCIA, M.; CEREZO, A.S. The system of galactans of the red seaweed *Kappaphycus alvarezii*, with emphasis on its minor constituents. **Carbohydr. Res.,** Amsterdam, v. 339, p. 2575-2592, 2004.

FALSHAW, R.; FURNEAUX, R.H. Carrageenan from the tetrasporic stage of *Gigartina decipiens* (Gigartinaceae, Rhodophyta). **Carbohydr. Res.,** Amsterdam, v. 252, p. 171-182, 1994.

FALSHAW, R.; FURNEAUX, R.H.; STEVENSON, D.E. Agars from nine of the red seaweeds in the genus *Curdiea* (Gracilariaceae, Rhodophyta) **Carbohydr. Res.,** Amsterdam, v. 308, p. 107-115, 1998.

FAO: Food And Agriculture Organization Of The United Nations. Disponível em: http://www.fao.org, acessado outubro, 2005.

FARIA, P.C.S. Estrutura química das carragenanas e agaranas sintetizadas pela alga vermelha *Gymnogongrus griffithsiae*. Dissertação de Mestrado. Departamento de Bioquímica da UFPR, 85 p. 2002.

FARIAS, W.R.; VALENTE, A.P.; PEREIRA, M.S.; MOURÃO, P.A.S. Structure and anticoagulant activity of sulfated galactans. **J. Biol. Chem.,** Bethesda, v. 275, p. 29299-29307, 2000.

FERNÁNDEZ, L.E; VALIENTE, O.G.; MAINARDI, V.; BELLO, J.L. Isolation and characterization of an antitumor active agar-type polysaccharide of *Gracilaria dominguensis*. **Carbohydr. Res.,** Amsterdam, v. 190, p. 77-83, 1989.

FIGUEIREDO, L.T.M. The Brazilian flaviviruses. **Microbes Infect.**, v. 2. p. 1643-1649, 2000.

FREDERICQ, S.; HOMMERSAND, M.H. Proposal of Gracilariales ord. nov. (Rhodophyta) based on an analysis of the reproductive development of *Gracilaria verrucosa*. **J. Phycol.**, v. 25, p. 213-227, 1989.

FREDERICQ, S.; HOMMERSAND, M.H.; FRESHWATER, D.W. The molecular systematics of some agar-and-carrageenan containing marine red algae based on *rbc*L sequence analysis. **Hydrobiologia.**, v. 326/327, p.125-135, 1996.

FREDERICQ, S.; FRESHWATER, D.W.; HOMMERSAND, M.H.Observations on the phylogenetic systematics and biogeography of the Solieriaceae (Rhodophyta, Gigartinales) inferred from *rbc*L sequences and morphological evidence. **Hydrobiologia.**, v.389/399, p. 25-38, 1999.

FREDERICQ, S.; LOPEZ-BATISTA, J.M. Characterization and phylogenetic position of the red alga *Besa papillaeformis* Setchell: An example of progenetic heterochrony. **Constancea.**, v. 83, p.1-12, 2003.

FREITAS, R. A.; GORIN, P. A. J.; NEVES, J.; SIERAKOWSKI, M.-R. A rheological description of mixtures of a galactoxyluglucan with high amylose and waxy corn starches. **Carbohydr. Polymers.**, Essex, v. 51, p. 25-32, 2003.

FREITAS, R.A.; PAULA, R.C.; FEITOSA, J.P.A.; ROCHA, S.; SIERAKOWSKI, M-R. Amylose contents, rheological properties and gelatinization kinetics of yam (Dioscorea alata) and cassava (Manihot utilissima) starches. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 55, p. 3-8, 2004.

FRESHWATER, D.W., FREDERICQ, S., BUTLER, B.S., HOMMERSAND, M.H., CHASE, M.W. A gene phylogeny of the red algae (Rhodophyta) based on plastid *rbc*L. **Proc. Nalt. Acad. Sci.,** (USA), v. 91, p. 7281-7285, 1994.

FREYZI, E.; TRYBALA, E.; BERGSTRÖM, T.; LINDAHL, U.; SPILLMANN, D. Structural requirement of heparan sulfate for interaction with herpes simplex virus type 1 virions and isolated glycoprotein C. **J. Biol. Chem.**, v. 272, p. 24850-24857, 1997.

FURMAN, P.A.; McGUIRT, P.V.; KELLER, P.M.; FYFE, J.A.; ELION, G.B. Inhibition by acyclovir of cell growth and DNA synthesis of cells biochemically transformed with herpesvirus genetic information. **Virology**, v. 102, p. 420-430, 1980.

FURNEAUX, R.H.; MILLER, I.J. Isolation and ¹³C-NMR spectral study of the water soluble polysaccharides from four South African red algae. **Bot. Mar.**, v. 29, p. 3-10, 1986.

FURNEAUX, R.H.; MILLER, I.J.; STEVENSON, T.T. Agaroids from New Zealand members of the Gracilariaceae (Gracilariales, Rhodophyta) – a novel dimethylated agar. **Hydrobiol.**, Bucharest, v. 204/205, p. 645-654, 1990.

FURNEAUX, R.H.; STEVENSON, T.T. The xylogalactan from *Chondria macrocarpa* (Ceramiales, Rhodophyta). **Hydrobiol.**, Bucharest, v. 204/205, p. 615-620, 1990.

FURNEAUX, R.H.; MILLER, I.J. Water soluble polysaccharides from the New Zealand red algae in the family Phyllophoraceae. **Bot.Mar.**, Berlin, v. 28, p. 419-425, 1985.

GERBER, P.; DUTCHER, J.D.; ADAMS, E.V.; SHERMAN, J.H. Protective effect of seaweed extracts for chicken embryos infected with influenza B or mumps. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.** v. 99, p. 590-593, 1958.

GLICKSMAN M. Utilization of seaweed hydrocolloids in the food industry. **Hydrobiologia.**, v. 151/152, p. 31-47, 1987.

GOULARD, F.; DIOURIS, M.; DESLANDES, E.; FLOC'H, J.Y. Nucleotides, nucleoside sugars and UDP-glucose-4-epimerase acitivity in the iota carrageenophytes *Solieria chordalis* and *Calliblepharis jubata* (Rhodophyceae). **Eur. J. Phycol.,** v. 34, p. 21-25, 1999.

GUBLER, D.J. Dengue and dengue hemorrhagic fever. **Clinical Microbiology Reviews.**, v. 11, p. 480-496, 1998.

GUILBOT, A; MERCIER, C. **Starch.** In: The polyssaccharides. V. 3, ASPINALL, G.O. (Ed.) London: Acadmic Press, 1985, p. 210-283, 1985.

GUIRY, M.D.; GARBARY, G.J. A preliminary phylogenetic analysis of the Phyllophoraceae, Gigartinaceae and Petrocelidaceae (Rhodophyta) in the North Atlantic and North Pacific. In: **Evolutionary Biogeography of the Marine Algae of the North Atlantic**. Springer-Verlag, Berlin, p. 265-290, 1990.

GUISELEY, K.B.; STANLEY, N.F.; WHITEHOUSE, P.A. **Carrageenan**. In: Handbook of water-soluble gums, R.L. Davidson (Ed.). New York, McGraw-Hill Book Co., p. 5-30, 1980.

HAN, X.-Z.; CAMPANELLA, O.H.; GUAN, H.; KEELING, P.L.; HAMAKER, B.R. Influence of maize starch granule-associated protein on the rheological properties of starch pastes. **Carbohydr. Polymers.,** Essex, v. 49, p. 323-330, 2002.

HARTREE, E. F. Determination of protein: a modification of the Lowry method to give a linear photometric response. **Analytical Biochemistry**, v. 48, p. 422-427,1972.

HASLIN, C.; LAHAYE, M.; PELLEGRINI, M.; CHERMANN, J-C. *In vitro* anti-HIV activity of sulfated cell-wall polysaccharides from gametic, carposporic and tetrasporic stages of the mediterranean red alga *Asparagopsis armata*, **Planta Med.**, v. 67, p. 301-305, 2001.

HEINZ, F.X.; ALISSON, S.L. The machinery for flavivirus fusion with host cell membranes. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 4, p. 450-455, 2001.

HENCHAL, E.A.; PUTNAK, J.R. The dengue viruses. **Clin. Microbiol. Rev.,** v. 3, p. 376-396, 1990.

HERMANSSON, A.-M.; ERIKSSON, E.; JORDANSSON, E. Effects of potassium, sodium and calcium on the microstructure and rheological behaviour of κ -carrageenan gels. **Carbohydr. Polymers.**, Essex, v. 16, p. 297-320, 1991.

HEROLD, B.C.; WuDRUM, D.; SOLTYS, N.; SPEARS, P.G. Glycoprotein C of herpes simplex virus type I plays a principal role in the adsorption of virus to cells and in infectivity. **J. Virol.**, v. 65, p. 1090-1098, 1991.

HEROLD, B.C.; VISALLI, R.; SUSMARSKI, N.; BRANDT, C.R.; SPEAR, P.G. Glycoprotein C-independent binding of herpes simplex virus to cells requires cell

surface heparin sulphate and glycoprotein B. **J. Gen. Virol.,** v. 75, p. 1111-1122, 1994.

HIRASE, S.; WATANABE, K.; TAKANO, R.; TAMURA, J. Structural features of sulfated polysaccharide isolated from the red seaweed *Laurencia undulata*. International Carbohydrate Symposium, 11., Vancouver, 1982. **Abstracts**. Vancouver, 1982, p.III-12.

HOLDSWORTH, S. D. Applicability of rheological models to the interpretation of flow and processing behaviour of fluid food products. *Journal of Texture Studies*, v.2, n.4, p.393-418, 1971.

HOLMES, E.C., BURCH, S.S. The causes and consequences of genetic variation in dengue virus. **Trends Microbiol.**, v. 8, p.74-76, 2000.

HOMMERSAND, M.H.; FREDERICQ, S. **Sexual reproduction and cystocarp development**. In: Biology of the red Algae. (Ed.) Cambridge University Press, Cambrigde, England, pp. 305-346, 1990.

HOOVER, R.; VASANTHAN, T. Effect of heat-moisture treatment on the structure and physicochemical of cereal, legume, and tuber starches. **Carbohydr. Res.**, v. 252, p. 22-53, 1994.

IBARZ, A., GONÇALVES, C., EXPLUGAS, S. Rheology of clarified passion fruit juices. Fruit Processing, v.6, n.8, p. 330-333, 1996.

KAPRAUM, D.F.; DUTCHER, J.A.; BIRD, K.T.; CAPECCHI, M.F. Nuclear genome characterization and carrageenan analysis of *Gymnogongrus griffithsiae* (Rhodophyta) from North Carolina. **J. Applied Phycol.** v.5, 99-107, 1993.

KARSTEN, U.; BARROW, K.D.; KING, R.J. Floridoside, L-isofloridoside and D-isofloridoside in the red algae *Porphyra columbina* – Seasonal and osmotic effects. **Plant Physiol.**, Rockville, v. 103, p. 185-191, 1993.

KLOAREG, B.; QUATRANO, R.S. Structure of the cell walls of marine algae and ecophysiological functions of matrix polysaccharides. **Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev.,** Winchester, v. 26, p. 259-315, 1988.

KNUTSEN, S.H.; MYSLABODSKY, D.E.; LARSEN, B.; USOV, A.I. A modified system of nomenclature for red algal galactans. **Bot. Mar.,** Berlin, v. 37, p. 163-169, 1994.

KOCHETKOV, N.; USOV, A.I.; MIROSHNIKOVA, L.I.; CHIZHOV, O.S. Polysaccharides of algae. Partial hydrolysis of polysaccharide from *Laingia pacifica* Yamada. **Zh. Obshch. Khim.,** Moscow, v. 43, p. 1832-1839, 1973.

KOLENDER, A.A., MATULEWICZ, M.C. Structural analysis of antiviral sulfated α -D-(1 \rightarrow 3)-linked mannans. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 273, p. 179-185, 1995.

KOLENDER, A.A., MATULEWICZ, M.C. Sulfated polysaccharides from the red seaweed *Georgiella confluens*. **Carbohydr. Res.**; Amsterdam, v. 337, p. 57-68, 2002.

LAHAYE, M.; YAPHE, W.; ROCHAS, C. ¹³C-NMR-spectra analysis of sulfated and desulfated polysaccharides of the agar type. **Carbohydr. Res.**; Amsterdam, v.143, p. 240-245, 1985.

LAHAYE, M.; YAPHE, W.; VIET, M.T.P.; ROCHAS, C. ¹³C-NMR spectroscopic investigation of methylated and charged agarose oligosaccharides and polysaccharides. **Carbohydr. Res.,** Amsterdam, v. 190, p. 249-265, 1989.

LAHAYE, M.; ROCHAS, C. Chemical structure and physico-chemical properties of agar. **Hydrobiologia.**, v. 221, 137-148, 1991.

LAHAYE, M. Developments on gelling algal galactans, their structure and physicochemistry. **J. Appli. Phycol..,** v. 13, p. 173-184, 2001.

LAI, V.M-F, HUANG, A.-L.; LII, C-Y. Rheological properties and phase transition of red algal polysaccharide-starch composites. **Food Hydrocol.**, Oxford., v.13, p. 409-418, 1999.

LAPASIN, R.; PRICL, S. **Rheology.** In: Rheology of industrial polysaccharides: Theory and Applications. London: Blackie Academic & Professional, p. 164-249, 1995a.

LAPASIN, R.; PRICL, S. **Rheology of polysaccharide systems.** In: Rheology of Industrial Polysaccharides: Theory and Applications. London: Blackie Academic & Professional, p. 251-293, 1995b.

LIAO, M.L.; KRAFT, G.T.; MUNRO, S.L.A. CRAIK, D.J.; BACIC, A. Beta/kappa-carrageenans as evidence for continued separation of the families Dicranemataceae and Sarcadiaceae (Gigartinales, Rhodophyta). **J. Phycol.,** v. 29, p. 833-844, 1993.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, K.L. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.,** Bethesda, v. 193, p. 265, 1951.

LYCKE, E.M.; JOHANSSON, B.; SVENNERHOLM, B.; LINDAHL, U. Binding of herpes simplex virus to cellular heparan sulphate, an initial step in the adsorption process. **J. Gen. Virol.**, v. 72, p. 1131-1137, 1991.

MACPHERSON A.E.; JANE, J. Comparison of waxy potato with other root and tuber starches. **Carbohydr. Polymers**, v. 40, p. 57-70, 1999.

MAGGS, C.A.; PUESCHEL, C.M. Morphology and development of *Ahnfeltia plicata* (Rhodophyta): proposal of the Ahnfeltiales ord. nov. **J. Phycol.**, v. 5, p. 333-351, 1989.

MALI, S.; KARAM, L.B.; RAMOS, L.P.; GROSSMANN, M.V. Relationships among the composition and physicochemical properties of starches with the characteristics of their films. **J. Agric. Food Chem.**, v. 25, p. 7720-7725, 2004.

MARCHANT, J.L; BLANSHARD, J..M.V. Studies of the dynamics of the gelatinization of starch granules employing a small angle light scattering system. **Starch,** v. 30, p. 257-264, 1978.

MARCOTTE, M. HOSHAHILI, A.R.T.; RAMASWAMY, H.S. Rheological properties of selected hydrocolloids as a function of concentration and temperature. **Food Res. International.**, v. 34, p. 695-703, 2001.

MARTIN, S.; FREITAS, R.A.; OBAYASHI, E.; SIERAKOWSKI, M.-R. Physicochemical aspects of galactoxyloglucan from the seeds of *Hymenaea courbaril* and its tetraborate complex. **Carbohydr. Polymers.**, Essex, v. 54, p. 287-295, 2003.

MASUDA, M.; KOGAME, K.; GUIRY, M.D. Life history of *Gymnogongrus griffithsiae* (Phyllophoraceae, Gigartinales) from Ireland: implications for life history interpretation in the Rhodophyta. **Phycology.,** v.35, p. 421-434, 1996.

MASUDA, M.; KOGAME, K. *Ahnfeltiopsis triquetifolia* sp. nov. (Gigartinales, Rhodophyta) from Japan. **Eur. J. Phycol.**, v. 33, p. 139-147, 1998.

MAZUMDER, S.; GHOSAL, P.K.; PUJOL.; C.A.; CARLUCCI, M.L.; DAMONTE, E.B.; RAY, B. Isolation, chemical investigation and antiviral activity of polysaccharides from *Gracilaria corticata* (Gracilariaceae, Rhodophyta). **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 31, p. 87-95, 2002.

McBRIDE, W.J.H.; BIELEFELDT-OHMANN, H. Dengue viral infections:pathogenesis and epidemiology. **Microbes Infect.,** v. 2, p. 1041-1050, 2000.

McCANDLESS, E.L.; CRAIGIE, J.S.; WALTER, J.A. Carrageenans in the gametophytic and sporophytic stages of *Chondrus crispus*. **Planta.**, Berlin, v.112, p.201-212, 1973.

McCANDLESS, E.L.; WEST, J.A.; GUIRY, M.D. Carrageenan patterns in Phyllophoraceae. **Biochem. Syst. Ecol.**, Oxon, v. 10, p. 275-284, 1982.

McCANDLESS, E.L.; WEST, J.A.; GUIRY, M.D. Carrageenan patterns in the Gigartinaceae. **Biochem. Syst. Ecol.**, v. 11, p. 175-182, 1983.

MCCLEMENTS, J. Food Biopolymers and Colloids Research Laboratory. University of Massachusetss Amherst. Disponível em http://www.unix.oit.umass.edu/~mcclemen/581Rheology.html. Acessoem: 10/12/2005.

MEUNIER, V.; NICOLAI, T.; DURAND, D.; PARKER, A. Light scattering and viscoelasticity of aggregation and gelling κ -carrageenan. **Macromolecules.**, v. 23, p. 2610-2616, 1999.

MICHEL, A-S.; MESTDAGH, M.M.; AXELOS, M.A.V. Physico-chemical properties of carrageenan gels in the presence of various cations. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 21, p. 195-200, 1997.

MILLER, I.J.; FURNEAUX, R.H. A structural analysis of the polysaccharide from *Kallymenia berggrenii* J. Ag. **Bot. Mar.,** Berlin, v. 39, p. 141-147, 1996.

MILLER, I.J.; FALSHAW, R.; FURNEAUX, R.H. A polysaccharide fraction from red seaweed *Champia novae-zelandiae* Rhodymeniales, Rhodophyta. **Hydrobiol.**, Bucharest, v. 326/327, p. 505-509, 1996.

MILLER, I.J. The chemotaxonomic significance of the water soluble red algal polysaccharides. **Recent Res. Develop. Phytochem.**, v. 1, p. 531-565, 1997.

MILLER, I.J. The structure of pyruvylated carrageenan extracted from *Stenogramme interrupta* as determined by ¹³C NMR spectroscopy. **Bot. Mar.,** Berlin, v. 41, p. 305-315, 1998.

MILLER, I.J.; BLUNT, J.W. New ¹³C NMR methods for determining the structure of algal polysaccharides. Part 3. The structure of the polysaccharide from *Cladhymenia oblongifolia*. **Bot. Mar.,** Berlin, v. 43, p. 263-271, 2000.

MILLER, I.J. Evaluation of the structure of the polysaccharide from *Myriogramme denticulata* as determined by ¹³C NMR spectroscopiy. **Bot. Mar.,** Berlin, v. 44, p. 253-259, 2001.

MILLER, I.J. Taxonomic implications of the chemical structures of galactans from two species of the genus Trematocarpus. **Bot. Mar.,** Berlin, v. 45, p. 432-437, 2002.

MILLER, I.J. The chemical structure of galactans from *Sarcodia montagneana* and from *Sarcodia flabellate*. **Bot. Mar.,** Berlin, v. 46, p.392-399, 2003.

Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pecas - Decreto-Lei n.º 38/2000 de 14/03/2000.

MOIRANO AL. **Sulfated seaweed polysaccharides**. In: Food Colloids, (Ed.) Graham, p. 347–381, 1977.

MUNHOZ, M.P., WEBER, F. H., CHANG, Y. K. Influência de hidrocolóides na textura de gel de amido de milho, **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v..24, p. 403-406, 2004.

NAÉ, H.N. **Introduction of rheology**. In: Rheological Properties of cosmetics and toiletries. LABA, D. (Ed.) New York: Rheoux Inc. p. 9-33, 1993.

NAGASAWA, K.; INOUE, Y.; TOKUYASU, T. An improved method for the preparation of the chondroitin by solvolytic desulfation of chondroitin sulfates. **J. Biol. Chem.,** Bethesda, v. 86, p. 1323-1327, 1979.

NAKASHIMA, H.; KIDO, Y.; KOBAYASHI, N.; MOTOKI, Y.; NEUSHUL, M. YAMAMOTO, N. Antiretroviral activity in a marine red alga; reverse transcriptase inhibition by an aqueous extract of *Schizymenia pacifera*. **J. Cancer Res. Clin. Oncol.** v. 113, p. 413-416, 1987a.

NAKASHIMA, H.; KIDO, Y.; KOBAYASHI, N.; MOTOKI, Y.; NEUSHUL, M. YAMAMOTO, N. Purification and characterization of an avian myeloblastosis and human immunodeficiency virus reverse transcriptase inhibitor, sulfated polysaccharides extracted from sea algae. **Antimicrob. Agents Chemother.** v. 31, p. 1524-1528, 1987b.

NEWROTH, P.R. Studies on the life histories in the Phyllophoraceae. I. *Phyllophora truncata* (Rhodophyceae, Gigartinales). **Phycologia.**, v.10, p.345-354, 1971.

NILSSON, S., PICULLEL, L.; JONSSON, B. Helix-coil transitions of ionic polysaccharides analyzed within the Poisson-Boltzmann cell model. 1. Effects of polyion concentration and counterion valency. **Macromolecules**, v. 22, p.2367-2375, 1989.

NOSEDA, M.D. Polissacarídeos sulfatados isolados da fase tetraesporofítica de *Gigartina skottsbergii* (Rhodophyta, Gigartinales). Tese de doutorado. Departamento de Bioquímica da UFPR, 180 pp., 1994.

NOSEDA, M.D.; CEREZO, A.S. Alkali modification of carrageenans-II. The cyclization of model compounds containing non-sulfated β-D-galactose units. **Carbohydr. Polym.,** Essex, v. 26, p.1-3, 1995.

NUNN, J.R.; PAROLIS, H.; RUSSEL, I. Sulphated polysaccharides of the Solieriaceae family. Part I. A polysaccharide from *Anatheca dentata*. **Carbohydr**. **Res.**, Amsterdan, v. 20, p. 205-215, 1971.

NUNN, J.R.; PAROLIS, H.; RUSSEL, I. Sulphated polysaccharides of the Solieriaceae family. Part II. The acidic components of the polysaccharide from red alga *Anatheca dentata*. **Carbohydr. Res.,** Amsterdam, v. 29, p. 281-289, 1973.

NUNN, J.R.; PAROLIS, H.; RUSSEL, I The dessulphated polysaccharide of *Anatheca dentata*. **Carbohydr. Res.,** Amsterdam, v. 95, p. 219-226, 1981.

O'BRIEN, J.J.; CAMPOLI-RICHARDS, D.M. Acyclovir. An updated review of its antiviral activity, pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy. **Drugs.**, v. 3, p. 233-309, 1989.

ONO, L.; WOLLINGER, W.; ROCCO, I.R.; COIMBRA, T.L.M.; GORIN, P.A.J.; SIERAKOWSKI, M.-R. In vitro and in vivo antiviral properties of sulfated

galactomannans against yellow fever vírus (BeH111 strain) and dengue 1 virus (Hawaii strain). **Antiviral Research.,** v. 60, p. 201-208, 2003.

PAINTER, T.J. Algal Polysaccharides. In: ASPINALL, G. O. **The polysaccharides**, v. 2, p. 195-285, 1983.

PARKER, A.; BRIGAND, G.; MINIOU, C.; TRESPOEY, A.; VALLÉE P. Rheology and fracture of mixed ι- and κ-carrageenan gels: Two-step gelation. **Carbohydr. Polymers.**, Essex, v. 20, p. 253-262, 1993.

PAULA, J. E.; PEREIRA, R.T.L.; OHNO, M. Growth rate of the carrageenophyte *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Gigartinales) introduced in subtropical waters of São Paulo State, Brazil. **Phycological Research.**, v. 50, p.1-9, 2002.

PENMAN, A.; REES, D.A. Carrageenans. Part IX. Methylation analysis of galactan sulphates from *Furcellaria fastigata*, *Gigartina caniculata*, *G. chamissoi*, *Pachymenia hymantophor*a, and *Gloiopeltis cervicornis*. Structure of ξ-carrageenan. **J. Chem. Soc., Perkin Trans.,** v. 1, p. 2182-2187, 1973.

PERCIVAL, E.; McDOWELL, R.H. Chemistry and enzymology of marine algal polysaccharides. Academic Press Inc., London. p. 73-98, 127-156, 1967.

PEREIRA, M.S.; MELO, F.R.; MOURÃO, P.A.S. Is there a correlation between structure and anticoagulant action of sulfated galactans and sulfated fucans? **Glycobiology**, v.12, p. 573 – 580, 2002.

PICULLEL, L.; HAKANSSON, C.; NILSSON, S. Cation specificity of the order-disorder transition in iota-carrageenan: effects of kappa-carrageenan impurities. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 9, p. 297-301, 1987.

PICULELL, L.; NILSSON, S.; MUHRBECK, P. Effects of small amounts of kappa-carragenan on the rheology of aqueous iota-carragesnan. **Carbohydr. Polymers.**, Essex, v. 18, p. 199, 1992.

PICULELL L. **Gelling carrageenans**. In: Food Polysaccharides and their Applications. (Ed.) New York, Marcel Dekker, p, 205-244, 1995.

PICULELL, L.; BORGSTROM, J.; CHRONAKIS, I.S.; QUIST, P.-O.; VIEBKE, C. Organization and association of κ-carrageenan helices under different salt conditions. **Inter. J. Biol. Macromol.**, v. 21, p. 141-153, 1997.

POLNOK, A., VERHOEF, J. C., BORCHARD, G., SARISUTA, N., & JUNGINGER, H. E. In vitro evalution of intestinal absorption of desmopressin using drug-delivery systems based on superporous hydrogels. International. **Journal of Pharmaceutics**, v. 269, p. 303–310, 2004.

PUJOL, C.A.; ERREA, M.I.; MATULEWICZ, M.C.; DAMONTE, E.B. Antiherpetic activity of S1, an algal derived sulphated galactan. **Phytother. Res.,** v. 10, p. 410-413, 1996.

PUJOL, C.A.; ESTEVEZ, J.M.; CIANCIA, M.; CEREZO, A.S.; DAMONTE, E. Novel DL-galactan hybrids from the red seaweed *Gymnogongrus torulosus*, potent inhibitors of herpes simplex virus and dengue virus. **Antiviral Chem. Chemotherapy.**, v. 13, p. 83-89, 2002.

RAO, M. A., & RIZVI, S. S. Engineering properties of foods, New York, Marcel Dekker, 1986.

RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E. **Biology of Plants.** New York. 6^a edition, pp. 906, 2001.

REES, D.A. Enzimatic desulphation of porphyran. **Biochem. J.,** v. 80, p. 449-453, 1961a.

REES, D.A. Enzimatic synthesis of 3,6-anhydrogalactose within porphyran from L-galactose 6-sulphate units. **Biochem. J.**, v. 81, p. 347-352, 1961b.

REES, D.A. Structure, conformation, and mechanism in the formation of polysaccharide gels and networks. **Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.**, v. 24, p. 267-332, 1969.

REES, D.A. Polysaccharides Shapes. Eds. Chapman & Hall Ltd., London, p. 1-80, 1977.

REES, D.A.; WILLIAMSON, F.B.; FRANGOU, S.A.; MORRIS, E.R. Fragmentation and modification of 1-carrageenan and characterization of the polysaccharide order-disorder transition in solutions. **Eur. J. of Biochem.**, v. 122, p. 71-79, 1982

RENN, D. Biotechnology and the red seaweed polysaccharide industry: status, needs and prospects. **Trends Biotechnol.**, Limerick, v. 15, p. 9-14, 1997.

RHA, C. Rheology of fluid food. Food technology. v.32, 77-82p., 1978.

RICHARDS, J.T.; KERN, E.R.; GLASGOW, L.A.; OVERALL, J.C.Jr.; DEIG, E.F.; HATCH, M. T. Antiviral activity of extracts from marine algae. **Antimicrob. Agents Chemother.** v. 14, p. 24-30, 1978.

ROCHAS, C.; RINAUDO, M. Activity coefficient of counterions and conformation in κ-carrageenan system. **Biopolymers.**, v. 19, p. 1675-1687, 1980.

ROCHAS, C.; RINAUDO, M. Mechanism of gel formation in κ -carrageenan. **Biopolymers.**, v. 23, p. 735-745, 1984.

ROIZMAN, B.; SEARS, A. Herpes simplex virus and their replication. In: B. Roizman, R. Whitley and C. Lopez (Ed). The human herpesviruses. Raven Press, Ltd., New York, 1993.

SAITO, R.M.; OLIVEIRA, E.C. Chemical screening of Brazillian marine algae producing carrageenans. **Hydrobiol.**, Bucharest, v. 204/205, p. 585-588, 1990.

SATORU, K.; TANIGAWA, N.; NAKAGAWA, H.; SOEDA, S.; SHIMENO, H. Oversulfation of fucoidan enhances its anti-angiogenic and antitumor activities. **Biochem. Pharm.**, v. 65, p. 173-179, 2003.

SAUNDERS, G.W.; KRAFT, G.T. Small-subunit rRNA gene sequences from representatives of selected families of the Gigartinales and Rhodymeniales (Rhodophyta). 2. Recognition of the Halymeniales ord. nov. **Can. J. Bot.**, Ottawa, v. 74, p. 694-707, 1996.

SCHOCH, T.J. Fractionation of starch. **Adv. Carbohydr. Chem.** v.1, p.247-277, 1945.

SEN, S.A.K; DAS, A. K.; SARKAR, K. K.; SIDDHANTA A. K; TAKANO, R.; KAMA, K.; HANA, R. An agaroid-carrageenan hybrid type backbone structure for the antithrombotic sulfated polysaccharide from *Grateloupia indica* Boergensen (Halymeniales, Rhodophyta). **Bot. Mar.,** Berlin, v. 45, p. 331-338, 2002.

SCHARAMM, G. A pratical approach to rheology and rheometry. 2nd edition, Karlsruhe, Germany, 2000.

SHI, X.; BeMILLER, J.N. Effects of food gums on viscosities of starch suspensions during pasting. **Carbohydr. Polymers.,** Essex, v. 50, p. 7-18, 2002.

SHIEH, M.T.; WUDUNN, D.; MONTGOMERY, R.I.; ESKO, J.D.; SPEAR, P.G. Cell surface receptors for herpes simplex virus are heparan sulfate proteoglycans. **J. Cell Biol.**, v. 116, p. 1273-1281, 1992.

SILVA, P.C.; De CREW. *Ahnfeltiopsis*, a new genus in the Phyllophoraceae (Gigartinales, Rhodophyceae). **Phycologia.**, v. 31, p. 576-580, 1992.

SLONEKER, J.H. Gas-liquid chromatography of alditol acetates. **Methods Carbohydr. Chem.**, San Diego, v. 6, p. 20-24, 1972.

SMITH, D.B.; COOK, W.H. Fractionation of carrageenin. **Arch. Biochem. Biophys.,** v. 45, p. 232-233, 1953.

SMITH, J.L. Plant constituents interfering with the Lowry method of protein determination. **Proc. Okla. Acad. Sci.**, v. 62, p. 80-83, 1982.

STANCIOFF; D.J.; STANLEY, N.F. Infrared and chemical studies on algal polysaccharides. Proc. Int. Seaweed Symp., 6, p. 595-609, 1969.

STANLEY, N. Production, properties and uses of carrageenan. In: Fisheries Technical Paper, v. 288 pp. 116-146, 1987.

STEVENSON, T.; FURNEAUX, R. Chemical methods for the analysis of sulphated galactans from red algae. **Carbohydr. Res.,** Amsterdam, v. 210, p. 277-298, 1991.

STORTZ, C.A.; CEREZO, A.S. The λ -components of the "intermediate" fractions of the carrageenan from *Iridaea undulosa*. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 172, p. 139-146, 1988.

STORTZ, C.A.; CEREZO, A.S. The systems of carrageenans from cystocarpic and tetrasporic stages from *Iridae undulosa*: fractionation with potassium chloride and

methylation analysis of the fractions. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 242, p. 217-227, 1993.

STORTZ, C. A.; BACON, C. F.; CHERNIAK, R.; CEREZO, A S.. High field NMR spectroscopy of cystocarpic and tetrasporic carrageenans from *Iridaea undulosa*. **Carbohydr. Res.,** Amsterdan, v. 261, p. 317-326, 1994.

STORTZ, C.A.; CASES, M.R.; CEREZO, A.S. The system of agaroids and carrageenans from the soluble fraction of the tetrasporic stage of the red seaweed *Iridaea undulosa.* **Carbohydr. Res.,** Amsterdam, v. 34, p. 61-65, 1997.

STORTZ, C.A.; CEREZO, A.S. Novel findings in carrageenans, agaroids and "hybrid" red seaweed galactans. **Curr. Topics Phytochem.**, v. 4, p. 121-134, 2000.

TAKANO, R.; HAYASHI, K.; HARA, S.; HIRASE, S. Funoran from the red seaweed, *Gloiopeltis complanata*: polysaccharides with sulphated agarose structure and their precursor structure. **Carbohydr. Polym.**, Essex, v. 27, p. 305-311, 1995.

TAKANO, R.; HAYASHI, K.; HARA, S.; HIRASE, S. Funoran from red seaweed, *Gloiopeltis complanata*: polysaccharides with sulphated agarose structure and their precursor structure. **Carbohydr. Polym.,** Essex, v. 35, p. 81-87, 1998.

TAKANO, R.; YOKOI, T.; KAMEI, K.; HARA, S.; HIRASE, S. Coexistence of agaroid and carrageenan structures in a polysaccharide from the red seaweed *Rhodomela larix* (Turner) C. Ag. **Bot. Mar.,** Berlin, v. 42, p. 183-188,1999.

TAKANO, R.; SHIOMOTO, K.; KAMEI, K.; HARA, S.; HIRASE, S. Occurrence of carrageenan structure in an agar from the red seaweed *Digenea simplex* (Wulfen) C. Agardh (Rhodomelaceae, Ceramiales) with a short review of carrageenan-

agarocolloid hybrids in the Florideophycidae. **Bot. Mar.,** Berlin, v. 46, p. 142-150, 2003.

TALARICO, L.B.; ZIBETTI, R.G.M.; FARIA, P.C.S.; SCOLARO, L.A.; DUARTE, M.E.R.; NOSEDA, M.D.; PUJOL, C.A.; DAMONTE, E.B. Anti-herpes simplex virus activity of sulfated galactanas from the red seaweeds *Gymnogongrus griffithsiae* and *Cryptonemia crenulata*. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 34, 2004.

TALARICO L.B.; PUJOL, C.A.; ZIBETTI, R.G.M.; FARIA, P.C.S.; NOSEDA, M.D.; DUARTE, M.E.R.; DAMONTE, E.B. The antiviral activity of sulfated polysaccharides against dengue virus is dependent on virus serotype and host cell. **Antiv. Res.,** v. 66, p. 103-110, 2005.

TECANTE, A.; DOUBLIER, J.L. Steady flow and viscoelastic behavior of crosslinked waxy corn starch kappa-carrageenan pastes and gels. **Carbohydr. Polymers.**, Essex, v. 40, p. 221-231, 1999.

TECANTE A.; DOUBLIER, J.L. Rheological investigation of the interaction between amylase and κ -carrageenan. **Carbohydr. Polymers.**, Essex, v. 49, p. 177-183, 2002.

TESTER, R.F.; SOMMERVILLE, M.D. The effects of non-starch polysaccharides on the extent of gelatinization, swelling and α -amylase hydrolysis of maize and wheat starches. **Food Hydrocol.**, Oxford., v. 17, p. 41-54, 2003.

TYE, R.J. The rheology of starch/carrageenan systems. **Food Hydrocol.**, Oxford., v. 4, p. 259-266, 1988.

USOV, A.I.; ELASHVILI, Y.A. Polysaccharides of Algae: 44. Investigation of sulfated galactan from *Laurencia nipponica* Yamada (Rhodophyta,

Rhodomelaceae) Using Partial Reductive Hydrolysis. **Bot. Mar.,** Berlin, v.34, p. 553-560, 1991.

USOV, A.I.; YAROTSKII, S.V.; SHASHKOV, A.S. ¹³C-NMR spectroscopy of red algal galactans. **Biopolymers,** New York, v. 19, p. 977, 1980.

USOV, A.I.; SHASHKOV, A.S. Polysaccharides of algae. Detection of iota-carrageenan in *Phyllophora brodiaei* (Turn.) J. Ag. (Rhodophyta) using ¹³C-NMR spectroscopy. **Bot. Mar.,** Berlin, v. 28, p.367-373, 1985.

USOV, A.I. Sulfated polysaccharides of the red seaweeds. **Food Hydrocol.**, Oxford, v. 6, p. 9-23, 1992.

USOV, A.I.; KLOCHKOVA, N.G. Polysaccharides of algae. 45. Polysaccharide composition of red seaweeds from Kamachatka coastal waters (Notrhwestern Pacific) studied by reductive hydrolysis of biomass. **Bot. Mar.**, Berlin, v. 35, p. 371-378, 1992.

USOV, A. I.; BILAN, M.I.; SHASHKOV, A.S. Structure of a sulfated xylogalactan from the calcerous red alga *Corallina pulifera* (Rhodophyta, Corallinaceae). **Carbohydr. Res.,** Amsterdan, v. 303, p. 93-102, 1997.

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

VAN DE VELDE, F.; PEPPELMAN, H. A.; ROLLEMA, H.S.; TROMP, R.H. On the structure of κ/ι -carrageenans. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 331, p. 271-283, 2001.

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

VAN DE VELDE, F.; ROLLEMA, H. S.; GRINBERG, N.V.; BUROVA, T.V.; GRINBERG, V.Y.; TROMP, R.H. Coil-helix transition of ι-carrageenan as a function of chain regularity. **Biopolymers**, v. 65, p. 299-312, 2002b.

VAN DE VELDE, F.; ANTIPOVA, A.S.; ROLLEMA, H.S.; BUROVA, T.V.; GRINBERG, N.V.; PEREIRA, L.; GILSENAN, P.M.; TROMP, R.H.; RUDOLPH, B. GRINBERG, V.Y. The structure of kappa/iota-hybrid carrageenans II. Coil-helix transition as a function of chair composition. **Carbohydr. Res.,** Amsterdam, v. 340, p. 1113-1129, 2005.

VERBEKEN, D.; THAS, O.; DEWETTINCK, K. Textural properties of gelled dairy desserts containing κ -carrageenan and starch. **Food Hydrocol.**, Oxford., v. 18, p. 817-823, 2004.

VIANA, A.G.; NOSEDA, M.D.; DUARTE, M.E.R.; CEREZO, A.S. Alkali modification of carrageenans. Part V. The iota-nu hybrid carrageenan from *Eucheuma denticulatum* and its cyclization to iota-carrageenan. **Carbohydr. Polym.,** Essex, v. 58, p. 455-460, 2004.

VILLANUEVA, R.D.; MONTAÑO, M.N.E.; NEMESIO, E. Fine chemical structure of carrageenan from the commercially cultivated *Kappaphycus striatum* (Sacol variety) (Solieriacae, Gigartinales, Rhodophyta). **J. Phycol.,** v. 39, p. 513-518, 2003.

VILLANUEVA, R.D.; MENDOZA, W.G.; RODRIGUEZA, M.R.C.; ROMERO, J.B.; MONTAÑO, M.N.E. Structure and funcional performance of gigartinaceam kappaiota hybrid carrageenan and solieriacean kappa-iota carrageenan blends. **Food Hydr.,** v. 18, p. 283-292, 2004.

WEST, J; MILLER, K. **Agarophytes and Carrageenophytes**: History of Use and Harvest, p. 1-2, 2001.

WHYTE, J.N.C.; FOREMAN, R.E.; WREEDE, R.E. Phycocolloid screening of British Columbia red algae. **Hydrobiol.**, Bucharest, v. 116/117, p. 537-541, 1984.

WHISTLER, R.L; BeMILLER, J.N. Carbohydrate Chemistry for Food Scientists. St. Paul: Eagan Press, p. 117-151, 1997.

WITVROUW, M.; DESMYTER, J.; DE CLERCQ, E. Antiviral portrait series: 4. Polysulfates as inhibitors of HIV and other enveloped viruses. **Antiv. Chem. Chemother.**, v. 5, p. 345-359, 1994.

WUDUNN, D.; SPEAR, P.C. Initial interaction of herpes simplex vírus with cells is binding to heparan sulfate. **Virol.**, v. 63, p. 52-58, 1989.

WURZBURG, M.S. Starch. In: **Modified Starches: Properties and Uses.**, Boca Raton, USA: CRC PRESS, INC., p. 3-16, 1986.

YAPHE, W. Colorimetric determination of 3,6-anhydrogalactose and galactose in marine algae polysaccharides. **Anal. Chem.**, v. 32, p. 1327-1330, 1960.

ZHANG, Q.; YU, P.; LI, Z.; ZHANG, H. XU, Z.; LI, P. Antioxidant activities of sulfated polysaccharide fractions from *Porphyra haitanesis*, **J. Appl. Phycol.**, v. 15, p. 305-310.

ZHOU, G.; SUN, Y.; XIN, H.; ZHANG, Y.; XU, Z. In vivo antitumoral and immunomodulation activities of different molecular weight lambda-carrageenans from *Chondrus ocellatus*. **Pharmacological Research.**, v. 50, p. 47-53, 2004.

ZIBETTI, R.G.M. Determinação da estrutura química de galactanas híbridas-D/L isoladas da alga vermelha *Cryptonemia crenulata* (Cryptonemiales, Rhodophyta). 2001. 68f Tese (Mestrado em Bioquímica) — Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

ZIBETTI, R.G.M. Determinação da estrutura química de polissacarídeos isolados de algas pertencentes à ordem Halymeniales (Rhodophyta). Curitiba, 2005. 194f. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

ZOBEL, H. F.; STEPHEN, A. M. **Starch: structure, analysis, and application**. In: Food Polysaccharides and Their Applications, A. M. Stephen (Ed.), New York: Marcel Dekker Inc, p. 19-65, 1995.