

ROSIANE GUETTER MELLO ZIBETTI

**DETERMINAÇÃO DA ESTRUTURA QUÍMICA DE
POLISSACARÍDEOS ISOLADOS DE ALGAS PERTENCENTES
À ORDEM HALYMENIALES (RHODOPHYTA).**

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
Nosedá

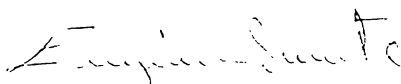
Co-orientador: Prof. Dr. Miguel Daniel Nosedá

CURITIBA
2005

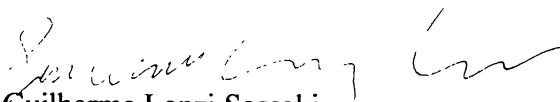
ROSIANE GUETTER MELLO ZIBETTI

DETERMINAÇÃO DA ESTRUTURA QUÍMICA DE POLISSACARÍDEOS ISOLADOS DE ALGAS PERTENCENTES À ORDEM *HALYMENIALES* (RHODOPHYTA)

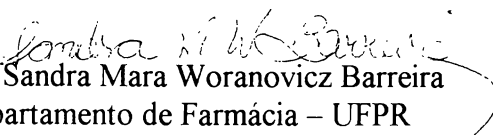
Tese aprovada como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências no Programa de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, pela Comissão Examinadora formada pelos professores:



Dr^a Maria Eugênia Duarte Nosedá
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular - UFPR



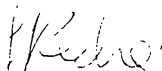
Dr. Guilherme Lanzi Sassaki
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR



Dr^a Sandra Mara Woranovicz Barreira
Departamento de Farmácia – UFPR



Dr^a Helena Nader
Departamento de Bioquímica – UNIFESP



Dr^a Carem Gledes Vargas Rechia
Departamento de Física e Química – USP, Ribeirão Preto

Curitiba, 18 de março de 2005

Dedico este trabalho aos eternos super-heróis da minha vida, Gilberto Lobo Mello e Rosilene Guetter Mello.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Professora Maria Eugênia Duarte Nosedá, pela orientação, estímulo, amizade e força em todos os momentos da realização deste trabalho, e ao Professor Miguel Daniel Nosedá, pela orientação, troca de idéias e amizade.

Agradeço a todos professores do curso de pós-graduação em Bioquímica que muito contribuíram para minha formação, em especial aos professores Philip Albert James Gorin e Guilherme Lanzi Sassaki pelas valiosas contribuições na correção interna deste trabalho.

Em especial agradeço aos meus pais Gilberto Lobo Mello e Rosilene Guetter Mello, pelo apoio a toda hora, pois sem a ajuda incondicional de vocês com certeza este trabalho não estaria pronto. Obrigado por tudo, como sempre digo agradeço a Deus por serem meus pais. Amo vocês!!!

Ao meu marido Geomar D. Zibetti, agradeço do fundo do coração em resistir ao meu lado nesta etapa de minha vida, obrigado por participar comigo nas coletas, nos congressos, enfim obrigado por tudo que você teve que renegar por causa do meu objetivo.

A minha filha Rocielle, obrigada por entender a minha ausência, e por ser este anjinho muito alegre que sempre está iluminando minha vida. Te amo filha.

Ao meu sogro (Donato), sogra (Nelis) e minha cunhada (Giovana), pelo apoio e pelos braços sempre abertos, abrigada.

Ao meu irmão Ricardo que mesmo longe sempre me deu apoio para seguir em frente.

Ao amigo irmão Adriano G. Viana, bom como posso explicar o quanto tenho que te agradecer, acho que deve sentir o mesmo, obrigado pelo teu apoio incondicional e pela tua alegria contagiante que sempre esteve presente no nosso dia-a-dia. É amigo, nós conseguimos!

A minha amiga Paula Cristina de Sousa Faria carinhosamente Paulinha, obrigada pelo apoio a toda hora e enriquecimento de nossa amizade, pois você não é uma colega que passou pela minha vida e sim é uma amiga para toda a vida.

Jujuba (Juliana Emanuela Cassolato), minha amiga, minha vizinha, nossa como foi bom ter te conhecido (loca que nem nós), obrigada pela tua amizade sempre sincera, você é uma pessoa brilhante em tudo que faz.

Marco André Cardoso (Marquito), obrigado pela sua amizade e sempre disposição a ajudar, valeu, você também é um talento em tudo que faz.

Obrigada a todos os colegas do laboratório de Química de carboidratos de algas marinhas, Alan, Diogo, Sérgio, Francielly, Robson e Tayna, foi muito bom ter convivido com vocês.

Ao amigo Rodris (Rodrigo Vassoler), obrigado por todo apoio e principalmente por sempre estender as mãos na hora que mais precisei.

A amiga Fefe (Fernanda Simas), nossa nunca tinha conhecido alguém tão teimosa como eu, valeu amiga é muito bom ter a sua amizade e escutar as suas críticas construtivas, obrigada.

Aos amigos Ricardo Wagner, Tales, Elaine, Juliana Curi, Lucimara e em especial a Caroline Grassi Melingher pela força e trocas de idéia e sempre disposição a ajudar.

A Dra. Silvia Maria Pitta de Beuclair Guimarães do Instituto de Botânica de São Paulo, por ter me recebido em seu laboratório, e com toda paciência do mundo passar o seu valioso conhecimento, sem o qual não teria nem chegado perto das Halymeniales.

Ao Dr. Alberto Saul Cerezo pela valiosa colaboração científica com o grupo de Carboidratos de algas marinhas da UFPR.

Ao Dr. José Esteves e a Dra. Marina Ciancia da Universidade de Buenos Aires, pelas análises enantioméricas.

A Dra. Elza Damonte e ao Dr. Carlos Pujol da universidade de Buenos Aires pelas análises antivirais.

As bibliotecárias, em especial a Telma e Isabeia pelas suas atenções de suma importância para a qualidade deste trabalho.

A CAPES, FUNPAR e ao PRONEX-Carboidratos pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	v
LISTA DE TABELAS E ESQUEMAS.....	viii
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS.....	xii
RESUMO.....	xiv
ABSTRACT.....	xv
1- INTRODUÇÃO.....	1
1.1- ALGAS VERMELHAS.....	1
1.2- GALACTANAS: ESTRUTURA GERAL.....	2
1.3- GALACTANAS: CLASSIFICAÇÃO.....	3
1.3.1- GALACTANAS DO TIPO CARRAGENANAS.....	4
1.3.2- GALACTANAS DO TIPO AGARANAS.....	7
1.3.3- GALACTANAS DO TIPO DL-HÍBRIDA.....	9
1.4- ALGAS PRODUTORAS DE CARRAGENANAS.....	11
1.4.1- ORDEM GIGARTINALES.....	11
1.5- ALGAS PRODUTORAS DE AGARANAS.....	14
1.5.1- ORDEM GELIDIALES E GRACILARIALES.....	14
1.5.2- ORDEM CERAMIALES.....	16
1.6- ALGAS PRODUTORAS DE GALACTANAS DO TIPO DL-HÍBRIDAS.....	18
1.6.1- ORDENS RHODYMENIALES E PLOCAMIALES.....	18
1.6.2- ORDEM HALYMENIALES.....	19
1.7- APLICAÇÃO DAS GALACTANAS SULFATADAS.....	26
1.7.1- APLICAÇÃO INDUSTRIAL.....	26
1.7.2 APLICAÇÃO BIOLÓGICA.....	28
2- OBJETIVOS.....	30
2.1- OBJETIVO GERAL.....	30
2.2- OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	30
3- MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
3.1- MÉTODOS ANALÍTICOS GERAIS.....	31

3.2-ESPÉCIES ESTUDADAS E SEUS POSICIONAMENTOS SISTEMÁTICOS.....	32
3.3- COLETA E PROCESSAMENTO.....	33
3.4- EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS.....	33
3.4.1- EXTRAÇÃO DAS GALACTANAS DE <i>Cryptonemia crenulata</i> E <i>Cryptonemia seminervis</i>	33
3.4.2- EXTRAÇÃO DAS GALACTANAS DE <i>Halymenia floridana</i>	34
3.5- TRATAMENTO DOS POLISSACARÍDEOS COM KCl.....	34
3.6- PURIFICAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS DE <i>C. seminervis</i> POR CROMATOGRAFIA DE TROCA-ÍÔNICA.....	35
3.7- HIDRÓLISE ÁCIDA TOTAL DO TIPO HIDRÓLISE REDUTIVA.....	35
3.8- HIDRÓLISE ÁCIDA TOTAL.....	36
3.9- DESSULFATAÇÃO POR TRATAMENTO SOLVOLÍTICO.....	36
3.9.1- PREPARO DO SAL DE PIRIDÔNIO.....	36
3.9.2- SOLVÓLISE.....	37
3.10- TRATAMENTO ALCALINO.....	37
3.10.1- TRATAMENTO ALCALINO ANALÍTICO.....	37
3.10.2- DETERMINAÇÃO DO TEOR DE 3,6-anidrogactose.....	38
3.10.3- TRATAMENTO ALCALINO PREPARATIVO.....	38
3.11- DETERMINAÇÃO DA CONFIGURAÇÃO ENANTIOMÉRICA.....	39
3.12- METILAÇÃO.....	40
3.13- MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS.....	40
3.13.1-CROMATOGRAFIA LÍQUIDO-GASOSA.....	40
3.13.2-CROMATOGRAFIA LÍQUIDO-GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSA (CG-EM).....	41
3.13.3- CROMATOGRAFIA DE GEL PERMEAÇÃO (HPSEC-MALLS) – ANÁLISE DE HOMOGENEIDADE E MASSA MOLECULAR.....	41
3.14- DESPOLIMERIZAÇÃO DAS GALACTANAS UTILIZANDO HIDRÓLISE REDUTIVA PARCIAL.....	43
3.15-FRACIONAMENTO E PURIFICAÇÃO DAS GALACTANAS PARCIALMENTE DESPOLIMERIZADAS OBTIDAS POR HIDRÓLISE REDUTIVA PARCIAL.....	44

3.16- RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR.....	45
3.16.1- RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE CARBONO-13 (RMN - ^{13}C).....	45
3.16.2- RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE PRÓTON (RMN – ^1H).....	45
3.16.3- HMQC (HETERONUCLEAR MULTIPLE QUANTUM CORRELATION SPECTROSCOPY).....	46
3.17- ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FT-IR).....	46
3.18- DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIHERPÉTICA DAS GALACTANAS DE <i>C. crenulata</i>	46
3.18.1- ENSAIO CITOTÓXICO.....	47
3.18.2- FORMAÇÃO DE PLACAS EM CÉLULAS Vero.....	48
3.18.3- DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL <i>in vitro</i>	48
3.18.4- DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE VIRUCIDA <i>in vivo</i>	50
3.18.5- ENSAIO <i>in vivo</i> DE PROTEÇÃO A INFECÇÃO PELO HSV-2....	51
4- RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	52
4.1- RESULTADOS E DISCUSSÃO DOS POLISSACARÍDEOS DE <i>Cryptonemia crenulata</i>	52
4.1.1- OBTENÇÃO E ANÁLISES DAS FRAÇÕES BRUTAS DE <i>C.</i> <i>crenulata</i>	52
4.1.2- ANÁLISES GERAIS DE C2S-3.....	58
4.1.3- DESSULFATAÇÃO SOLVOLÍTICA DA GALACTANA C2S-3.....	59
4.1.4- TRATAMENTO ALCALINO DA GALACTANA C2S-3.....	60
4.1.5- ANÁLISE DE (TRIDEUTERO)METILAÇÃO DA GALACTANA NATIVA (C2S-3), DESSULFATADA (C2S-3D) E SUBMETIDA A TRATAMENTO ALCALINO (C2S-3T)	61
4.1.6- ESPECTROSCOPIA DE RMN DE ^{13}C DAS FRAÇÕES C2S-3, C2S-3D.....	65
4.1.7- ESTUDO DA CINÉTICA DE CICLIZAÇÃO ALCALINA.....	70
4.1.8- DESPOLIMERIZAÇÃO DA GALACTANA C2S-3.....	75
4.1.9- ANÁLISES GERAIS DA FRAÇÃO C1S.....	85

4.1.10- PURIFICAÇÃO DE C1S	88
4.1.11- CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DE C1S-3.....	92
4.1.11.1 - DESSULFATAÇÃO SOLVOLÍTICA DE C1S-3.....	92
4.1.11.2 - ESPECTROSCOPIA DE RMN DE ¹³ C DAS FRAÇÕES C1S-3 E C1S-3D.....	93
4.1.11.3 –METILAÇÃO DAS GALACTANAS C1S-3 E C1S-3D.....	95
4.1.12- GALACTANAS DL-HÍBRIDAS VERSUS MISTURAS DE DIASSTERIOISÔMEROS.....	98
4.1.13- ATIVIDADE ANTIHERPÉTICA DAS GALACTANAS DE <i>C.</i> <i>crenulata</i> E SUA CORRELAÇÃO COM A ESTRUTURA.....	99
4.2- RESULTADOS E DISCUSSÃO DOS POLISSACARÍDEOS DE <i>Cryptonemia seminervis</i>	109
4.2.1 OBTENÇÃO E ANÁLISES DAS FRAÇÕES BRUTAS DE <i>C.</i> <i>seminervis</i>	109
4.2.2- PURIFICAÇÃO DA FRAÇÃO S2S.....	121
4.2.3- CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DE S2S-3.....	125
4.2.3.1- ANÁLISE ENANTIOMÉRICA E ESPECTROSCOPIA DE RMN DE ¹³ C de S2S-3.....	125
4.2.3.2- DESSULFATAÇÃO SOLVOLÍTICA DE S2S-3.....	129
4.2.3.3- TRATAMENTO ALCALINO DE S2S-3.....	137
4.2.3.4- ANÁLISE DE (TRIDEUTERO)METILAÇÃO DA GALACTANA NATIVA (S2S-3), DESSULFATADA (S2S-3D) E SUBMETIDA A TRATAMENTO ALCALINO (S2S-3T)	142
4.2.3.4- DESPOLIMERIZAÇÃO PARCIAL DA GALACTANA S2S-3.....	151
4.3- RESULTADOS E DISCUSSÃO DOS POLISSACARÍDEOS DE <i>Halymenia floridana</i>	158
4.3.1- OBTENÇÃO E ANÁLISES DAS FRAÇÕES BRUTAS DE <i>H.</i> <i>floridana</i>	158
4.3.2- CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DE HS.....	164
4.3.2.1- ESPECTROSCOPIA DE RMN DE ¹³ C de HS.....	164
4.3.2.2- DESSULFATAÇÃO SOLVOLÍTICA DE HS.....	166

4.4- COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS DE ANÁLISES ESTRUTURAIS DAS GALACTANAS HOMOGÊNEAS C2S-3, S2S-3 E HS.....	172
5.0- CONCLUSÕES.....	177
6.0- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	179
ANEXOS.....	199

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).....	8
FIGURA-3 FOTO DA ALGA <i>C. crenulata</i>	52
FIGURA-4 ESPECTROS DE RMN DE ^{13}C DAS GALACTANAS C2S-3(A) e C2S-3D (B).....	69
FIGURA-5 DETERMINAÇÃO DA CONSTANTE DE VELOCIDADE DA REAÇÃO DE CICLIZAÇÃO DA FRAÇÃO C2S-3 À 80°C.....	71
FIGURA-6 ESTRUTURA DA AGAROSE E DO SEU PRODUTO DE HIDRÓLISE REDUTIVA PARCIAL AGAROBIIITOL.....	76
FIGURA-7 PERFIL DE ELUIÇÃO DA CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA (DEAE-SEPHADEX A-25) PRODUTO DE HIDRÓLISE REDUTIVA PARCIAL DA FRAÇÃO C2S-3 DA ALGA <i>C. crenulata</i>	78
FIGURA-8 PERFIL DA CROMATOGRAFIA DE GEL FILTRAÇÃO (BioGel-P2) DA FRAÇÃO CC.....	78
FIGURA-9 PERFIL DA CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO (BioGel-P2) DA FRAÇÃO CD.....	79
FIGURA-10 ANÁLISE DE HOMOGENEIDADE DA FRAÇÃO CC POR CROMATOGRAFIA DE GEL PERMEAÇÃO (HPSEC-MALLS).....	79
FIGURA-11 ANÁLISE DE HOMOGENEIDADE DA FRAÇÃO CC POR CROMATOGRAFIA DE GEL PERMEAÇÃO (BioGel P-30).....	80
FIGURA –12 ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DA FRAÇÃO CC.....	83
FIGURA-13 ESPECTRO DE RMN de ^{13}C DO EXTRATO C1S DE <i>C. crenulata</i>	86
FIGURA-14 ESPECTRO DE HMQC DA FRAÇÃO C1S DE <i>C. crenulata</i>	87
FIGURA-15 FRAÇÃO C2S-2a, OBTIDA ATRAVÉS DO REFRACIONAMENTO DE C2S-2.....	88
FIGURA-16 ANÁLISE DE HOMOGENEIDADE DA FRAÇÃO C1S-3 POR CROMATOGRAFIA DE GEL PERMEAÇÃO (HPSEC-MALLS).....	91

FIGURA-17 ESPECTROS DE RMN DE ^{13}C DAS GALACTANAS C1S-3(A) e C1S-3D (B).....	94
FIGURA-18 (A) ESTRUTURA DA MÍNIMA SEQUÊNCIA DE LIGAÇÃO DO HEPARAN SULFATO. (B) MÍNIMA ESTRUTURA DE LIGAÇÃO DA AGARANA DE <i>A. spicifera</i> (Figura de DUARTE et al., 2004)	103
FIGURA-19 FOTO DA ALGA <i>C. seminervis</i>	109
FIGURA-20 ESPECTRO DE RMN* DE ^{13}C DA FRAÇÃO S1S DE <i>C.</i> <i>seminervis</i>	117
FIGURA-21 ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DA FRAÇÃO S2S DE <i>C.</i> <i>seminervis</i>	118
FIGURA-22 ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DA FRAÇÃO S3S DE <i>C.</i> <i>seminervis</i>	118
FIGURA-23 ANÁLISE DE HOMOGENEIDADE DA FRAÇÃO S1S.....	119
FIGURA-24 ANÁLISE DE HOMOGENEIDADE DA FRAÇÃO S2S.....	120
FIGURA-25 ANÁLISE DE HOMOGENEIDADE DA FRAÇÃO S3S.....	120
FIGURA-26 ANÁLISE DE HOMOGENEIDADE DA FRAÇÃO S2S-1.....	123
FIGURA-27 ANÁLISE DE HOMOGENEIDADE DA FRAÇÃO S2S-2.....	123
FIGURA-28 ANÁLISE DE HOMOGENEIDADE DA FRAÇÃO S2S-3.....	124
FIGURA-29 ANÁLISE DE HOMOGENEIDADE DA FRAÇÃO S2S-4.....	124
FIGURA -30 ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DA FRAÇÃO S2S-3 DE <i>C.</i> <i>seminervis</i>	128
FIGURA-31 ESPECTRO DE INFRAVERMELHO DAS FRAÇÕES S2S-3 E S2S-3D	130
FIGURA-32 ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DA FRAÇÃO S2S-3D DE <i>C.</i> <i>seminervis</i>	134
FIGURA-33 ESPECTRO DE RMN DE ^1H DA FRAÇÃO S2S-3D DE <i>C.</i> <i>seminervis</i>	136
FIGURA-34 GRÁFICO DO TRATAMENTO ANALÍTICO DA GALACTANA S2S-3 DE <i>C. seminervis</i>	138
FIGURA-35 ESPECTRO DE RMN* DE ^{13}C DA FRAÇÃO S2S3-T DE <i>C.</i> <i>seminervis</i>	141

FIGURA-36 ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DA FRAÇÃO PARCIALMENTE DESPOLIMERIZADA CS.....	157
FIGURA -37 FOTO DA ALGA <i>H. floridana</i>	158
FIGURA-38 ANÁLISE DE HOMOGENEIDADE DA FRAÇÃO HS.....	163
FIGURA-39 ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DA FRAÇÃO HS.	165
FIGURA-40 ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DA FRAÇÃO HS-D.....	168
FIGURA-41 DESLOCAMENTO QUÍMICO DO CARBONO 4 DAS UNIDADES DE 4,6-O-(1-carboxietilideno)- β -D-galactopiranosose EM (A) QUANDO LIGADA A α -L-galactopiranosose E EM (B) QUANDO LIGADA A α -D-galactopiranosose (FALSHAW et al., 2003b).....	170

LISTA DE TABELAS E ESQUEMAS

TABELA-1 CLASSIFICAÇÃO DAS CARRAGENANAS DE ACORDO COM ESTRUTURAS IDEAIS DE UNIDADES A E B.....	6
TABELA-2 CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS DE GALACTANAS EXTRAÍDAS DE ESPÉCIES DA ORDEM HALYMENIALES.....	21
ESQUEMA-1 REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO ENSAIO PARA DETERMINAÇÃO DO EFEITO DO PERÍODO DE INCUBAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS SOBRE O HSV-1.....	50
ESQUEMA-2 EXTRAÇÃO (A) E FRACIONAMENTO (B) DOS POLISSACARÍDEOS DE <i>C. crenulata</i>	53
TABELA-3 ANÁLISE QUÍMICA E COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES C1, C2 E C3 DE <i>C. crenulata</i>	55
TABELA-4 ANÁLISE QUÍMICA E COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DA FRAÇÃO C2S, SOLÚVEL EM KCL 2M DE <i>C. crenulata</i>	56
TABELA-5 ANÁLISE QUÍMICA E COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS SUB-FRAÇÕES DE C2S, DE <i>C. crenulata</i>	57
TABELA-6 ANÁLISE QUÍMICA E COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DA GALACTANA C2S-3, C2S-3D E C2S-3T DE <i>C. crenulata</i>	59
TABELA-7 ANÁLISE DE METILAÇÃO DAS GALACTANAS C2S-3, C2S-3D E C2S-3T.....	62
TABELA-8 TRIDEUTEROMETILAÇÃO DA GALACTANA NATIVA C2S-3 (N) E DA PARCIALMENTE DESSULFATADA (D).....	64
TABELA-9 SINAIS ANOMÉRICOS (ppm) PRESENTES NOS ESPECTRO DE RMN DE ¹³ C DAS FRAÇÕES C2S-3 E C2S-3D.....	68
TABELA -10 CONSTANTE DA VELOCIDADE E TEMPO DE MEIA VIDA DA REAÇÃO DE CICLIZAÇÃO ALCALINA DE ALGUMAS DÍADES DE CARRAGENANAS E AGARANAS.....	74
TABELA-11 ANÁLISE DO TEOR DE SULFATO E COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DA FRAÇÃO CC PROVENIENTE DA HIDRÓLISE REDUTIVA PARCIAL DA GALACTANA C2S-3 DE <i>C. crenulata</i>	80

TABELA-12 ANÁLISE DE METILAÇÃO DA GALACTANA C2S-3 E DA FRAÇÃO CC.....	82
TABELA-13 SINAIS ANOMÉRICOS (ppm) PRESENTES NOS ESPECTRO DE RMN DE ¹³ C DAS FRAÇÕES C2S-3 E CC.....	84
TABELA-14 RENDIMENTO E ANÁLISE QUÍMICA DAS FRAÇÕES DE <i>C. crenulata</i>	89
TABELA-15 COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DA FRAÇÃO C1S E DE SUAS SUB-FRAÇÕES.....	90
TABELA-16 TEOR DE SULFATO E COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DA GALACTANA C1S-3, E C1S-3D DE <i>C. crenulata</i>	92
TABELA-17 SINAIS ANOMÉRICOS (ppm) PRESENTES NOS ESPECTRO DE RMN DE ¹³ C DAS FRAÇÕES C1S-3 E C1S-3D.....	95
TABELA-18 ANÁLISE DE METILAÇÃO DAS GALACTANAS C1S-3 E C1S-3D.....	97
TABELA-19 ATIVIDADE ANTI-HSV-1 E ENSAIO CITOTÓXICO DE GALACTANAS ISOLADAS DE <i>Cryptonemia crenulata</i>	100
TABELA-20 ATIVIDADE ANTI-HSV-1 E HSV-2 DE GALACTANAS ISOLADAS DE <i>Cryptonemia crenulata</i>	104
TABELA-21 INFLUENCIA DOS DIFERENTES PERIODOS DE TRATAMENTO NA ATIVIDADE DAS GALACTANAS DE <i>Cryptonemia crenulata</i> CONTRA HSV-1.....	105
TABELA-22 EFEITO DA FRAÇÃO C2 DE <i>Cryptonemia crenulata</i> NO TRATAMENTO DA INFECÇÃO VAGINAL COM HSV-2.....	107
ESQUEMA-3 Extração (A) e FRACIONAMENTO (B) DOS POLISSACARÍDEOS OBTIDOS DA ALGA <i>Cryptonemia seminervis</i>	110
TABELA-23 RENDIMENTO E ANÁLISE QUÍMICA DAS FRAÇÕES DE <i>C. seminervis</i> OBTIDAS POR EXTRAÇÃO AQUOSA À TEMPERATURA DE 25°C E 80°C.....	112
TABELA-24 ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES S1, S2 E S3 DA ALGA <i>C. seminervis</i>	113

TABELA 25- RENDIMENTO E ANÁLISE QUÍMICA DAS FRAÇÕES DE <i>C. seminervis</i> , OBTIDAS APÓS TRATAMENTO COM KCl	114
TABELA-26 ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES DE <i>C. cseminervis</i> SOLÚVEIS EM KCl 2 M.....	116
TABELA-27 RENDIMENTO E ANÁLISE QUÍMICA DAS FRAÇÕES DE <i>C. seminervis</i> , OBTIDAS POR CROMATOGRAFIA DE TROCA-IÔNICA (DEAE-Sephacel) DE S2S.....	121
TABELA-28 ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS SUBFRAÇÕES DE <i>C. seminervis</i> OBTIDAS POR CROMATOGRAFIA DE TROCA-IÔNICA (DEAE-Sephacel) DE S2S.....	122
TABELA-29 COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA E ANÁLISE ENANTIOMÉRICA DA FRAÇÃO S2S-3) DE <i>C. seminervis</i>	125
TABELA-30 SINAIS ANOMÉRICOS (ppm) PRESENTES NOS ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DA FRAÇÃO S2S-3.....	129
TABELA-31 COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES NATIVA (S2S-3) E DESSULFATADA (S2S-3D) DE <i>C. seminervis</i>	131
TABELA-32 SINAIS ANOMÉRICOS (ppm) PRESENTES NOS ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DA FRAÇÃO S2S-3D.....	133
TABELA-33 COMPARAÇÃO DA COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DA FRAÇÃO S2S-3 DE <i>C. seminervis</i> ANTES E APÓS TRATAMENTO ALCALINO.....	139
TABELA-34 SINAIS ANOMÉRICOS (ppm) PRESENTES NOS ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DA FRAÇÃO S2S-3T.....	140
TABELA-35 RESULTADOS DAS ANÁLISES DE METILAÇÃO DAS FRAÇÕES S2S-3, S2S-3D e S2S-3T.....	144
TABELA-36 TRIDEUTEROMETILAÇÃO DA GALACTANA NATIVA S2S-3 (N) E DA PARCIALMENTE DESSULFATADA S2S-3D (D).....	150
TABELA-37 ANÁLISE DO TEOR DE SULFATO E COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DA FRAÇÃO CS PROVENIENTE DA HIDRÓLISE REDUTIVA PARCIAL DA GALACTANA S2S-3 DE <i>C. seminervis</i>	152

TABELA-38 ANÁLISE DE METILAÇÃO DA GALACTANA S2S-3 E DA FRAÇÃO CS.....	153
TABELA-39 DESLOCAMENTOS QUÍMICOS (ppm) DE DÍADES ENCONTRADAS NO ESPECTRO DE RMN DE ¹³ C DA FRAÇÃO CS.....	156
ESQUEMA-4 EXTRAÇÃO E FRACIONAMENTO DOS POLISSACARÍDEOS OBTIDOS DA ALGA <i>Halymenia floridana</i>	159
TABELA-40 RENDIMENTO E ANÁLISE QUÍMICA DA FRAÇÃO DE <i>H. floridana</i> OBTIDA POR EXTRAÇÃO AQUOSA A 80°C.....	160
TABELA-41 ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DA FRAÇÃO H DE <i>H. floridana</i> OBTIDA POR EXTRAÇÃO AQUOSA A 80°C.	161
TABELA-42 RENDIMENTO E ANÁLISE QUÍMICA DAS FRAÇÕES TRATADAS COM KCl DE <i>H. floridana</i>	162
TABELA-43 ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES HS E HP DE <i>H. floridana</i> OBTIDAS POR TRATAMENTO COM KCl.	163
TABELA-44 ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES HS E HS-D DE <i>H. floridana</i>	167
TABELA-45 SINAIS ANOMÉRICOS (ppm) PRESENTES NOS ESPECTRO DE RMN DE ¹³ C DA FRAÇÃO HS-D.....	171
TABELA-46 ANÁLISE QUÍMICA E COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS GALACTANAS C2S-3, S2S-3 E HS.....	172
TABELA-47 COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS GALACTANAS C2S-3, S2S-3 E HS.....	173

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

α_D – rotação óptica específica (a 20 °C)

^{13}C - carbono 13

^1H - próton

4-MMB – 4-metil-morfolina borano

A_∞ - absorbância a tempo infinito

A_0 - absorbância a tempo inicial (zero minuto)

A_t - absorbância a tempo t

BaCl₂ – cloreto de bário

CLG – cromatografia líquido-gasosa

CG-EM – cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa

D₂O – água deuterada

DEAE - dietilaminoetil

DMSO – dimetil sulfóxido

FT-IR – espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier.

HCl – ácido clorídrico

HMQC - heteronuclear multiple quantum correlation spectroscopy

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

ICH₃ – iodometano

ICD₃ – iodometano deuterado

k - velocidade da reação

KBr – brometo de potássio

KCl – cloreto de potássio

MHz – mega hertz

NaBD₄ – borodeutereto de sódio

NaBH₄ – borohidreto de sódio

NaCl – cloreto de sódio

NaNO₃ – nitrito de sódio

NaOH – hidróxido de sódio

p/v – peso/volume

ppm – partes por milhão

RMN – ressonância magnética nuclear

t_{1/2} – tempo de meia-vida

TFA – ácido trifluoroacético

HS – heparan sulfato

PFU – unidades formadoras de placas

CC₅₀ – concentração citotóxica 50%

IC₅₀ – concentração inibitória 50%

SI – índice de seletividade ou CC₅₀/IC₅₀

VC₅₀ – concentração virucida, ou concentração necessária para inativar os vírus em 50%

RESUMO

As galactanas homogêneas C1S-3 ($M_w = 315.000$) e C2S-3 ($M_w = 236.200$), S2S-3 ($M_w = 414.900$) e HS foram obtidas por extração aquosa e posterior purificação das algas vermelhas *Cryptonemia crenulata*, *Cryptonemia seminervis* e *Halymenia floridana* (Halymeniales, Rhodophyta), respectivamente. Estas galactanas são sulfatadas (16,0%, 28,3%, 27,25 e 30,3%, respectivamente) e piruvatadas (0,7%, 0,5%, 5,1% e 4,5%, respectivamente). As unidades A (β -galactose-3-O-substituída) em C2S-3 (91%), S2S-3 (77%) e HS são majoritariamente sulfatadas em C-2, enquanto em C1S-3 são principalmente não substituídas. Unidades de 4,6-O-(1'-carboxietilideno)- β -D-galactopiranoose são também sulfatadas em C-2 (C2S-3 e S2S-3). As unidades B (α -galactose-4-O-substituída) são mais heterogêneas quando comparada as unidades A. Em C1S-3 são constituídas por 2-O-metil-galactose, baixas porcentagens de unidades precursoras de 3,6-anidrogactose (α -galactose 6-sulfato) e por unidades de 3,6-anidrogactose não substituídas ou metiladas em C-2 (13,9 mol%). Em C2S-3 são encontradas na forma de 3,6-anidro-2-O-metil- α -L-galactose (8,6 mol%), 3,6-anidro- α -galactose 2-sulfato (2 mol% da série D-, e 11,6 mol% L-) e 3,6-anidrogactose (3,5 mol%). Unidades precursoras (10,9 mol%), são principalmente da série D- (7,6 mol%), assim como 2-O-metil-galactose (3,2 mol% D- e 1,3 mol% L-). De modo diferente na galactana S2S-3 as unidades anidrogactosídicas (20,2 mol%) são pertencentes a série enantiomérica L- (32% destas são não substituídas, 13% são sulfatadas e 9,5% são metiladas em C-2), bem como α -galactose 6-sulfato (6,9 mol%). Unidades de 2-O-metil- α -galactose (4,0 mol%) são principalmente da série D- (2,5 mol%). Na galactana HS, α -D- e α -L-galactose e 3,6-anidro- α -L-galactose estão presentes. Deste modo unidades B pertencentes tanto a série enantiomérica D- como L-, caracteriza estas galactanas como do tipo DL-híbridas. C2S-3 apresenta 55% da sua estrutura com característica de agarana (45% de carragenana), enquanto em S2S-3 70% da sua estrutura é de agarana (30% de carragenana). Caráter DL-híbrido também foi confirmado nos produtos de despolimerização ácida parcial das galactanas C2S-3 e S2S-3. C2S-3 e S2S-3 foram submetidas ao estudo da cinética de ciclização alcalina a 80 °C e apresentaram uma constante de velocidade da reação (k) de $1,7 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$ e $5,7 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$, e um tempo de meia vida de 68,6 e 20,2 minutos, respectivamente. C2S-3 apresentou uma reação intermediária entre uma λ -carragenana e uma porfirana, enquanto que para S2S-3 a reação é similar a uma porfirana. Estes resultados demonstram que em C2S-3 há unidades precursoras ligadas a β -galactose 2-sulfato, enquanto que em S2S-3 as unidades precursoras estão ligadas a β -galactose. A potente atividade antiviral de C2S-3 e de outras frações brutas de *C. crenulata*, frente a diferentes cepas de HSV-1 e HSV-2, inibindo a etapa de adsorção viral, foi atribuída principalmente a presença das díades β -D-galactose 2-sulfato ligada a α -galactose 6-sulfato. Esta díade é estruturalmente análoga a mínima sequência do heparan sulfato necessária para a interação deste com a glicoproteína gC do envelope viral do HSV-1. Em resumo as galactanas das algas da ordem Halymeniales investigadas no presente trabalho são do tipo DL-híbrida com díades diferentes das carragenanas ou agaranas classicamente descritas na literatura.

ABSTRACT

The homogeneous galactans C1S-3 ($M_w = 315,000$) and C2S-3 ($M_w = 236,200$), S2S-3 ($M_w = 414,900$) and HS were obtained after aqueous extractions from the red seaweeds (Halymeniales, Rhodophyta) *Cryptonemia crenulata*, *Cryptonemia seminervis* and *Halymenia floridana* respectively. These were shown to be sulfated (16.0%, 28.3%, 27.25 and 30.3%) and piruvated (0.7%, 0.5%, 5.1% and 4.5%). Sulfate was found mainly at C-2 of the A units (3-linked β -D-galactopyranosyl) of C2S-3 (91%), S2S-3 (77%) and HS, while C1S-3 was found mainly unsubstituted. The 4,6-O-(1'-carboxyethylidene)- β -D-galactopyranose units were sulfated at C-2 (C2S-3 and S2S-3). The B units (4-linked α -galactopyranosyl residues) of these galactans were more heterogeneous when compared to the A units. In C1S-3, these contained 2-O-methyl-galactose, low percentages of precursor units of 3,6-anhydrogalactose (α -galactose 6-sulfate), and 3,6-anhydrogalactose units (13.9 mol%), which may be found methylated at C-2. In C2S-3, these units were 3,6-anhydro-2-O-methyl-L-galactose (8.6 mol%), 3,6-anhydro-L-galactose 2-sulfate (2 mol% D-, and 11.6 mol% L-), 3,6-anhydrogalactose (3.5 mol%). Precursor units (10.9 mol%) were major to D- form (7.6 mol%) and 2-O-methyl-galactose (3.2 mol% D- and 1.3 mol% L-). The S2S-3 fraction had B units composed of 3,6-anhydrogalactose (20.2 mol%) belonging to serie L- (32% of which were non-substituted, 13% sulfated at C-2 and 9.5% methylated at C-2). As well as α -L-galactose 6-sulfate (6.9 mol%). The 2-O-methyl- α -galactose were mostly to D- form (2.5 mol%). In the HS galactan, α -D- and α -L-galactose and 3,6-anhydro- α -L-galactose were present. The presence of D- and L- enantiomers forming the B units characterized these galactans as being DL-hybrid type. The structure of C2S-3 is 55% characteristic of agaran (45% is carrageenan-like), while in S2S-3, 70% of the molecule had agaran characteristics (30% of carrageenans). The DL-hybrid character was also confirmed in the products of partial depolymerization of C2S-3 and S2S-3. C2S-3 and S2S-3 were submitted to alkaline cyclization at 80 °C and its kinetic determined. The rate constant (k) found was $1.7 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$ and $5.7 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$ with half-lives of 68.6 and 20.2 minutes, respectively. C2S-3 had an intermediary reaction between those of porphyrans and *lambda*-carrageenans, and S2S-3 the reaction was porphyran-like. These results show that the precursor units in C2S-3 are linked to β -galactose 2-sulfate units, while precursors of S2S-3 are linked to unsubstituted residues. The antiviral activity of C2S-3 and other crude fractions of *C. crenulata* against a broad variety of strains of HSV-1 and HSV-2, inhibiting the viral adsorption was due to the presence of the diads of β -D-galactose 2-sulfate linked to α -galactose 6-sulfate. This diad is structurally similar to the minimal sequence of the heparan sulfate for the interaction with glycoprotein C (gC) of HSV-1. Summarizing, the galactans biosynthesized by algae of the order Halymeniales investigated at present work are belong to the DL-hybrid type, with different diads of the classical carrageenans or agarans presents in the literature.

1-INTRODUÇÃO

1- INTRODUÇÃO

1.1- ALGAS VERMELHAS

As algas vermelhas (Rhodophyta) são as principais macrófitas marinhas, representando 27% de todas as espécies de plantas marinhas descritas. (PAINTER, 1983; USOV, 1992). São encontradas amplamente distribuídas ao longo da costa brasileira, porém os costões e fundos rochosos, bem como as áreas recifais, são as mais ricas em macroalgas, tanto em diversidade quanto em biomassa.

As algas vermelhas vêm sendo utilizadas pelo homem desde muitos anos em uma ampla variedade de produtos alimentícios, farmacológicos e industriais, bem como para fins biotecnológicos (LOBBAN; HARRISON, 1994). A composição polissacarídica das algas vermelhas é muito diferente das de outras plantas, e contêm usualmente galactanas sulfatadas como o principal constituinte estrutural da parede celular na matriz intercelular (PAINTER, 1983).

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

Como polissacarídeo de reserva as algas vermelhas contem um polímero constituído por α -D-glucose, denominado “amido das florídeas”, com ligações glicosídicas do tipo α -(1→4) e pontos de ramificação no carbono-6 similar à amilopectina (PAINTER, 1983), porém possui uma proporção maior de ramificações assemelhando-se ao glicogênio animal, e desta forma também apresenta uma coloração azul quando ensaiado com lugol.

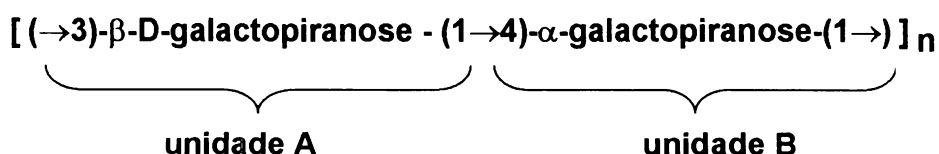
Algumas galactanas sulfatadas apresentam propriedades geleificantes e estabilizantes; estas são muito exploradas comercialmente devido a sua larga

aplicação industrial. Vários outros polissacarídeos não têm propriedades de interesse industrial, mas são muito promissores como compostos biologicamente ativos, como por exemplo, atividade antiviral (CARLUCCI et al., 1999; DUARTE et al., 2001, 2004; TALARICO et al., 2004), antitumoral (FERNÁNDEZ, et al., 1989) e antitrombótica (SEN et al., 2002). Além do interesse industrial, a determinação da estrutura química destes polissacarídeos pode também ser utilizada para elucidar a posição taxonômica das algas vermelhas, suplementando os critérios clássicos, como: morfologia, anatomia e ciclo de vida das algas (USOV, 1998).

1.2- GALACTANAS: ESTRUTURA GERAL

A importância de se estudar a estrutura química das galactanas isoladas de rodófitas, está em se correlacionar detalhes estruturais com propriedades físico-químicas ou atividade biológica apresentadas pelas mesmas (USOV, 1998).

Estruturalmente, as galactanas consistem de cadeias lineares de unidades de β -D-galactopiranosose ligados glicosidicamente através da posição 3 (unidade A) e α -galactopiranosose ligados glicosidicamente através da posição 4 (unidade B) (PERCIVAL; McDOWELL, 1967). Deste modo formam um arranjo alternado entre as unidades A e B $(AB)_n$.



Embora sua estrutura básica seja repetitiva, as galactanas apresentam grande diversidade estrutural, devido aos diferentes tipos de substituintes na cadeia principal, como por exemplo:

- A unidade A pode apresentar grupos éter metílico no carbono-6; grupos éster sulfato em carbono 2, 4 ou 6, ou ainda podem apresentar substituição por acetal de ácido pirúvico.

- A unidade B pode apresentar grupos sulfato ou éter metílico nos carbonos 2, 3 ou 6 ou estar totalmente ciclizada na forma de 3,6-anidrogactose. O anidro-açúcar pode apresentar seu carbono 2 substituído por sulfato ou éter metílico (PAINTER, 1983).

Estes substituintes, de diferentes tipos em diferentes posições originam moléculas de estruturas complexas.

1.3- GALACTANAS: CLASSIFICAÇÃO

As galactanas podem ser divididas em grupos conforme a configuração enantiomérica das unidades B (α -galactose). Estas unidades podem ser pertencentes a série L-, D- ou L- e D- caracterizando o grupo das agaranas, das carragenans e das galactanas do tipo DL-híbrida, respectivamente.

Para facilitar e homogeneizar a escrita das unidades dissacarídicas repetitivas das galactanas (díades), KNUTSEN et al. (1994) desenvolveram uma nomenclatura simbólica, na qual as unidades A (β -galactopirranose) são simbolizadas pela letra G, e as unidades B quando pertencentes ao grupo das carragenanas são simbolizadas pela letra D (α -D-galactopirranose) e DA (3,6-anidro- α -D-galactose), já as unidades B pertencentes ao grupo das agaranas são simbolizadas pela letra L (α -L-galactopirranose) e LA (3,6-anidro- α -L-galactose). As substituições por grupos metil, sulfato e xilose recebem um número correspondente ao carbono que está sendo substituído e as letras correspondentes ao tipo de substituinte M, S e X, respectivamente. Acetal de

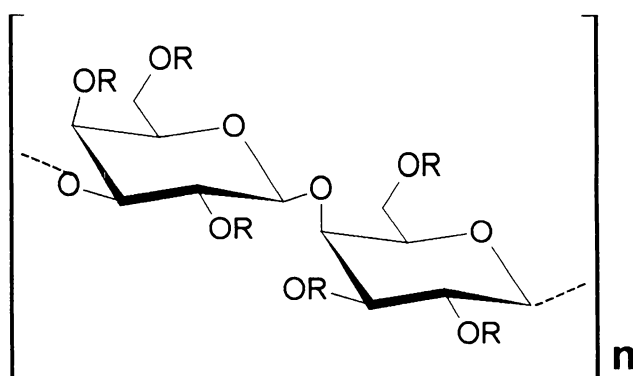
ácido pirúvico substituindo as unidades A são representados simbolicamente de GP.

No presente trabalho foi adotada a nomenclatura desenvolvida por KNUTSEN et al. (1994) para designar as unidades dissacarídicas encontradas nas galactanas estudadas.

1.3.1- GALACTANAS DO TIPO CARRAGENANAS

As carragenanas são constituídas de unidades alternantes de (1→3)-β-D-galactopiranosose (unidade A) e (1→4)-α-D-galactopiranosose (unidade B), sendo, portanto a estereoquímica da unidade B pertencente à série D- (Figura-1). Esta última unidade pode ser encontrada na forma totalmente ciclizada de 3,6-anidro-α-D-galactose, ou ainda na sua forma precursora de anidro-açúcar α-D-galactose 6-sulfato. Geralmente as carragenanas apresentam uma alta porcentagem de grupos sulfato e uma baixa porcentagem de grupos O-metil naturais (PAINTER, 1983).

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



R = H, SO₃⁻ ou CH₃

As carragenanas são tradicionalmente classificadas em 4 famílias, as quais levam um prefixo de uma letra do alfabeto grego, de acordo com a posição dos grupos sulfato nas unidades A e B e ciclização da unidade B (Tabela –1).

I - A família *Kappa* (κ), apresenta grupos sulfato no carbono-4 da unidade A.

II - A família *Lambda* (λ), com grupos sulfato no carbono-2 de ambas unidades.

III - A família *Beta* (β) compreende polissacarídeos em que a unidade A não é sulfatada.

IV - A família *Ômega* (ω), compreende galactanas que apresentam grupos sulfato no carbono 6 da unidade A.

A classificação apresentada na Tabela-1 corresponde a carragenanas com estruturas ideais, ou seja, formadas apenas por um dos tipos de unidades dissacarídicas repetitivas (díades ideais).

Ressalta-se, no entanto que na natureza as carragenanas podem conter um ou mais tipo de unidades repetitivas caracterizando o que denomina-se de carragenanas híbridas. Nestas por exemplo, podem ser observadas em uma mesma molécula estruturas repetitivas de *kappa*- e *iota*-carragenanas, em diferentes proporções (carragenana híbrida *kappa iota*).

Além da presença de diferentes tipos de “díades ideais” em uma mesma molécula, as carragenanas podem adicionalmente, ser constituídas por “díades desviantes”, como exemplo as carragenanas altamente metiladas (6-O-metil- β -D-galactose) em espécies do gênero *Rhabdonia* (17-31%) (CHIOVITTI et al., 1996) e do gênero *Clavicornium* (45%) (CHIOVITTI et al., 2004).

Embora substituições por grupos O-metil ou acetal de ácido pirúvico sejam mais freqüentes em galactanas do tipo agarana, as carragenanas de algas do gênero *Callophycus* (Gigartinales, Rhodophyta) apresentam alto teor de piruvatação (43-49%). É importante ressaltar, que a presença de acetal de ácido

pirúvico foi relatada pela primeira vez em galactanas do tipo agarana por HIRASE (1957).

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

Família	(→3)-β-D-Galp – (1→4) -α-D-Galp -(1→) (Unidade A) (Unidade B)	Nomenclatura de KNUTSEN et al. (1994)
KAPPA		
κ (kappa)	4-sulfato – 3,6-anidrogactose	G4S – DA
ι (iota)	4-sulfato – 3,6-anidrogactose 2-sulfato	G4S – DA2S
μ (mu)	4-sulfato – 6-sulfato	G4S – D6S
ν (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-anidrogactose 2-sulfato	G2S – DA2S
OMEGA		
ω (omega)	6-sulfato – 3,6-anidrogactose	G6S – DA
ψ (psi)	6-sulfato – 6-sulfato	G6S – D6S
BETA		
β (beta)	não-sulfatada – 3,6-anidrogactose	G – DA
α (alpha)	não sulfatada – 3,6-anidrogactose 2-sulfato	G – DA2S
γ (gamma)	não sulfatada – 6-sulfato	G – D6S
δ (delta)	não sulfatada – 2,6-dissulfato	G – D2,6S

As variações quanto ao tipo de carragenanas não ocorrem somente entre diferentes espécies de algas, mais também em diferentes estágios de vida de uma mesma espécie (FALSHAW et al., 2003a). O histórico de vida das Rhodophytas é geralmente trifásico, composto por fases gametofíticas (haplóide), carposporofítica (diplóide) e tetrasporofítica (diplóide), o que caracteriza um histórico de vida do tipo *Polysiphonia*. Nas famílias Gigartinaceae e Phyllophoraceae da ordem Gigartinales, 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).

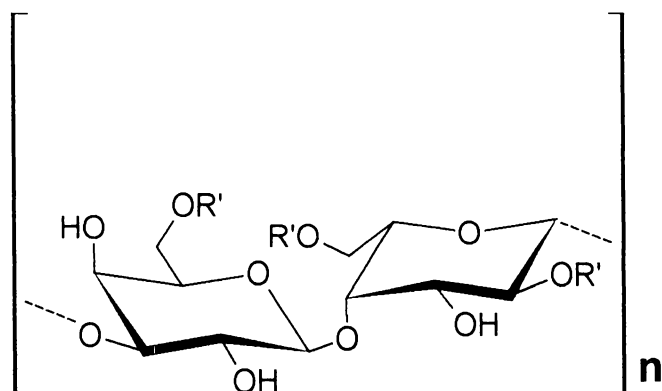
Nesse aspecto pode-se citar a espécie *Gigartina skottsbergii*, onde as plantas gametofíticas biossintetizam similares quantidades de *kappa/iota* e *mu/nu*-carragenanas (precursores da *kappa*- e *iota*-carragenana, respectivamente), enquanto as plantas tetraesporofíticas sintetizam somente *lambda*-carragenana (NOSEDA, 1994).

1.3.2- GALACTANAS DO TIPO AGARANAS

Este tipo de galactana apresenta a cadeia principal formada por unidades de (1→3)-β-D-Galp e (1→4)-α-L-Galp, portanto diferindo das carragenanas na estereoquímica da unidade B. Assim como nas carragenanas esta unidade pode estar na correspondente forma do seu derivado 3,6-anidrogactose (PAINTER, 1983) (Figura-2).

Nos primeiros estudos de fracionamento de agaranas ARAKI (1956) considerou que esta classe era composta por 2 componentes: agarose, que consiste de uma estrutura ideal repetitiva de [→3)β-D-galactose(1→4)α-L-3,6-anidrogactose(1→], e agarpectina que possui uma estrutura mais complexa contendo grupos substituintes ácidos como: sulfato e piruvato.

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



$R' = H, CH_3 \text{ ou } SO_3^-$

A classificação das agaranas não é bem definida como das carragenanas, no entanto algumas sistematizações foram elaboradas, em 1971, por DUCKWORTH e YAPHE, consideraram que as agaranas compreendem 3 tipos extremos de estrutura:

I - Agarose neutra possui estrutura linear e regular constituída por unidades alternadas de D-galactose (unidade A) e 3,6-anidro- α -L-galactose (unidade B) (ARAKI; HIRASE, 1960);

II - Agarose piruvatada, apresenta baixo grau de sulfatação, e ainda possui unidades de β -D-galactose substituídas por acetal de ácido pirúvico [4,6-O-(1'-carboxietilideno)].

III - Galactanas sulfatadas apresentam um aumento no grau de sulfatação da unidade B, baixa porcentagem de 3,6-anidrogallactose e de acetal de ácido pirúvico.

A agarose (unidades alternadas de D-galactose e 3,6-anidro- α -L-galactose, G – LA, na nomenclatura de KNUTSEN et al., 1994) é a agarana de maior valor

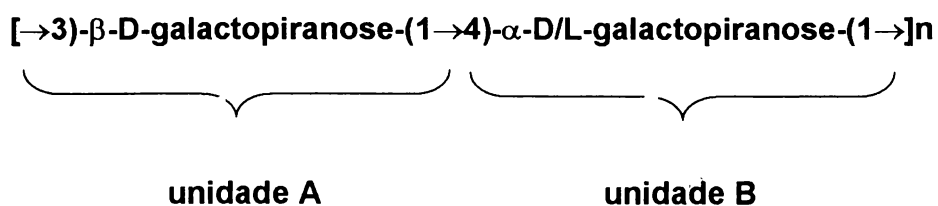
comercial com alta propriedade de geleificação. A presença de grupo substituinte nesta díade, como grupos sulfato, modifica as propriedades das agaranas diminuindo o poder de geleificação e assim diminuindo o valor comercial deste ficocolóide.

Embora algumas agaranas com estrutura clássica repetitiva, como no caso da agarose, sejam naturalmente obtidas, a maioria das espécies biossintetizam agaranas com uma grande dispersão estrutural. Portanto esta classificação é desatualizada.

Porfirana é o nome genérico, freqüentemente utilizado na literatura para designar as agaranas sulfatadas biossintetizadas por algas dos gêneros *Porphyra* e *Bangia* (ASPINALL, 1970). Estas apresentam grupos O-metil em C-6 das unidades A, e parte das unidades B se encontram sulfatadas em C-6 (NOSEDA et al., 2000).

1.3.3- GALACTANAS DO TIPO DL-HÍBRIDA

Além das carragenanas e agaranas, algumas ordens da divisão Rhodophyta, como por exemplo, na ordem Halymeniales, biossintetizam galactanas com uma estrutura entre agarana e carragenana, onde em uma mesma molécula estão presentes estruturas típicas de carragenanas e de agaranas (KNUTSEN et al., 1994). Este tipo estrutural foi denominado de carrágar por CHOPIN et al. (1999) e recentemente STORTZ e CEREZO (2000) adotaram o termo galactana do tipo DL-híbrida, para diferenciar do termo híbrido adotado para as carragenanas.



Esta classe de galactanas começou a ser relatada com maior frequência na década de 90, e até o presente momento vem se descobrindo um maior número de espécies que biossintetizam este tipo de galactana, possivelmente devido aos avanços nas metodologias utilizadas para a análise estrutural de polissacarídeos.

As galactanas do tipo DL-híbridas podem ser divididas de acordo com a proporção de unidades B pertencentes a série enantiomérica L-, em: DL-Híbrida com um predomínio da estrutura de carragenana e DL-Híbrida com um predomínio da estrutura de agarana.

Com o aparecimento desta classe de galactanas, e com os relatos da presença de mais de um tipo de galactana biossintetizado por uma mesma espécie, algumas denominações precisam ser reavaliadas. Uma denominação muito utilizada é o termo carragenófito, adotado para várias famílias da ordem Gigartinales, e agarófitas adotado para famílias das ordens Gracilariales e Gelidiales, pois se referem a algas produtoras apenas de carragenanas e agaranas, respectivamente. Algas da ordem Gigartinales, denominadas classicamente de carragenófitas, também biossintetizam pequenas quantidades de galactanas contendo L-galactose (CIANCIA et al., 1993; STORTZ et al., 1997). Tem sido recentemente relatado a presença de galactanas do tipo DL-híbridas em espécies pertencentes à ordem Ceramiales (TAKANO et al., 1999; TAKANO et al., 2003), classicamente denominadas de agarófitas. Desta forma os termos carragenófitas e agarófitas poderiam ser adotados para indicar o principal polímero biossintetizado pelas algas vermelhas.

Provavelmente novas pesquisas estruturais de galactanas, com um fracionamento minucioso, e determinação das unidades enantioméricas, levará ao reconhecimento de um maior número de galactanas do tipo DL-híbrida, ou mesmo de algas produtoras de espécies que sintetizam tanto agaranas quanto carragenanas. Este fato pode também ser aplicado para a re-análise das espécies utilizadas comercialmente como fonte de agaranas ou carragenanas (STORTZ; CEREZO, 2000).

1.4- ALGAS PRODUTORAS DE CARRAGENANAS

1.4.1- ORDEM GIGARTINALES

Na divisão Rhodophyta a ordem Gigartinales é a mais numerosa, sendo formada por 41 famílias, 100 gêneros e 700 espécies (CHOPIN et al., 1999).

Algas desta ordem são conhecidas como típicas produtoras de carragenanas, sendo algumas exploradas comercialmente como as do gênero: *Gigartina*, *Eucheuma* e *Hypnea*.

Como já mencionado anteriormente, algumas famílias da ordem Gigartinales (Phyllophoreaceae, Gigartinaceae e Petrocilidaceae) produzem diferentes tipos de polissacarídeos de acordo com os seus estágios de vida. As gametofíticas (n) produzem carragenanas da família *kappa*, enquanto que as esporofíticas (2n) biossintetizam carragenanas da família *lambda* (McCANDLESS et al., 1982). Estas famílias Phyllophoreaceae, Gigartinaceae e Petrocilidaceae da ordem Gigartinales fazem parte de um mesmo grupo dentro desta ordem.

Em outras famílias da ordem Gigartinales, como na Solieriaceae não há uma característica estrutural dos seus biopolímeros de acordo com a fase do histórico de vida da alga, formando assim um segundo grupo dentro da ordem Gigartinales. No gênero *Eucheuma* (família Solieriaceae), tanto a fase tetrasporofítica quanto a cistocárpica, biossintetizam carragenanas da família *kappa* (DOTY; SANTOS, 1978).

Ainda nesta família as diferentes fases do histórico de vida da espécie *Kappaphycus alvarezii* (antes conhecida como *Eucheuma cottonii*), também produzem *kappa*-carragenana. Esta espécie é cultivada em larga escala nas Filipinas, para extração industrial de *kappa*-carragenana, e no Brasil está sendo introduzida no litoral paulista (Ubatuba) e tem mostrado um crescimento promissor para cultivo comercial (DE PAULA et al., 2002).

De acordo com STORTZ e CEREZO (2000), um terceiro grupo estaria composto pelas famílias pertencentes à antiga ordem Cryptonemiales e agora incluídas na ordem Gigartinales (Tichocarpaceae, Endocladiaceae, Kallymenaceae e Dumontiaceae).

Na família Endocladiaceae, WHYTE et al. (1984), estudando a alga *Endocladia muricata*, identificaram um polissacarídeo, que após metanólise e análise por HPLC, era constituído principalmente por carrabiose [β -D-galactose-(1 $\rightarrow$ 4)-3,6-anidro- α -D-galactose], mas também com 6% de agarobiose [β -D-galactose-(1 $\rightarrow$ 4)-3,6-anidro- α -L-galactose]. Nesta mesma família, algas do gênero *Gloiopeltis*, têm sido classificadas como agarófitas, devido à caracterização dos seus polissacarídeos como agarana sulfatada, como por exemplo, em *G. cervicornis* (PENMAN; REES, 1978).

No entanto, na espécie *G. furcata*, TAKANO et al. (1998), caracterizaram um polissacarídeo com rotação óptica positiva e que por hidrólise parcial, originou oligossacarídeos com estrutura de carragenana, e outros com estrutura de agaranas.

De modo similar, de *G. complanata* TAKANO et al. (1995) isolaram um polissacarídeo com estrutura híbrida de carragenana e agarana. Já as espécies *G. coliformis* e *G. tenax*, são produtoras de carragenanas (CHOPIN et al., 1999). Estes estudos exemplificam a grande diversidade de tipos de galactanas sintetizadas por algas de um mesmo gênero.

De modo semelhante algas da família Kallymeniaceae, biossintetizam diferentes tipos de galactanas, como: agaranas, carragenanas e do tipo DL-híbrida (CHOPIN et al., 1999).

A galactana de *K. berggrenii* (MILLER; FURNEAUX, 1996) apresenta na sua unidade B, D- e L-galactose em uma relação de 3:1, e relativamente altas porcentagens de 3,6-anidrogalactose e seu derivado 2-O-metilado. Estes polissacarídeos apresentam ainda, galactose, 2-O-metilgalactose, 6-O-metilgalactose, xilose e acetal de ácido pirúvico (sinal de 25,0 ppm, no espectro de RMN de ^{13}C , referente ao grupo metil de acetal de ácido pirúvico). O padrão de

sulfatação, determinado por análise de metilação do polímero antes e após dessulfatação, demonstrou a presença de galactose 2- e 6-sulfato nas unidades A, bem como nas unidades B. Adicionalmente, parte das unidades B estão na forma de 3,6-anidrogallactose 2-sulfato. O padrão de sulfatação desta galactana, não foi completamente esclarecido, desde que foi ainda observado a presença dos derivados 6-O- e 2,6-di-O-metilgalactose entre os produtos de metilação do polímero nativo. Estes podem corresponder à galactose 2,4- e/ou 2,3- sulfato, e a galactose 4- e/ou 3- sulfato, respectivamente. Algas do gênero *Kallymenia* (*K. reniformis* e *K. westii*) (DESLANDES et al., 1990) (CHOPIN et al., 1994) sintetizam galactanas denominadas genericamente de aeodanas. As aeodanas apresentam uma estrutura majoritária de carragenana, porém com uma pequena porcentagem de α -L-galactose, grupos sulfato apenas nas unidades A, principalmente em C-2 e C-4, e grupos metoxil geralmente localizados em C-6 das unidades A e em C-2 das unidades B (USOV et al., 1980).

USOV e KLOCHKOVA (1992), por meio de um *screening* de cinco espécies da família Kallymeniaceae, analisando os rendimentos de carrabiose e/ou agarobiose, classificaram as algas *Beringia castanea* e a *Velatocarpus pustulosus* como agarófitas, *Callophyllis rhynchocarpa* como carragenófitas e *Callophyllis cristata* e a *Cirrulicarpus gmelini* como produtoras de galactanas do tipo DL-híbrida.

Foi constatado por CHOPIN et al. (1999), por meio da análise do espectro de infravermelho que as espécies: *Constantinea rosa-marina*, *C. subulifera*, *Cryptosiphonia woodii*, *Neodilsea borealis*, *N. natashae* e *N. yendoana* pertencentes à família Dumontiaceae, apresentavam no seu espectro bandas de absorção características de agarana e de carragenana; deste modo os autores classificaram estas espécies como produtoras de galactanas do tipo DL-híbrida. É importante ressaltar que a forma de análise não levou em conta a homogeneidade do material, o que dificulta uma classificação estrutural.

As descrições estruturais acima demonstram que espécies pertencentes à ordem Gigartinales biossintetizam diferentes tipos de galactanas, como: agaranas, carragenanas e do tipo DL-híbrida.

Embora esta grande variabilidade em biossintetizar diferentes tipos de galactanas seja mais acentuado nas famílias provenientes da antiga ordem Cryptonemiales, outras famílias típicas da ordem Gigartinales têm mostrado, com uma menor incidência, a presença de galactanas do tipo DL-híbrida. É importante ressaltar que estas galactanas "atípicas", não correspondem a seus principais polímeros. Como por exemplo, na família Phyllophoraceae, há dois relatos no gênero *Gymnogongrus* (*G. torulosus* e *G. griffithsiae*), da presença de galactanas tipo DL-híbrida (ESTEVEZ et al., 2001; FARIA, 2002), além do polissacarídeo majoritário (*kappa*-carragenana). ESTEVEZ et al. (2000 e 2004) mostraram que a espécie de grande interesse comercial *Kappaphycus alvarezii*, pertencente à família Solieriaceae, produtora de *kappa*-carragenana, também biossintetiza galactanas tipo DL-híbrida e agaranas. Estes dois últimos tipos de galactanas representam aproximadamente 14% do total de galactanas obtidas por extração aquosa à 90 °C.

Em resumo, o detalhado estudo dos polissacarídeos produzidos em menor proporção, demonstram que algas denominadas de carragenófitas também podem biossintetizar agaranas e/ou galactanas tipo DL-híbrida.

1.5- ALGAS PRODUTORAS DE AGARANAS

1.5.1- ORDEM GELIDIALES E GRACILARIALES

As ordens Gelidiales e Gracilariales são típicas produtoras de agaranas com baixa proporção de substituição, sendo seus polissacarídeos de interesse industrial.

A ordem Gracilariales é bem explorada economicamente, sendo as algas do gênero *Gracilaria* amplamente cultivadas. No Brasil os estados de Pernambuco e Paraíba são os pioneiros no cultivo de algas marinhas para exploração econômica, especialmente as do gênero *Gracilaria*, as quais ocorrem naturalmente na região.

Os polissacarídeos das algas da ordem Gracilariales são mais substituídos que os da ordem Gelidiales. Podem apresentar suas unidades A metiladas em C-6, piruvatadas ou sem substituição. Suas unidades B podem estar na forma de 3,6-anidrogactose 3,6-anidro-2-O-metilgactose, α -gactose, α -gactose 6-sulfato ou ainda α -gactose metilada em C-2 (MILLER, 1997).

A ordem Gelidiales apresenta 10 gêneros e aproximadamente 140 espécies (SANTELICES, 1990). A maioria das agaranas produzidas por algas desta ordem apresentam poucas substituições e temperatura de geleificação de 35°C.

O principal polímero obtido destas algas é a agarose (unidades alternates de β -D-galactopirranose e 3,6-anidro- α -L-galactopirranose), podendo aparecer quantidades variadas de α -L-galactopirranose 6-sulfatada.

A agarana de *Gelidium amansii* apresentou traços de α -L-galactose metilada em C-4, β -D-galactose 6-O-metilada e também a presença de unidades substituídas por xilose (ARAKI; HIRASE, 1960). IZUMI (1971) mostrou a presença nesta mesma espécie de frações contendo baixas porcentagens de sulfato (2,4% e 0,94%) e acetal de ácido pirúvico (1% e 6%).

Baixos percentuais de piruvatação das unidades A, e unidades B sulfatadas em C-6 foram encontradas nas espécies *Gelidium serrulatum* e *Gelidium floridanum* (LEMUS et al., 1991).

1.5.2- ORDEM CERAMIALES

De modo diferente das agaranas sintetizadas pelas das ordens anteriormente citadas, as quais apresentam estruturas relativamente simples, as da ordem Ceramiales têm grande complexidade estrutural.

O polissacarídeo da espécie *Laurencia pinnatifida* apresenta um padrão de substituição complexo, suas unidades A são na maioria sulfatadas em C-2 e as unidades B são encontradas na forma de α -L-galactose metiladas em C-2 ou sulfatadas em C-6, e na forma de 3,6-anidrogalactose que podem estar metiladas em C-2 (BOWKER; TURVEY, 1968).

USOV et al. (1989), estudando as galactanas de quatro espécies de *Laurencia* (*L. coronopus*, *L. nipponica*, *L. obtusa* e *L. papillosa*), demonstrou que as unidades A desta galactana podem estar metiladas, sulfatadas ou não substituídas em C-6. As unidades B são constituídas por 3,6-anidrogalactose ou α -L-galactose (metiladas ou não em C-6).

Da espécie *Laurencia nipponica*, USOV e ELASHVILI (1991) obtiveram por hidrólise redutiva parcial oligossacarídeos que confirmavam o trabalho anterior, e um dissacarídeo composto por unidade A sulfatada em C-2 que não havia sido descrito anteriormente.

MILLER et al. (1993) mostraram que o polissacarídeo de *Laurencia thyrsofera* também apresenta unidades A sulfatadas em C-2 e em C-6, não sulfatadas, ou substituídas por acetal de ácido pirúvico.

Padrão estrutural totalmente diferente aos de *Laurencia*, foi identificado na agarana sulfatada e piruvatada de *Acanthophora spicifera*. Esta apresenta unidades A substituídas por grupos sulfato em C-2 (28-30%), sulfato em C-2 e acetal de ácido pirúvico (9-15%) ou somente por acetal de ácido pirúvico (5-8%). Adicionalmente unidades A apresentam baixas porcentagens de grupo sulfato ou metil, ou não substituídas neste carbono. As unidades B são formadas principalmente por 3,6-anidro- α -L-galactose (15-16%) e α -L-galactose 6-sulfato

(10-17%) junto com menores proporções de 3,6-anidro- α -L-galactose 2-sulfato, α -L-galactose 2,6-dissulfato, α -L-galactose 2,3,6-trissulfato, α -L-galactose 2,6-dissulfato com xilose em C-3, 2-O-metil- α -L-galactose e α -L-galactose não substituída (DUARTE et al., 2004).

Bostrychia montagnei, sintetiza também uma agarana sulfatada e metilada de grande complexidade estrutural. Análises químicas e espectroscópicas demonstraram a presença de grande número de substituintes em diferentes posições, tanto nas unidades A como B (DUARTE et al., 2002). A agarana sulfatada desta espécie apresenta particularidades estruturais como a presença da β -D-galactopiranosose 4-sulfato e α -L-galactopiranosose 3-sulfato. Estes substituintes não são comuns a agaranas. A presença de unidade B sulfatada em C-3 não é comum em polissacarídeos de algas vermelhas (MILLER et al., 1996). Este tipo de unidade impede o processo de ciclização, determinando assim que o teor de 3,6-anidrogalactose nestas moléculas seja pré-estabelecido.

Outras espécies da família Rhodomelaceae apresentam principalmente substituição por grupos metil em C-6 das unidades A (*Osmundaria colensoi* e *Bryothamnion triquetrum*) (FERNÁNDEZ et al., 1987).

De modo similar as galactanas da família Rhodomelaceae, na família Ceramiaceae foi encontrado uma galactana extremamente complexa biossintetizada pela espécie *Ceramium rubrum*. Esta apresenta unidades A sulfatadas, metiladas ou não substituídas em C-6. Foi ainda relatada a possibilidade destas unidades apresentarem sulfato em C-2 e/ou C-4. As unidades B desta galactana podem estar na forma de 3,6-anidrogalactose metilado em C-2 ou não substituído, α -L-galactose metiladas em C-2, sulfatadas em C-6 ou ainda sem substituição, (TURVEY; WILLIAMS, 1976).

Na ordem Ceramiales duas espécies (*Rhodomela larix* e *Digenea simplex*) são relatadas como produtoras de galactanas do tipo DL-híbrida (TAKANO et al., 1999 e 2003).

Deste modo, galactanas do tipo DL-híbrida estão presentes tanto em algas tipicamente produtoras de carragenanas (Gigartinales) como de agaranas (Ceramiales).

1.6- ALGAS PRODUTORAS DE GALACTANAS DO TIPO DL-HÍBRIDAS

1.6.1- ORDENS RHODYMENIALES E PLOCAMIALES

Nos polissacarídeos da espécie *Lomentaria catenata* (Rhodymeniales) foram observadas estruturas de agarana e de carragenana, sugerindo uma galactana do tipo DL-híbrida com predomínio de agarana (TAKANO et al., 1994).

Champia novae-zelandiae (Rhodymeniales), também é produtora de uma galactana do tipo DL-híbrida com predomínio de agarana. Este polímero apresenta sulfato em C-2 de ambas unidades e em C-3 das unidades B. Este foi o primeiro relato da presença de unidades B sulfatadas em C-2 e C-3 (MILLER et al., 1996). A presença de galactanas do tipo DL-híbrida sulfatadas em C-2 (unidade A) em algas da ordem Rhodymeniales, podem estar correlacionadas com as galactanas de espécies da ordem Halymeniales (MILLER, 1997). SAUNDERS e KRAFT (1996), consideraram as ordens Rhodymeniales e Halymeniales filogeneticamente correlacionadas. STORTZ e CEREZO (2000), argumentam que as coincidências estruturais de seus polissacarídeos podem ser levadas em consideração, para um futuro estudo taxonômico.

Na ordem Plocamiales, a galactana sulfatada da espécie *Plocamium costatum* apresentou quantidades equivalentes de unidades B na configuração enantiomérica D- e L-, porém não foi possível concluir se ambas pertencem a uma mesma molécula, ou ocorrem em moléculas separadas, por não terem purificado o material (FALSHAW et al., 1999).

1.6.2- ORDEM HALYMENIALES

A antiga ordem Cryptonemiales *sensu* KYLIN (1956) juntamente com a ordem Gigartinales compreendiam 60% das famílias da divisão Rhodophyta, tendo suas representantes uma maior complexidade anatômica dentre as rodófitas. Uma íntima relação entre alguns taxons destas ordens sempre foi notada, porém a separação em duas ordens era mantida. Um ponto de importância taxonômica que define a ordem é a posição de uma célula auxiliar, que é denominada acessória para Cryptonemiales e não acessória para Gigartinales. A diferenciação da célula generativa segundo KRAFT e ROBINS (1985) é difícil, e baseados neste problema, provisoriamente uniram a ordem Cryptonemiales a Gigartinales.

SAUNDERS e KRAFT em 1996, sequenciaram o gene 18S do rRNA de representantes das famílias de Dumontiaceae, Endocleriaceae, Halymeniaceae, e Kallymeniaceae (ordem Cryptonemiales *sensu* KYLIN, 1956), e das famílias de Mychodeaceae, Phyllophoraceae, Schizymeniaceae, e Sebdeniaceae (ordem Gigartinales). Os autores usaram estes dados moleculares para validar a junção taxonômica da ordem Cryptonemiales à ordem Gigartinales, como proposta por KRAFT e ROBINS, com exceção das famílias Halymeniaceae e Sebdeniaceae, as quais passaram a formar uma nova ordem (Halymeniales).

A seguir serão descritas características estruturais de alguns polissacarídeos da ordem Halymeniales, incluído as galactanas do tipo DL-níbridas (mesmo que não tenham recebido anteriormente esta denominação).

A família Halymeniaceae (antiga família Grateloupiaceae e Cryptonemiaceae da ordem Cryptonemiales), se encontra atualmente como membro da ordem Halymeniales (Tabela-2).

As algas pertencentes a esta família biossintetizam galactanas semelhantes a carragenanas, porém com L-galactose em baixas porcentagens, variáveis graus de metoxilação e padrões incomuns de sulfatação (STORTZ; CERREZO, 2000). Deste modo, vem sendo observada uma grande heterogeneidade química nestas galactanas.

Dentre estas, foram isolados polissacarídeos denominados aeodanos, λ -carragenana além de galactanas do tipo DL-híbrida.

Os aeodanos foram obtidos pela primeira vez de algas do gênero *Aeodes* (NUNN; PAROLIS, 1968 e ALLSOBROOK et al., 1971, 1974), e sua estrutura geral nunca foi claramente estabelecida. Segundo USOV et al. (1980), os aeodanos possuem uma estrutura básica de carragenana, porém com uma pequena porcentagem de α -L-galactose, os grupos sulfato se localizam apenas nas unidades A, principalmente em C-2 e C-4, e os grupos metoxil estão localizados em C-6 das unidades A e em C-2 das unidades B.

De acordo com PAROLIS (1981), as aeodanas do gênero *Aeodes*, bem como as isoladas de *Phyllymenia hieroglyphica*, apresentam predominância de ligações (1 $\rightarrow$ 3). Uma estrutura não alternante para galactanas de algas marinhas não foi até a presente data comprovada, desde que nenhum oligossacarídeo sem estrutura alternante foi isolado.

O gênero *Pachymenia* é representado por várias espécies, cujos polissacarídeos apresentam grande complexidade estrutural. A galactana sulfatada, isolada de *Pachymenia lusoria*, é constituída por galactose, 6-O-metilgalactose, 2-O-metilgalactose, 3,6-anidrogallactose, 3,6-anidro-2-O-metilgalactose e xilose (43; 21; 18; 10; 5 e 3 mol%, respectivamente) (MILLER et al., 1995). A configuração absoluta das unidades de galactose foi determinada na forma de (+)-2-butil-glicosídeos, seguida de análise por cromatografia líquida gasosa. Enquanto as unidades dos monossacarídeos, 6-O e 2-O-metilgalactose, pertencem exclusivamente a série D-, as unidades de D- e L-galactose estão em uma proporção de aproximadamente 4:1.

TABELA-2 CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS DE GALACTANAS EXTRAÍDAS DE ESPÉCIES DA ORDEM HALYMENIALES.

Espécies	Sulfato (%)	[α] _D	G2S	AG (%)	2AG (%)	2Gal/ 4Gal/ 6Gal	Gal D : L	Unidade B (D e L)	Xil	Ac Pir (%)	Tipo de galactana
<i>Grateluopia lanceola</i> ¹	30,0	+54,9	+	10,2	-	+ / - / +	50,5	nd	nd	nd	λ-carragenana
<i>G. divaricata</i> ²	21,0	+41,9	nd	7,1(L)	-	nd	4:1	+	+	nd	λ- carragenana + agarana
<i>G. elliptica</i> ³	25,0	+45,0	nd	8,1(D)	tr (L)	+(L) / +(D)/ -	9:1	+	+	2,92	κ- e λ-carragenana
<i>G. filicina</i> ⁴	20,4	nd	+	3,7	-	nd	+	nd	nd	0,18	λ- e π-carragenana
<i>G. indica</i> ⁵	17,25	+62,0	nd	1,8	-	nd	+	nd	nd	nd	λ- carragenana
<i>G. indica</i> ⁶	20,3	+47,0	nd	15(D) 3(L)	-	-	1:1,8	+	tr	nd	DL-Híbrida
<i>G. turuturu</i> ⁷	26,0	+32,1	nd	3(L)	-	+ / + / +	4:1	+	+	2,9	λ- carragenana + agarana
<i>Pachymenia lusoria</i> ⁸	nd	nd	+	10(L)	5,2	+(D)/ - / +(D)	4:1	+	+	+	
<i>P. hymentophora</i> ⁹	nd	nd	+	4(D)	-		+	nd	tr	nd	Aeodana
<i>P. carnea</i> ¹⁰	32,5	+70,0	+	1,4	-	+(D)/ +(D e L)/+(D)	+	+	-	nd	Aeodana
<i>P. crassa</i> ¹¹	nd	nd	nd	4	10,9	+ / - / +	+	nd	-	nd	
<i>Aeodes ulvoidea</i> ¹²	19,9	+34,0		1,4	-	+(D)/ +(L)/ +(D)	+	+	tr	+	Aeodana
<i>A. orbitosa</i> ¹³	nd	+79,0	+	0,1	-	+(D)/ +(L)/ +	58	nd	+	nd	Aeodana+ λ-carragenana
<i>Phyllymenia comea</i> ¹⁴	19,6	+63,3	+	0,4 – 0,56	-	+(D)/ + (L)/ +(D)	+	+	+	+	Philimenana
<i>P. hieroglyphica</i> ⁹	20,5	+44,0	+	<1	-	-	+	nd	nd	nd	Aeodana
<i>Halymenia ceylaica</i> ¹⁵	34,3	nd	nd	7,0	-	nd	nd	nd	+	0,417	
<i>H. porphyroides</i> ⁵	23,4	+56,3	nd	2,95	-	nd	nd	nd	nd	nd	λ-carragenana
<i>H. venusta</i> ¹⁶	29,8	+72,5	nd	5,08	-	nd	nd	nd	nd	nd	λ -carragenana
<i>Cryptonemia crenulata</i> ¹⁷	25,6	+25,6	nd	14,5	-	nd	nd	nd	nd	nd	ι-carragenana
<i>C. crenulata</i> ¹⁸	28,3	+23,5	+	15,8	8,6	+ (D e L)/ - / -	10,6:1	+	+	2,8	DL-Híbrida

G2S = β-D-galactose 2-sulfato, AG = 3,6-anidrogallactose, 2AG = 3,6-anidro-2-O-metilgalactose, 2Gal = 2-O-metilgalactose, 4Gal = 4-O-metilgalactose, 6Gal = 6-O-metilgalactose, Gal D:L = D-galactose : L-galactose, Xil = xilose e Ac Pir. = ácido pirúvico ¹BAEZA e MATSUHIRO (1977), ²USOV et al (1980); ³HIRASE et al (1967), HIRASE e WATANABE (1972); ⁴ZABACKIS e PEREZ (1990); PARK et al (1976); ⁵PAREKH et al , 1989; ⁶SEN et al (2002); ⁷USOV et al. (1975), ⁸MILLER et al (1995); ⁹PAROLIS (1981); ¹⁰FARRANT et al. (1971 e 1972), PAROLIS (1978); ¹¹MILLER et al. (1997); ¹²ALLSOBROOK et al. (1971 e 1974), ¹³NUNN e PAROLIS (1968); ¹⁴NUNN e PAROLIS (1970), ¹⁵LAI et al (1994); ¹⁶PAREKH et al (1987); ¹⁷SAITO e OLIVEIRA (1990); ¹⁸ZIBETTI, 2001.

Embora atualmente a configuração absoluta, das unidades de 3,6-anidrogactose, possa ser determinada utilizando derivado quiral, ERREA et al., (1998), MILLER et al. (1995), através da hidrólise reductiva parcial obtiveram oligossacarídeos contendo este anidroaçúcar. Neste tipo de hidrólise, há clivagem preferencial das ligações glicosídicas das unidades de 3,6-anidrogactose, as quais são transformadas em 3,6-anidrogactitol. Por este método, foi isolado de *P. lusoria*, apenas agarobiitol (dissacarídeo contendo D-gactose-(1→4)-3,6-anidro-L-gactitol), e não carrabiitol (dissacarídeo contendo D-gactose-(1→4)-3,6-anidro-D-gactitol). A presença de 3,6-anidro-L-gactose, foi ainda confirmada por análise de RMN de ^{13}C , pela presença do sinal 98,2 ppm, característico destas unidades quando pertencentes a série enantiomérica L- (USOV et al., 1980). Grupos sulfato estão localizados em C-2 de todas as unidades de β -D-gactopirranose, as quais estão parcialmente substituídas por grupos metil ou acetal de ácido pirúvico. A unidade B deste polímero é constituída principalmente por 2-O-metil-D-gactose (~50%), D-gactose (~25%) e L-gactose (~25%).

Posteriormente, MILLER et al. (1997), analisaram a composição monossacarídica e os espectros de RMN dos polissacarídeos de *P. lusoria*, coletada no sul e no norte da Nova Zelândia. Os polissacarídeos das algas coletadas no norte apresentam espectros de RMN e composição monossacarídica similares, com 12-17% de 2-O-metilgactose. O teor deste derivado nas amostras do sul foi menor (2-6%), levando os autores à conclusão de que as amostras do sul e do norte são espécies distintas. Este estudo permitiu avaliar, que os polissacarídeos da espécie denominada de *P. laciniata*, (coletadas no norte e no sul), são idênticas as correspondentes *P. lusoria* coletadas no mesmo local. Estes resultados de composição monossacarídica de gactanas podem auxiliar na classificação de espécies de algas marinhas, que apresentem problemas de definição taxonômica.

Espécies como *P. crassa* e *P. carnosa*, que são bem definidas taxonomicamente, apresentaram composição monossacarídica diferenciada, de acordo com o derivado metilado, 6-O-metilgactose (20,9 e 9,5 mol%,

respectivamente), (MILLER et al., 1997). Enquanto os polissacarídeos, das espécies de *Pachymenia* relatadas anteriormente apresentam grupos O-metil, os de *P. hymantophora* (PAROLIS, 1981), são desprovidos deste tipo de substituinte. Neste caso, a análise de composição monossacarídica é um fator importante em termos taxonômicos.

Os polissacarídeos da *Pachymenia carnos*a foram extensivamente estudados. Nos primeiros estudos desta espécie, FARRANT et al. (1972) consideraram que a galactana sulfatada apresentava uma estrutura alternante. Posteriormente fundamentado nos resultados de metilação, PAROLIS (1978), concluiu que havia um predomínio das ligações (1→3). Esta conclusão foi baseada assumindo que o derivado 2,6-di-O-metilgalactose era proveniente das unidades glicosidicamente ligadas em C-3 e sulfatadas em C-4. A análise de metilação do correspondente polímero, dessulfatado por metanólise ácida, apresentou aproximadamente iguais quantidades de 2,4,6- e 2,3,6-tri-O-metilgalactose. No entanto, o autor ressalta que as unidades 3-O-substituídas, são mais susceptíveis a hidrólise por metanol-HCl, o que justificaria iguais quantidades de unidades 3- e 4-O-substituídas no polímero dessulfatado.

Os polissacarídeos isolados de algas do gênero *Grateloupia* são ricos em unidades de L-galactose, e nestes, parte das unidades B, se encontram como 3,6-anidrogallactose. Embora apresentando relativamente alta porcentagem de L-galactose, há nos polissacarídeos de algas deste gênero predominância do isômero D- (USOV; BARBAKADZE, 1978). Tal fato é explicado pelos referidos autores devido à presença de blocos de agaranas e carragenanas na mesma molécula. Ressalta-se, no entanto que nenhum oligossacarídeo de estrutura DL-híbrida como, por exemplo, do tipo D-L-D-D, foi isolado até a presente data, muito provavelmente devido à estrutura em blocos proposta por USOV e BARBAKADZE, (1978) e por STORTZ e CERREZO (2000).

A espécie *G. filicina* é utilizada como alimento, no Hawaii e na Coreia. ZABACKIS e PEREZ (1990), utilizando algas desta espécie, coletadas no Hawaii, isolaram uma galactana que apresentou 3,6-anidrogallactose (3,7%), ácido pirúvico

(0,18%) e sulfato (20,4%). Através da análise do espectro de infravermelho desta galactana, os autores concluíram que a mesma apresentava características similares a uma λ -carragenana. Estes autores ressaltam que o polissacarídeo desta espécie, estudado por PARK et al. (1976), as quais foram coletadas na Coréia, apresentavam 20,3% de 3,6-anidrogactose. Tal diferença numa mesma espécie é contestada por CHOPIN et al. (1994), que sugerem um estudo mais detalhado dos polissacarídeos pertencentes a esta espécie, com uma exata classificação taxonômica.

Recentemente SEN et al. (2002), caracterizaram uma galactana do tipo DL-híbrida, na espécie *Grateloupia indica*, através da análise do produto da metanólise parcial do polissacarídeo nativo onde encontraram uma proporção de carrabiose: agarobiose de 1:0,21, e também por determinação de D- e L-gactose no polímero dessulfatado e metilado (D:L = 1:0,48), consistente com uma galactana constituída por estruturas de agarana e carragenana. Este polímero ainda apresentou uma potente atividade anticoagulante (SEN et al., 1994). É importante ressaltar que anteriormente o polissacarídeo biossintetizado pela mesma espécie *G. indica* foi classificada como uma galactana do tipo *lambda*-carragenana (PAREKH et al., 1989); no entanto neste estudo o polímero foi analisado apenas por espectroscopia de infravermelho e dosagem colorimétrica do teor de 3,6-anidrogactose e sulfato.

SAITO e OLIVEIRA (1990), preocupados com a produção de carragenanas no Brasil, uma vez que o país importa 200 toneladas de carragenanas por ano, realizaram um *screening* das algas encontradas na costa brasileira. Neste trabalho, a alga *Cryptonemia crenulata*, também pertencente à família Halymeniaceae, foi classificada como produtora de *iota*-carragenana. Esta conclusão foi baseada apenas em dados de espectroscopia de infravermelho, determinação fotolorimétrica do teor de 3,6-anidrogactose e sulfato. É importante ressaltar que este foi o único trabalho que relata a presença de uma *iota*-carragenana na antiga ordem Cryptonemiales. Recentemente, nesta espécie

citada, foi parcialmente caracterizada uma galactana sulfatada do tipo DL-híbrida (ZIBETTI, 2001) (Tabela-2, pág. 21).

Com base nos estudos estruturais descritos anteriormente com diferentes espécies da ordem Halymeniales, pode-se observar que, além de agaranas e carragenanas com distintas características estruturais, várias espécies desta ordem biossintetizam polissacarídeos do tipo DL-híbrida, onde em uma mesma molécula são encontradas estruturas típicas de carragenanas e agaranas. Tal fato não foi observado, pelo menos com frequência, em espécies pertencentes a outras ordens de rodófitas. As galactanas do tipo DL-híbrida da ordem Halymeniales apresentam algumas características estruturais que são notadas com grande frequência (Tabela-2) como: a presença de β -D-galactose 2-sulfato, presença de unidades de α -galactose e/ou 3,6-anidro- α -galactose nas configurações L- e D-, as quais podem estar metiladas em carbono-2.

Tal fato demonstra a necessidade da realização da estrutura química fina dos polissacarídeos das algas pertencentes a esta ordem.

Ao analisar a presente descrição estrutural de galactanas de diferentes ordens, é possível claramente observar que determinadas ordens biossintetizam como polímero principal galactanas do tipo DL-híbrida, porém em outras ordens conhecidas como típicas produtoras de carragenanas ou agaranas, também foi relatada, com uma menor incidência a presença destas galactanas do tipo DL-híbrida.

A variedade estrutural destes ficocolóides, dependendo da espécie é considerada como um importante indicador taxonômico da filogenia das rodófitas. Desta forma, algumas revisões (MILLER, 1997; CHOPIN et al., 1999; STORTZ; CEREZO, 2000) têm mostrado uma importância quimiotaxonômica dos polissacarídeos isoladas das algas vermelhas, bem como apontam a necessidade de estudos estruturais mais detalhados.

1.7- APLICAÇÃO DAS GALACTANAS SULFATADAS

1.7.1- APLICAÇÃO INDUSTRIAL

As algas marinhas apresentam uma grande importância econômica, pois fazem parte da dieta alimentar principalmente nos países orientais, bem como podem ser diretamente utilizadas como fertilizantes (VAN DEN HOEK et al., 1989).

As galactanas sulfatadas são conhecidas como ficocolóides, devido a suas propriedades geleificantes e viscosantes em sistemas aquosos.

As carragenanas são amplamente utilizadas na indústria alimentícia, na produção de diversos produtos como: geléias, carnes processadas, gelatinas, produtos derivados do leite, clarificante de cerveja, entre outros. Também podem ser usadas pelas indústrias têxtil, petroquímica, de papel e farmacêutica (DE RUITER; RUDOLPH, 1997).

As agaranas são comercialmente obtidas a partir de espécies como *Porphyra*, *Gelidium*, *Pterocladia* e *Gracilaria*, as quais são amplamente utilizadas na alimentação e tecnologia: indústria farmacêutica e alimentícia, entre outras (LEE, 1989). No Japão ocorre a maior produção mundial de agaranas.

A habilidade destes polímeros (agaranas e carragenanas) em formar géis e soluções viscosas está diretamente relacionada com a conformação estrutural do polissacarídeo e esta com a presença de unidades de 3,6-anidrogactose (USOV, 1984).

Este monossacarídeo é unicamente encontrado em galactanas de algas vermelhas, distinguindo-os dos demais polissacarídeos biossintetizados por outros grupos vegetais (USOV, 1984). As unidades anidrogactosídicas são formadas naturalmente na alga através da atividade da enzima sulfohidrolase a partir de unidades precursoras de galactose 6-sulfato e/ou galactose 2,6-dissulfato (LAWSON; REES, 1970; WONG; CRAIGIE, 1978; McCANDLESS; CRAIGIE, 1979; ZINOUN et al., 1997).

As unidades 3,6-anidrogalactosídicas podem também ser obtidas quimicamente, através de tratamento alcalino, onde em meio básico o grupo sulfato é liberado num processo de eliminação seguido pela formação do anel 3,6-anidro, com a perda de uma molécula de água, caracterizando uma reação de substituição nucleofílica bimolecular (S_N2), denominada reação de ciclização alcalina (CIANCIA, 1994).

As unidades de α -galactose passam de uma conformação $^4C_1$ para $^1C_4$ em carragenanas, e de $^1C_4$ para $^4C_1$ em agaranas (CIANCIA, 1994). Esta mudança aproxima o oxigênio da hidroxila do C-3 e o sulfato no C-6, favorecendo o ataque nucleofílico.

Desta forma, o estudo da cinética química da reação de ciclização, permite determinar a velocidade de ciclização destas unidades precursoras. Esta reação alcalina promove um aumento do poder geleificante do polissacarídeo, podendo fornecer dados importantes, para que, em nível industrial, este tratamento químico seja feito de maneira adequada (temperatura e tempo).

Além de ser um processo de importância industrial, o tratamento alcalino pode ainda ser utilizado para caracterização estrutural das galactanas. Neste âmbito pode ser utilizada para a quantificação de unidades precursoras na molécula nativa, bem como pode sugerir a presença de substituintes em diferentes posições, os quais influenciam a velocidade de ciclização.

Como exemplo do efeito de grupos sulfato sobre a velocidade de ciclização, podem ser citadas as carragenanas da família *lambda* (unidade A sulfatada em C-2) as quais apresentam uma velocidade de ciclização mais lenta do que as carragenanas da família *kappa* (unidade A sulfatada em C-4). A presença de grupos sulfato em C-2 das unidades A (*lambda*-carragenana) protegem a ionização das hidroxilas do C-3 das unidades precursoras, dificultando a ciclização (CIANCIA et al., 1993, NOSEDA; CERREZO, 1995).

1.7.2- APLICAÇÃO BIOLÓGICA

Além da aplicação nos diferentes setores da indústria, as galactanas sulfatadas são promissoras na área biomédica, devido às propriedades biológicas apresentadas. Entre estas, podemos destacar a atividade anticoagulante (CARLUCCI et al., 1997), antitumoral, anti-angiogênica (SATORU et al., 2003), antiviral (DAMONTE et al., 1996, PUJOL et al., 1996, CÁCERES et al., 2000, DUARTE et al., 2004,) e atividade antidengue (DAMONTE et al., 2002).

As galactanas sulfatadas podem apresentar potente atividade antiviral contra diversos vírus envelopados como o vírus herpes simplex (HSV), vírus da imunodeficiência humana (HIV) e citomegalovírus, dependente da sua estrutura química fina. Fatores importantes como grau de sulfatação e principalmente o posicionamento destes substituintes no polímero, permite uma conformação adequada, as quais são essenciais para a inibição do processo de infecção viral.

O herpes simplex vírus tipo 1 (HSV-1) é capaz de infectar e de contaminar uma ampla variedade de células humanas. A infecção é mediada por glicoproteínas do envelope viral, as quais possuem específicas funções. A infecção envolve a ligação do vírus na membrana da superfície da célula (etapa de adsorção viral), seguida pela penetração do vírus e entrada do nucleocapsídeo no citoplasma.

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., 1995). 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.

A substituição por grupos sulfato em polissacarídeos é essencial para atividade anti-HSV-1 (CARLUCCI et al., 1997, DUARTE et al., 2001).

Em colaboração com o grupo de Virologia do Departamento de Química Biológica da Universidade de Buenos Aires, tem sido avaliada 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 μ g/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 assim a entrada do vírus. 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; SPEAR, 1989; LYCKE et al., 1991; SHIEH et al., 1992).

FREYZI et al. (1997) demonstraram que a mínima seqüência na interação do HS com a glicoproteína gC do HSV-1 é a seqüência $[\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-L-(}^1\text{C}_4\text{)-IdoA2-OSO}_3\text{-(1}\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-(}^4\text{C}_1\text{)-GlcNR6'-OSO}_3\text{-(1}\rightarrow]$ com no mínimo 10-12 unidades repetitivas. O padrão médio de sulfatação das agaranas de *A. spicifera* é similar à mínima seqüência do HS $[\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-L-(}^4\text{C}_1\text{)-Galp2-OSO}_3\text{-(1}\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-L-(}^1\text{C}_4\text{)-Galp6'-OSO}_3\text{-(1}\rightarrow]$, o qual pode ser responsável pela formação do complexo polissacarídeo-gC (DUARTE et al., 2004).

Portanto, a determinação da estrutura química fina destes polímeros naturais é muito importante, tanto para a correta aplicação industrial nos diferentes setores da indústria, quanto para o estudo das atividades biológicas ou ainda sob o aspecto de caráter taxonômico.

2-OBJETIVOS

2- OBJETIVOS

2.1- OBJETIVO GERAL

Este trabalho tem como objetivo geral o estudo dos polissacarídeos solúveis em meio aquoso biossintetizados por diferentes espécies de algas vermelhas da ordem Halymeniales.

2.2- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Extração e purificação dos polissacarídeos solúveis em meio aquoso (à 25 °C e a 80 °C).
2. Determinação da massa molecular média dos principais polissacarídeos homogêneos por cromatografia de gel permeação (HPSEC-MALLS).
3. Despolimerização parcial dos polissacarídeos homogêneos.
4. Determinação da estrutura química fina dos principais polissacarídeos e dos seus respectivos produtos parcialmente despolimerizados, por métodos químicos e espectroscópicos.
5. Estudo comparativo da cinética de ciclização dos principais polissacarídeos.
6. Correlacionar a atividade antiherpética com a estrutura química das galactanas de *Cryptonemia crenulata*.
7. Comparação dos resultados de análises estruturais dos polissacarídeos das diferentes espécies, visando determinar se há, ou não um padrão de substituição característico para as galactanas isoladas de algas pertencentes à ordem Halymeniales.

3-MATERIAIS E MÉTODOS

3- MATERIAIS E MÉTODOS

3.1- MÉTODOS ANALÍTICOS GERAIS

3.1.1 A dosagem de açúcar total foi realizada pelo método do fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS et al. 1956), com sensibilidade entre 10-100 µg, utilizando-se como padrão galactose na concentração de 70 µg/mL. A leitura foi realizada no comprimento de onda de 490 nm.

3.1.2 As dosagens de proteínas foram realizadas pelo método de LOWRY et al. (1951), utilizando-se o reativo de Folin-Ciocalteu e solução de soroalbumina 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.

3.1.3 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 será solubilizado na gelatina) assim formará sulfato de bário que fica suspenso neste fluido. 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.

3.1.4 A determinação do teor de piruvato, após liberação deste por hidrólise com ácido oxálico 0,02 M, 1 hora, 120°C, foi realizado de acordo com o método da 2,4-dinitrofenilhidrazina (KOEPEL; SHARPE, 1952), tendo como padrão ácido pirúvico 0,25 µM. A leitura foi realizada no comprimento de onda de 380 nm. Os valores obtidos desta determinação foram corrigidos segundo DUCKWORTH e

YAPHE (1970), devido à interferência das unidades de 3,6-anidrogactose (AG), utilizando a fórmula abaixo.

$$\% \text{ác. pir. (corrigido)} = \% \text{ác. pir. (dosado)} \times \% \text{ác. pir. (agarose)} \times \frac{\% \text{AG (amostra dosada)}}{\% \text{AG (agarose)}}$$

A agarose sem ácido píruvico para eletroforese (Sigma) foi utilizada como padrão para o cálculo da correção, esta agarose apresenta 47,3 mol% de 3,6-anidrogactose (AG) e apresentou 7,5 mol% de ácido píruvico, decorrente da interferência do 3,6-anidrogactose.

3.1.5 O conteúdo de 3,6-anidrogactose foi determinado pelo método fotolorimétrico do resorcinol (Yaphe, 1960).

3.1.6 A determinação da rotação óptica específica ($[\alpha]_D$) foi realizada em polarímetro RUDOLPH RESEARCH, modelo Autoplol III, a 20°C, com as amostras analisadas na concentração de 0,2 g% em água.

3.2- ESPÉCIES ESTUDADAS E SEUS POSICIONAMENTOS SISTEMÁTICOS

As espécies estudadas neste trabalho foram: as algas *Cryptonemia crenulata*, *Cryptonemia seminervis* e *Halymenia floridana*.

Divisão: Rhodophyta

Classe: Rhodophyceae

Ordem: Halymeniales

Família: Halymeniaceae

Gênero: *Cryptonemia*

Espécie: *Cryptonemia crenulata* (J. Agardh) J. Agardh

Espécie: *Cryptonernia seminervis* (C. Agardh) J. Agardh

Gênero: *Halymenia*

Espécie: *Halymenia floridana* J. Agardh

3.3- COLETA E PROCESSAMENTO

A alga *Cryptonemia crenulata* foi coletada na Praia do Cupe, no estado de Pernambuco, em 1999. *Cryptonemia seminervis* foi coletadas em Marataízes - Espírito Santo, em março de 2002, e a espécie *Halymenia floridana* foi coletada na ilha do Farol na praia de Caiobá - Paraná, de junho a novembro de 2004. As algas foram classificadas com o auxílio da Dr^a Silvia Maria Pita de Beuclair Guimarães do Instituto de Botânica/SP.

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

Alguns exemplares da espécie *C. crenulata* estão depositados no Herbário da UFPR, departamento de Botânica, sob o número UPCB-46432. As outras espécies ainda não foram catalogadas.

3.4- EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS

3.4.1- EXTRAÇÃO DAS GALACTANAS DE *Cryptonemia crenulata* E *Cryptonemia seminervis*

As algas *Cryptonemia crenulata* (27,7 g) e *Cryptonemia seminervis* (92,0 g) secas e moídas foram submetidas à extração aquosa (1,5% p/v) sob agitação mecânica a 25 °C, por 4 horas e 30 minutos. O extrato foi centrifugado (10000 g por 5 minutos), obtendo-se um resíduo e um sobrenadante. Ao sobrenadante foi adicionado de etanol (3 volumes) e acetato de potássio (0,1 g%). O resíduo foi novamente submetido a extração aquosa a 25 °C, como descrito anteriormente. Os precipitados etanólicos das duas extrações aquosas a 25 °C foram reunidos e ressolubilizados em água, dialisados sequencialmente contra água destilada, NaCl 1M, água destilada e liofilizados. As frações polissacarídicas obtidas de *C.*

crenulata e *C. seminervis* foram denominadas de C1 e S1, respectivamente. Os respectivos resíduos da última extração aquosa a 25 °C foram suspensos em tampão fosfato 0,025M, pH 6,5 (1,5% p/v) sob agitação mecânica, à 80 °C por 6 horas. Após centrifugação (10000 g por 10 minutos) aos sobrenadantes foi adicionado etanol (3 volumes) e acetato de potássio. O precipitado obtido, após centrifugação, foi ressolubilizado em água e dialisado como descrito anteriormente e liofilizado. O processo de extração a 80 °C foi repetido por mais duas vezes. Os polissacarídeos solúveis em água à 80°C obtidos na primeira e segunda extração foram reunidos obtendo-se as frações C2 e S2. As frações C3 e S3 são correspondentes aos polissacarídeos obtidos na terceira extração a 80 °C.

3.4.2- EXTRAÇÃO DAS GALACTANAS DE *Halymenia floridana*

A alga (*Halymenia floridana*) seca e moída (4,5 g) foi submetida à extração com tampão fosfato 0,025 M, pH 6,5 (1,5% p/v) sob agitação mecânica, à 80°C, por 6 horas. Após centrifugação (10000 g por 10 minutos), ao sobrenadante foi adicionado etanol (3 volumes) e acetato de potássio. A alga residual foi submetida a uma segunda extração a 80 °C, como descrito anteriormente. Os precipitados etanólicos obtidos das duas extrações a 80 °C foram reunidos, ressolubilizados em água, dialisados sequencialmente contra água destilada, NaCl 1M, água destilada e liofilizados. A fração polissacarídica obtida de *H. floridana* foi denominada de H.

3.5- TRATAMENTO DOS POLISSACARÍDEOS COM KCl

As frações polissacarídicas C1 e C2 de *C. crenulata*, S1, S2 e S3 de *C. seminervis*, e a fração H de *H. floridana* foram solubilizadas em água (0,25% p/v), e tratados com KCl sólido em concentrações crescentes (0 - 2M), como adição de 0,1 em 0,1 M. Após cada adição a amostra permanecia em repouso de 6 horas à

2°C. Os extratos polissacarídicos foram centrifugados, e os respectivos sobrenadantes e precipitados dialisados contra água destilada e liofilizados. Os polissacarídeos solúveis em KCl 2M obtidos a partir das frações C1, C2, S1, S2, S3 e H foram denominados de C1S, C2S, S1S, S2S, S3S e H2S respectivamente, e os polissacarídeos insolúveis foram denominados de C1P, C2P, S1P, S2P, S3P e H2P.

3.6- PURIFICAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS DE *C. seminervis* POR CROMATOGRAFIA DE TROCA-IÔNICA.

As frações polissacarídicas C1S, C2S e S2S, solúveis em KCl 2M, foram submetidas a fracionamento através de cromatografia de troca-iônica em coluna contendo DEAE-Sephacel, utilizando-se como eluente: água e soluções de NaCl de concentração ascendente.

A eluição foi monitorada pelo teste do fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS *et al.*, 1956). De *C. crenulata* foram obtidas a partir de C1S as frações denominadas de C1S-1, C1S-2 e C1S-3, as quais foram eluídas com NaCl: 0,3; 0,4 e 0,7M, e a partir de C2S foram obtidas as frações C2S-1, C2S-2, C2S-3 e C2S-4, as quais foram eluídas com água, e NaCl 0,5; 1,0 e 1,5M, respectivamente. De *C. seminervis* foram obtidas as frações S2S-1, S2S-2, S2S-3, S2S-4 e S2S-5, as quais foram eluídas com NaCl 0,25; 0,5; 0,75; 1,0 e 1,5M, respectivamente.

3.7- HIDRÓLISE ÁCIDA TOTAL DO TIPO HIDRÓLISE REDUTIVA

A composição monossacarídica foi determinada com 1-2 mg de polissacarídeo, 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, utiliza-se ácido trifluoroacético (TFA) na concentração de 3 M, e um agente redutor, complexo 4-metil-morfolina borano, 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-anidrogallactopiranoose, protegendo-as da degradação em meio ácido, nesta etapa é realizada uma pré-hidrólise.

- Na segunda etapa, a concentração do TFA é ajustada para 2 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 (CLG) e/ou CG-EM (cromatografia líquido-gasosa - espectrometria de massa).

3.8- HIDRÓLISE ÁCIDA TOTAL

Com o objetivo de diferenciação de derivados simétricos (3- e 4-O-metil-galactose), 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.

3.9-DESSULFATAÇÃO POR TRATAMENTO SOLVOLÍTICO

3.9.1- PREPARO DO SAL DE PIRIDÔNIO

O processo de solvólise foi conduzido com os polissacarídeos na forma de sal de piridônio. Este sal foi formado através da solubilização das frações em água

e então foi adicionado resina catiônica DOWEX 50x8 na forma H^+ , sob agitação magnética à temperatura ambiente 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).

3.9.2- 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 100 °C 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 3.12.

3.10- TRATAMENTO ALCALINO

3.10.1- TRATAMENTO ALCALINO ANALÍTICO

A reação de ciclização alcalina foi realizada segundo a metodologia de CIANCIA et al. (1993). De acordo com a metodologia, ao polissacarídeo previamente reduzido com boroidreto de sódio, foi adicionado hidróxido de sódio 3 M (concentração final 1 M). A mistura foi mantida em banho termostatizado a 80 °C. Foram retiradas alíquotas em diferentes intervalos de tempo, as quais foram neutralizadas com HCl (1M). O conteúdo de 3,6-anidrogactose foi determinado pelo método fotocolorimétrico do resorcinol (Yaphe, 1960) em cada uma das alíquotas.

Com os valores de absorbância obtidos para cada intervalo de tempo, pela dosagem do teor de 3,6-anidrogallactose, foi aplicada a fórmula: $\ln(A_0 - A_\infty / A_t - A_\infty)$, onde:

A_0 = absorbância no tempo zero indica a concentração inicial de unidades precursoras.

A_∞ = absorbância que indica a concentração de unidades totais que ciclizaram.

A_t = absorbância do tempo reacional.

Assim através da plotagem gráfica dos valores obtidos pela equação (eixo Y) em função do tempo (eixo X), é possível calcular a constante de velocidade da reação (k), representada pela pendente da reta obtida e o tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) obtido a partir de k pela equação $t_{1/2} = \ln 2 / k$.

3.10.2- DETERMINAÇÃO DO TEOR DE 3,6-anidrogallactose

O teor de 3,6-anidrogallactose foi determinado pelo método do resorcinol (Yaphe, 1960), assim 0,1 mL da amostra (obtidas em diferentes intervalos de tempos por tratamento alcalino – método analítico), 0,7 mL de água e 4 mL do reativo de resorcinol que consiste de 9 mL de solução de resorcinol (15 mg de resorcinol em 10 mL de água), e 1 mL de acetal (1 mL de acetal em 24 mL de água) e 100 mL de ácido clorídrico fumegante. Os tubos vedados foram submetidos à temperatura de 80 °C em banho termostatizado por 10 minutos. Após resfriamento em banho de gelo a leitura da absorbância foi realizada a 555 nm.

3.10.3- TRATAMENTO ALCALINO PREPARATIVO

Ao polissacarídeo (100 mg) previamente solubilizado em água destilada (0,2 g%), foi adicionado borohidreto de sódio (10% em relação à massa do polissacarídeo). Após repouso de 12 horas a 4 °C, adicionou-se hidróxido de sódio 3 M (concentração final 1 M) e a mistura foi mantida em banho termostatizado a

80 °C por 5 horas para a fração C2S-3 e por 2 horas para a fração S2S-3 (NOSEDA; CERESO, 1995).

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

Após resfriamento, diálise, e liofilização, a amostra foi submetida à hidrólise redutiva segundo FALSHAW e FURNEAUX (1994), e analisadas por CLG e/ou CG-EM na forma de acetatos de alditóis, esta amostra também foi metilada como descrito no item 3.12.

3.11- DETERMINAÇÃO DA CONFIGURAÇÃO ENANTIOMÉRICA

As determinações das configurações enantioméricas e as quantificações das unidades de D- e L-gactose, e de 2-O-metil-gactose foram realizadas pelo método descrito por CASES et al. (1995). Nesta metodologia os polissacarídeos sofrem uma aminação redutiva (agente redutor cianobohidreto de sódio), na presença do álcool quiral (S)-1-amino-2-propanol, e acetilação, formando assim seus derivados 1-deoxi-(2-hidroxipropilamina) alditóis, que são separados e quantificados por CLG. Para o derivado 2-O-metilgactose o amino álcool é substituído por (S)- α -metilbenzilamina.

Para a determinação de D- e L- 3,6-anidrogactose, foi utilizado o método descrito por ERREA et al. (1998), onde o polissacarídeo é submetido a uma hidrólise oxidativa parcial, para a obtenção dos correspondentes ácidos 3,6-anidroaldônicos, os quais são convertidos a *séc*-butil ésteres diastereoisoméricos acetilados, que são quantificados por CLG, (coluna SP-2330, 0,25 mm d.i x 30m).

Estas derivatizações e análises foram realizadas pelo Dr. José Estevez do Departamento de Química Orgânica da Universidad de Buenos Aires (UBA), com a qual o grupo de química de carboidratos – Algas Marinhas (UFPR), mantém colaboração científica.

3.12- METILAÇÃO

O processo de metilação do polissacarídeo 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 (20 minutos), foi adicionado iodometano (0,1 mL) sob agitação mecânica vigorosa (20 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 são dialisadas e liofilizadas para então serem, se necessário, novamente metiladas. 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 CLG e/ou CG-EM, na forma de acetatos de alditóis parcialmente metilados.

A trideutereometilação (ICD_3) foi conduzida em algumas das galactanas de maneira idêntica à descrita anteriormente.

3.13- MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

3.13.1- CROMATOGRAFIA LÍQUIDO-GASOSA

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 μm), em diferentes temperaturas: análises cromatográficas para acetatos de alditóis foram realizadas à 220°C, e as amostras de acetatos de alditóis parcialmente metilados foram realizadas à 210°C.

3.13.2- CROMATOGRAFIA LÍQUIDO-GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSA (CG-EM)

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 e/ou DB-223, marca J.W. As injeções nas colunas foram feitas mantendo-se a temperatura inicial em 50°C, por minuto, seguido de aumento de acordo com a programação de temperatura em um gradiente de 40°C por minuto, até 230°C, mantendo-se constante a partir deste valor. Foi utilizado gás hélio como gás de arraste, com fluxo de 1 mL.min⁻¹. As áreas dos picos de interesse foram determinadas por integração em software. Os espectros de massa serão 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), sendo identificados por meio de seus tempos de retenção e perfis característicos de fragmentação por impacto de elétrons (JANSSON et al., 1976 e CARPITA; SHEA, 1989), comparado com padrões.

3.13.3- CROMATOGRAFIA DE GEL PERMEACÃO (HPSEC-MALLS) – ANÁLISE DE HOMOGENEIDADE E MASSA MOLECULAR

Determinação da variação do índice de refração com relação à concentração (dn/dc): soluções de 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1,0 mg da amostra em 1 mL de NaNO₃ 0,1M e azida de sódio (NaN₃) 200 ppm, foram previamente filtradas em membranas Millipore 0,45 µm e armazenadas em frascos viais rigorosamente limpos. As análises foram realizadas utilizando-se injeções de 500 µL de cada solução em HPLC acoplado a detector de espalhamento de luz, com fluxo de 0,6 mL.min⁻¹ e pressão de 67 psi a 20°C.

Para as análises de homogeneidade e de determinação da massa molecular ponderal média (M_w), foi preparado uma solução de 2 mg da amostra em 1 mL de nitrito de sódio (NaNO_3 0,1 M) e azida de sódio (NaN_3 200 ppm) dissolvidas em água millique, previamente filtradas em membranas Millipore (acetato de celulose) de 0,45 e 0,22 μm . A análise foi realizada utilizando-se injeções de 500 μl de solução em HPLC acoplado a detector de espalhamento de luz, com fluxo de 0,6 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Para a determinação da massa molecular ponderal média foi utilizado o valor de dn/dc que foi obtido juntamente à análise de homogeneidade.

As análises de homogeneidade e de determinação do valor de M_w 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 $1\cdot 10^6$, $4\cdot 10^5$, $8\cdot 10^4$ e $5\cdot 10^3$, em série. O eluente utilizado foi uma solução de (NaNO_3 0,1M) contendo NaN_3 (200 ppm), pressão de 920 psi a 20 °C.

Foi utilizado o programa ASTRA (WYATT TECHNOLOGY), para analisar os dados obtidos. Para cada amostra pode se efetuar uma medida do espalhamento do feixe luminoso em função da concentração do polímero e em função do ângulo. A relação que permite calcular M_w é:

$$\frac{Kc(1+\cos^2\theta)}{\Delta R_\theta} = (1/M_w + 2A_2C = \dots)P^{-1}(\theta)$$

$$\text{onde } K = (2\pi^2 n^2 / \lambda_o^4 N) / (dn/dc)^2$$

n = índice de refração do solvente; λ_o no comprimento de onda

λ_o = comprimento de onda da luz incidente

N = número de Avogadro

dn/dc = taxa de variação do índice de refração com a concentração

c = concentração do polímero

θ = ângulo do feixe de luz espalhado

A_2 = segundo coeficiente virial

$P(\theta)$ = função que leva em consideração as interferências entre as diferentes vibrações emitidas por uma mesma partícula

ΔR_θ = diferença entre o R_θ da solução e o R_θ do solvente

R_θ = fator de Rayleigh, calculado através da seguinte equação

$$R_\theta = \frac{G_\theta \cdot D}{G_o \cdot \sigma' \cdot 1'}$$

Onde G_θ é a intensidade relativa correspondente ao feixe espalhado, G_o a intensidade relativa correspondente ao feixe incidente, D , σ' , $1'$ são constantes do aparelho.

3.14- DESPOLIMERIZAÇÃO DAS GALACTANAS UTILIZANDO HIDRÓLISE REDUTIVA PARCIAL

A hidrólise redutiva parcial foi realizada segundo método de USOV e ELASHVILI (1991), sendo, no entanto realizada algumas modificações na concentração do TFA e no tempo de hidrólise como descrito a seguir. Para 200 mg de polissacarídeo foi adicionado água destilada (15 mL) e TFA 2M (5 mL). Esta mistura foi mantida a 60 °C (por aproximadamente 15 minutos), até completa solubilização do polissacarídeo. Após adição do complexo 4-metil-morfolina borano (1,35 g) a mistura foi mantida a 65 °C por 6 horas. Ao término deste período o TFA foi removido por co-destilação com água destilada.

A hidrólise parcial da fração C2S-3 foi realizada com 600 mg e de S2S-3 com 700 mg.

3.15- FRACIONAMENTO E PURIFICAÇÃO DAS GALACTANAS PARCIALMENTE DESPOLIMERIZADAS OBTIDAS POR HIDRÓLISE REDUTIVA PARCIAL

Conforme relatado por GONÇALVEZ et al. (2001), o maior problema em relação à purificação dos oligossacarídeos é devido a presença do complexo 4-metil-morfolina borano. Com base neste trabalho, o hidrolisado da fração C2S-3 foi aplicado em uma coluna contendo DEAE-Sephadex A-25 (volume total da coluna 20 mL). A amostra foi eluída com água e posteriormente com gradiente contínuo de NaCl (0-0,5 M), em seguida um gradiente descontínuo (0,5; 0,6; 0,7; 0,9; 1,0 e 1,5 M).

As frações obtidas por cromatografia de troca-iônica (CA, CB, CC e CD), devido a grande quantidade de sal foram submetidas à extração com DMSO (3 vezes). Após centrifugação, foi feita a precipitação com clorofórmio (3 volumes), evaporação, solubilização em água destilada, liofilização, para então serem ressolubilizadas e aplicadas em coluna contendo BioGel P-2 (volume total de 170 mL e volume morto de 48 mL). Utilizou-se água destilada como eluente e a detecção dos açúcares foi feita pelo método de fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS et al., 1956).

O volume morto foi determinado através da cromatografia de dextran Blue (componente com massa molecular acima do limite de inclusão do gel), foi acompanhado por leitura do eluato aquoso em espectrofotômetro (625 nm).

O hidrolisado da fração S2S-3 de *C. seminervis* foi tratado de maneira diferente. Após evaporação do ácido por co-destilação com água à pressão reduzida, o produto de hidrólise foi dialisado contra água destilada (em membrana de diálise de 14.000 Da) e liofilizado. O material liofilizado foi denominado de CS.

3.16- RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

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 ou 10 mm, com as amostras dissolvidas em água deuterada (D_2O), a temperatura de 50 ou 70°C. Os deslocamentos químicos, expressos em δ (ppm), foram determinados utilizando acetona como padrão interno tanto para as análises de ^{13}C ($\delta = 30,2$ ppm) como para ^1H ($\delta = 2,224$ ppm).

3.16.1- RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE CARBONO-13 (RMN - ^{13}C)

Os espectros de RMN- ^{13}C foram obtidos na frequência 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.

3.16.2- RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE PRÓTON (RMN - ^1H)

Os espectros de RMN- ^1H foram obtidos na frequência base de 400,13 MHz, sendo necessário promover a troca dos hidrogênios das hidroxilas por deutério e a remoção completa das moléculas de água presentes, através da dissolução das frações em D_2O , congelamento e liofilização (este processo deverá ser repetido no mínimo por 3 vezes), com a finalidade de diminuir a intensidade do sinal relativo ao OH, o qual prejudica a qualidade do espectro obtido.

3.16.3-HMQC (HETERONUCLEAR MULTIPLE QUANTUM CORRELATION SPECTROSCOPY)

Esta técnica heteronuclear permite determinar quais átomos de hidrogênio (^1H) estão ligados a quais átomos de carbono (^{13}C).

3.17-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.

3.18-DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIHERPÉTICA DAS GALACTANAS DE *C. crenulata*

Os experimentos de análises antivirais 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. Com este laboratório o grupo de Química de Carboidratos de algas marinhas da UFPR mantém colaboração científica fornecendo amostras de carboidratos sulfatados e aliando os resultados de atividade antiviral com os estruturais.

- 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 fetal bovino. Para o meio de manutenção (MM) foi utilizado uma concentração de 1,5% de soro fetal bovino.

- Os vírus HSV-1 cepa F e HSV-2 cepa G foram obtidos da American Type Culture Collection (Rockville, 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.

- As frações polissacarídicas submetidas a análise antiviral foram: C1, C2, C3, C1S, C2S, C2S-1, C2S-2, C2S-3 e C2S-4 de *C. crenulata*.

3.18.1- ENSAIO CITOTÓXICO

A viabilidade das células Vero frente as galactanas de *C. crenulata* 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 1h. 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. O sobrenadante foi removido e 200 µl de etanol foi adicionado a cada poço, 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.

3.18.2-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 1h com agitação a cada 20 minutos. Após adsorção os inóculos foram retirados e as monocamadas cobertas com meio foram incubadas por 48h a 37°C, em estufa com ambiente de CO₂. Após este período o meio foi removido, as células foram 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 (PFU/ml) = $n / v \cdot d$

PFU: unidades formadoras de placas

n: número médio de placas

v: volume do inóculo

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 (PFU). Este resultado é muito 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 (PFU).

3.18.3-DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL *in vitro*

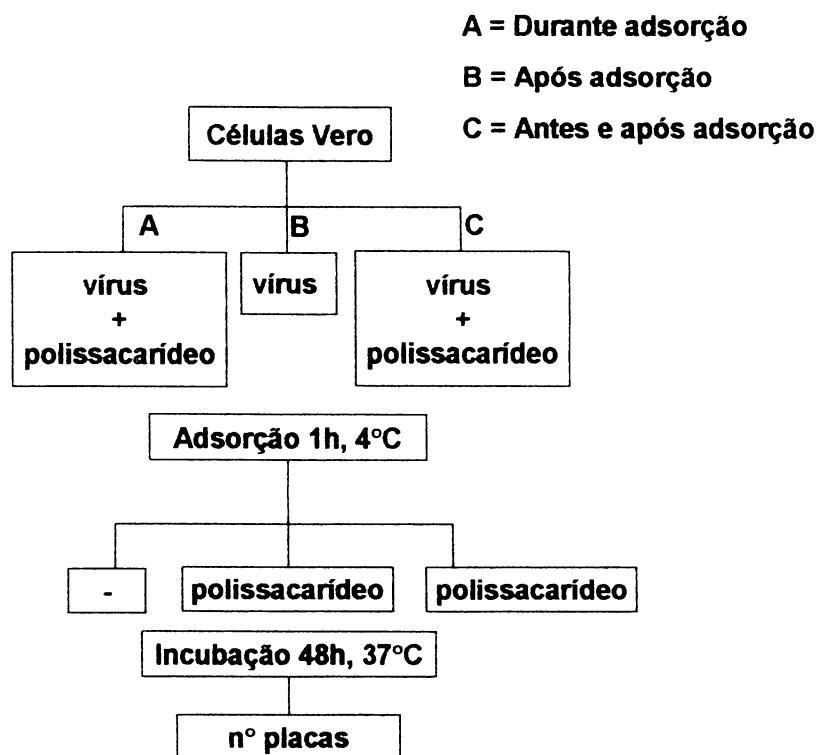
A atividade antiviral das frações polissacarídicas foi avaliada *in vitro* pelo método de redução do número de placas virais (CANDEIAS, 1996).

Monocamadas confluentes de células Vero crescidas sobre multiplacas de 24 poços, foram infectadas com aproximadamente 50 PFU (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 0,7% de metilcelulose e a correspondente dose de cada polissacarídeo. As placas foram incubadas a 37°C por 48hs 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 3.18.2. 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.

Para a determinação do efeito do período de incubação na atividade antiviral das galactanas sulfatadas, células Vero crescidas sobre multiplacas de 24 poços foram infectadas com 50 PFU de HSV-1, cepa F em meio MM contendo diferentes concentrações de polissacarídeo ou na ausência deste. Após incubação de 1h 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 48hs a 37°C (Esquema-1). Após este período foi realizada a contagem do número de placas virais como descrito no item 3.18.2.

ESQUEMA-1 REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO ENSAIO PARA DETERMINAÇÃO DO EFEITO DO PERÍODO DE INCUBAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS SOBRE O HSV-1.



3.18.4-DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE VIRUCIDA

Uma suspensão viral contendo 4×10^5 PFU de HSV-1 cepa F, foi incubada (1h30 a 37°C) com igual volume de MM na presença ou ausência de diferentes concentrações 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% (VC_{50}) expressa a concentração de galactana requerida para inativar o vírus em 50% em relação ao controle.

3.18.5-ENSAIOS *in vivo* DE PROTEÇÃO A INFECÇÃO PELO HSV-2

Camundongos fêmeas BALB/c com 46 a 48 semanas de vida foram utilizadas para o ensaio de proteção contra a inoculação vaginal com HSV-2 cepa MS. Antes da inoculação, os animais receberam uma injeção subcutânea (20 µL) de acetato de medroxiprogesterona (Medrosterona, Gardor, Argentina), preparada na concentração de 25 mg/mL em solução de PBS para aumentar a susceptibilidade dos ratos a infecção com HSV-2. Após cinco dias os animais foram divididos em 4 grupos de 10 animais cada um. Nos grupos 1 e 2 os animais receberam intravaginalmente instilações de 50 µL da fração polissacarídica C2 de *C. crenulata* (8 mg/mL em PBS). Os animais do grupo 3 foram receberem 50 µL de C2 (0,8 mg/mL em PBS), e os animais do grupo 4 foram inoculados com PBS. Um minuto após receberem C2 ou placebo, os ratos dos grupos 2 - 4 foram inoculados intravaginalmente com 1×10^5 PFU (unidades formadoras de placas) de HSV-2 cepa MS, enquanto que os animais do grupo 1 receberam PBS. Uma segunda dose de C2 na correspondente concentração foi administrada duas horas após a inoculação de PBS (grupo 1) ou HSV-2 (grupos 2 e 3) . O grupo 4 foi tratado com PBS. Os animais foram examinados quanto a morbidade e mortalidade durante 20 dias.

Amostras de secreções vaginais foram coletadas após três dias da infecção por lavagem da vagina com 100 µL de PBS. O material coletado foi congelado a -70°C e posteriormente utilizado para se determinar a infectividade do HSV-2 pelo ensaio de placas.

Os dados foram analisados pelo teste do Qui-quadrado. Um valor de $p = 0,005$ ou menor foi considerado significativo.

4-RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 RESULTADOS E DISCUSSÃO DOS POLISSACARÍDEOS DE *Cryptonemia crenulata*

4.1.1 OBTENÇÃO E ANÁLISES DAS FRAÇÕES BRUTAS DE *C. crenulata*

FIGURA-3 FOTO DA ALGA *C. crenulata*



Posição taxonômica da alga *C. crenulata*:

Divisão: Rhodophyta

Classe: Rhodophyceae

Sub Classe: Florideae

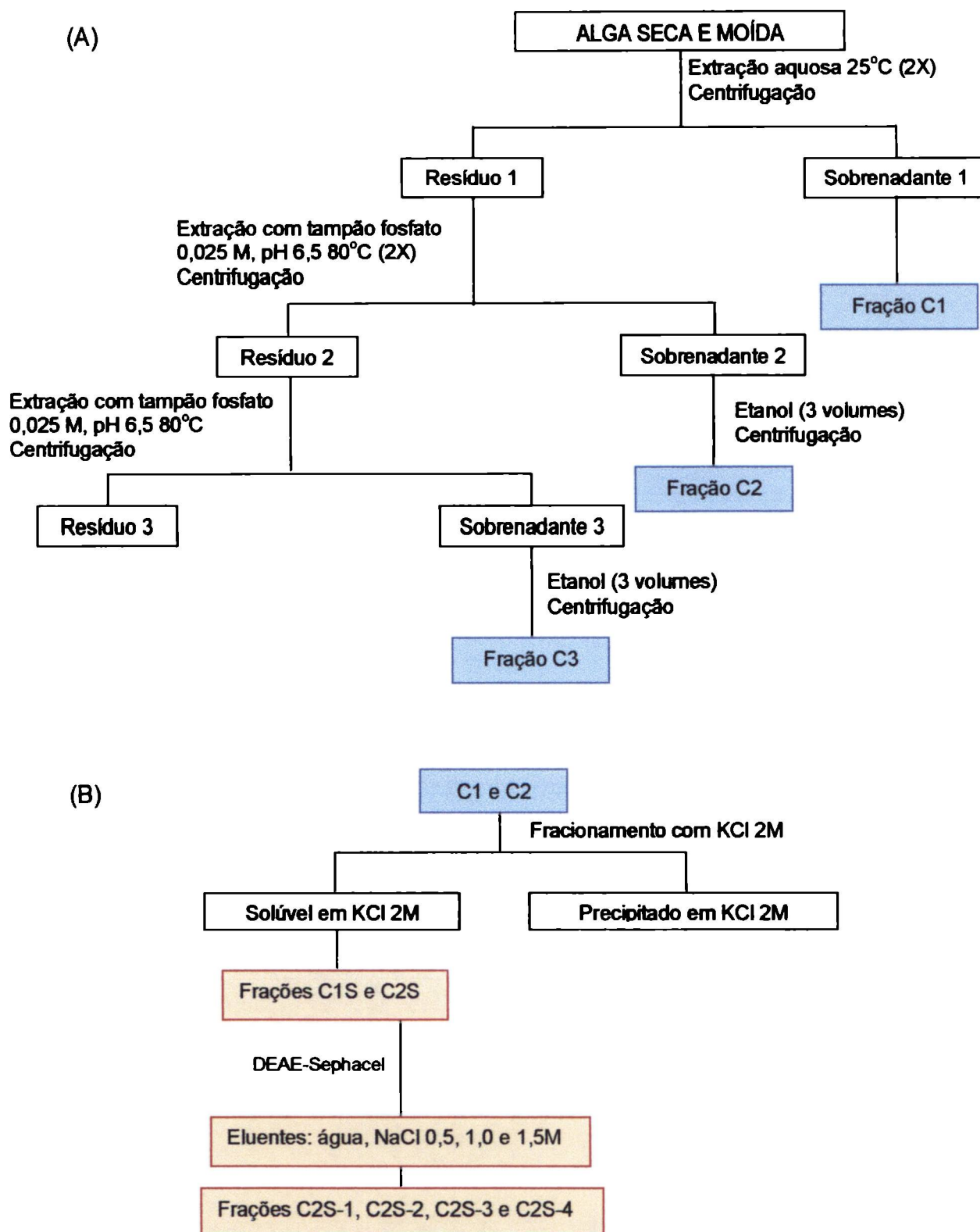
Ordem: Halymeniales

Família: Halymeniaceae

Gênero: *Cryptonemia*

Espécie: *Cryptonemia crenulata* (J. Agardh) J. Agardh

**ESQUEMA-2 EXTRAÇÃO (A) E FRACIONAMENTO (B) DOS POLISSACARÍDEOS
OBTIDOS DA ALGA VERMELHA *Cryptonemia crenulata*.**



Os polissacarídeos solúveis em meio aquoso de *C. crenulata* foram obtidos de acordo com o Esquema-1, (ZIBETTI, 2001). As duas extrações aquosas a 25°C foram reunidas e denominadas de C1, representando 4,0% do material inicial.

Seqüencialmente, a alga residual (Resíduo-1, Esquema-2 A) foi submetida a duas extrações aquosas a temperatura de 80°C, utilizando tampão fosfato 0,025 M. O material obtido de cada extração a quente foi tratado separadamente, dando origem às frações C2 e C3 (6,8% e 1,1% de rendimento, respectivamente). O rendimento total em polissacarídeos solúveis em meio aquoso de *C. crenulata* foi de aproximadamente 12,0%, valor este compatível com o obtido para outras algas da antiga ordem Cryptonemiales (CHOPIN et al., 1994).

As três frações brutas (C1, C2 e C3) apresentaram na sua composição a galactose (65,0 - 70,7%) como principal monossacarídeo além de 3,6-anidrogactose (7,3 - 10,8%) e seu derivado 2-O-metilado (5,9 - 8,3%) e 2-O-metilgalactose (5,9 - 8,9%) e traços de 4-O- e 6-O-metilgalactose. Glucose foi detectada em quantidades similares (5,8 - 7,5%) tanto nos extratos a 80°C quanto a 25°C (Tabela-3). A presença de glucose é geralmente proveniente de contaminação do polissacarídeo de reserva das algas vermelhas (amido das florídeas) (USOV, 1992).

Como podemos ainda observar na Tabela-3, as frações brutas apresentam alto teor de sulfato (22 - 42%), e também mostram a presença de acetal de ácido pirúvico. É importante ressaltar que este tipo de substituinte, acetal de ácido pirúvico, foi pela primeira vez encontrado em algas vermelhas por HIRASE (1957) em galactanas do tipo agarana. Em 1972, HIRASE e WATANABE demonstraram também a presença de acetal de ácido pirúvico em galactanas do tipo carragenana.

Em todas as espécies de algas relatadas até o presente, o acetal de ácido pirúvico se encontra como 4,6-O-(1'-carboxietilideno)- β -D-galactopiranosose, portanto substituindo os carbonos 4 e 6 das unidades A, tanto de galactanas do tipo agarana (CHOPIN et al. 1994), quanto de carragenanas (MILLER et al., 1995).

Na ordem Halymeniales substituições por acetal de ácido pirúvico são encontradas em baixas proporções (Tabela-2, p. 21).

TABELA-3 ANÁLISE QUÍMICA E COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES C1, C2 E C3 DE *C. crenulata*.

Fração	Sulfato ^a (%)	Ác. Pirúvico (%)	Monossacarídeos (mol %)						
			Gal ^b	AG	2AG	2Gal	4Gal	6Gal	Glc
C1	22,0	6,3	70,7	7,3	5,9	8,9	1,4	-	5,8
C2	28,0	2,9	66,4	9,5	7,9	6,0	1,1	1,6	7,5
C3	42,0	1,4	65,0	10,8	8,3	5,9	-	2,6	2,5

^aExpresso como Na SO₃.

^b Abreviatura dos monossacarídeos (Gal = galactose; AG = 3,6-anidrogallactose; 2AG = 3,6-anidro-2-O-metilgalactose; 2Gal = 2-O-metilgalactose; 4Gal = 4-O-metilgalactose; 6Gal = 6-O-metilgalactose e Glc = glucose).

A fração C2 foi solubilizada em água destilada na concentração de 0,25 g% e tratada com KCl com um aumento gradual do sal, até a concentração de 2 M. Esta metodologia de fracionamento foi primeiramente descrita por CERZO (1967) que realizou o fracionamento de um sistema de galactanas da alga *Gigartina skottsbergii* (ordem Gigartinales), isolando diversas frações que precipitavam em diferentes concentrações de KCl.

Neste fracionamento com KCl, 97% da fração C2 permaneceu solúvel em KCl 2M e foi denominada de C2S (Esquema-2 B).

A análise química da fração C2S mostrou a presença de 27,7% de sulfato e 3,7% de ácido pirúvico.

Com a finalidade de se determinar a enantiomericidade das unidades monossacarídicas constituintes, a fração C2S foi submetida a análises enantioméricas das unidades de galactose e de seus derivados monometilados pelo método de CASES et al. (1995), e as das unidades anidrogallactosídicas pelo método de ERREA et al. (1998).

No método descrito por CASES et al. (1995), o polissacarídeo sofre uma aminação redutiva, na presença de um álcool quiral (S)-1-amino-2-propanol; após

acetilação formam os derivados 1-deoxi-(2-hidroxipropilamina) alditóis que são separados e quantificados por CLG. Para as unidades de 2-O-metilgalactose o amino álcool é substituído por (S)- α -metilbenzilamina. Na determinação enantiomérica das unidades anidrogactosídicas pelo método de ERREA et al. (1998), o polissacarídeo é submetido a uma hidrólise oxidativa, obtendo-se os correspondentes ácidos aldônicos, os quais são convertidos a *séc*-butil ésteres diastereoisômeros acetilados, que são enfim quantificados por CLG.

Como pode ser observado na Tabela-4, a análise enantiomérica das unidades monossacarídicas constituintes mostrou a presença majoritária de unidades galactose e 2-O-metilgalactose pertencente à série D-; já as unidades de 3,6-anidrogactose são principalmente pertencentes a série L- (7,7%) e somente 2,2% são da série D-.

TABELA-4 ANÁLISE QUÍMICA E COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DA FRAÇÃO C2S, SOLÚVEL EM KCl 2M DE *C. crenulata*.

Fração	Sulfato ^a (%)	Ác. Pirúvico (%)	Monossacarídeos (mol %)						
			Gal ^{b, c}	AG ^d	2AG ^d	2Gal ^c	4Gal ^e	6Gal	Xil
			D - L	D - L	L	D - L			
C2S	27,7	3,7	62,0-10,6	2,2 -7,7	6,4	4,7 -1,7	1,6	tr.	3,1

^aExpresso como NaSO₃.

^bAbreviatura dos monossacarídeos (Gal = galactose; AG = 3,6-anidrogactose; 2AG = 3,6-anidro-2-O-metilgalactose; 2Gal = 2-O-metilgalactose; 4Gal = 4-O-metilgalactose; 6Gal = 6-O-metilgalactose e Xil = xilose).

^{c, d}As análises enantioméricas das unidades de galactose e de seus derivados monometilados foram realizados pelo método de CASES et al. (1995), e das unidades anidrogactosídicas pelo método de ERREA et al.(1998), respectivamente.

^eDeterminado após hidrólise ácida total, redução com borodeutereto de sódio e análise por CG-EM.

tr.= traços (quantidades menores que 1).

Com a finalidade de se purificar o material solúvel em KCl 2M, a fração C2S foi submetida à cromatografia de troca iônica, em coluna de DEAE-Sephacel,

utilizando como eluentes: água e soluções crescentes de NaCl (0,25 - 1,5M). Deste fracionamento foram obtidas as frações: C2S-1, C2S-2, C2S-3 e C2S-4, as quais foram eluídas com água e solução de NaCl 0,5; 1,0 e 1,5M, respectivamente.

As frações C2S-1 - C2S-4 apresentaram na sua composição principalmente galactose e em menor proporção 3,6-anidrogactose, 3,6-anidro-2-O-metilgalactose, 2-O-metilgalactose e xilose. As únicas frações que apresentam 6-O-metilgalactose são a C2S-1 e a C2S-4, unidades de glucose foram encontradas somente na fração C2S-2. Glucose presente na composição monossacarídica de algumas galactanas pode ser proveniente da contaminação do amido das florídeas (USOV, 1992).

TABELA-5 ANÁLISE QUÍMICA E COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS SUB-FRAÇÕES DE C2S, DE *C. crenulata*.

Fração	Sulfato ^a (%)	Ac. Pirúvico (%)	Monossacarídeos (mol %)						
			Gal ^{b,c}	AG ^d	2AG	2Gal ^c	6Gal	Xil	Glc
			D - L	D - L		D - L			
C2S-1	20,1	n.d.	72,8	7,6 - 0,9	6,9	7,5	1,1	3,2	-
C2S-2	25,1	1,9	71,5	3,9 - 2,4	6,7	6,2	-	8,2	1,1
C2S-3	28,3	0,5	62,5 - 5,9	4,7 - 11,1	8,6	3,2 - 1,3	-	2,7	-
C2S-4	17,5	n.d.	73,9	5,7 - 3,9	9,5	2,4	4,6	-	-

^aExpresso como NaSO₃.

^bAbreviatura dos monossacarídeos (Gal = galactose; AG = 3,6-anidrogactose; 2AG = 3,6-anidro-2-O-metilgalactose; 2Gal = 2-O-metilgalactose; 6Gal = 6-O-metilgalactose; Xil = xilose e Glc = glucose).

n.d.= não determinado.

^{c, d}As análises enantioméricas das unidades de galactose e de seus derivados monometilados foram realizados pelo método de CASES et al. (1995), e das unidades anidrogactosídicas pelo método de ERREA et al. (1998), respectivamente.

A fração de maior rendimento C2S-3, apresentou perfil homogêneo pela análise de HPSEC-MALLS e apresentou massa molecular média (M_w) de 236.200

Da, a qual foi determinada baseando-se na variação dos índices de refração ($dn/dc = 0,077$).

Considerando a homogeneidade da fração e a análise enantiomérica das unidades monossacarídicas constituintes, (Tabela-5) esta galactana C2S-3 foi classificada como do tipo DL-híbrida (ZIBETTI, 2001).

4.1.2- ANÁLISES GERAIS DE C2S-3

De acordo com as análises realizadas (Tabela-6), podemos observar que esta galactana homogênea C2S-3 apresenta rotação óptica de $+23,5^\circ$. Apesar desta galactana apresentar rotação óptica positiva, este valor é baixo quando comparados aos valores de rotação óptica específica em torno de $+70^\circ$, para galactanas do tipo carragenana (ESTEVEZ et al., 2001). O valor da rotação óptica específica desta galactana, está de acordo com a presença de unidades B pertencentes tanto à série L- como D-, como determinado pelas análises enantioméricas dos monossacarídeos constituintes (Tabela-6). Ainda, ao observarmos o arranjo estrutural clássico das galactanas, onde toda as suas unidades A (β -galactopirranose) são pertencentes à série D-, e as unidades B (α -galactopirranose) podem ser D- quando se tratar de carragenanas, e L- para as agarana, espera-se para as carragenanas somente a presença de unidades D- e para as agaranas espera-se uma relação de D:L- de 1:1. A análise enantiomérica de C2S-3 mostra uma proporção de unidades D:L de 1:0,4 caracterizando a galactana como do tipo DL-híbrida.

A galactana C2S-3 apresenta alto teor de sulfatação (28,3%), além de substituição por acetal de ácido pirúvico 0,5% pela análise colorimétrica, (semiquantitativa). O grau de substituição por grupos sulfato em outras galactanas de algas da ordem Halymeniales esta na média de 25%, sendo que em *Kallymenia reniformis* e *Pachymenia camosa* são observadas as maiores porcentagens (37 e 32,5%, respectivamente) (CHOPIN et al., 1994).

TABELA-6 ANÁLISE QUÍMICA E COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DA GALACTANA C2S-3, C2S-3D E C2S-3T DE *C. crenulata*.

Fração ^a	Sulfato ^b (%)	Ác. Pirúvico (%)	[α] ²⁰ _D	Monossacarídeos (mol %)				
				Gal ^{c,d}		AG ^e		Xil
				D	L	D	L	
C2S-3	28,3	0,5	+23,5	62,5	5,9	4,7	11,1	2,7
C2S-3D	7,1	n.d.	n.d.	74,4		12,4		1,9
C2S-3T	n.d.	n.d.	n.d.	56,5	1,0	14,3	12,4	2,5

^aGalactana nativa (C2S-3), dessulfatada (C2S-3D) e submetida a tratamento alcalino (C2S-3T).

^bExpresso como NaSO₃.

^cAbreviatura dos monossacarídeos (Gal = galactose; AG = 3,6-anidrogallactose; 2AG = 3,6-anidro-2-O-metilgalactose; 2Gal = 2-O-metilgalactose e Xil = Xilose).

^dAs análises enantioméricas das unidades de galactose e de seus derivados monometilados foram realizados pelo método de CASES et al. (1995), e das unidades anidrogallactosídicas pelo método de ERREA et al. (1998), respectivamente.

n.d. = não determinado.

4.1.3- DESSULFATAÇÃO SOLVOLÍTICA DA GALACTANA C2S-3

O processo de dessulfatação de galactanas de algas vermelhas é importante, para que se possa determinar a localização destes grupos substituintes no polissacarídeo original. A determinação do posicionamento dos grupos sulfato se dá através da análise comparativa da análise de metilação da galactana nativa e dessulfatada. Além do mais este processo solvolítico possibilita uma simplificação do espectro de RMN de ¹³C, já que os espectros de galactanas com alto teor de sulfato geralmente são 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 em uma mistura reativa (DMSO: metanol: piridina) e aquecida a 100°C.

A fração C2S-3 (28,3% de NaSO₃) foi submetida a tratamento solvolítico, por 4 horas, e foi então denominada de C2S-3D (96% de rendimento). A determinação

do teor de sulfato (DODGSON, 1961) de C2S-3D foi de 7,1% de NaSO₃, condizente com um grau de dessulfatação de 75%.

A remoção dos grupos sulfato pode levar a uma degradação dos polissacarídeos, e assim pode-se obter polímeros com uma maior ou menor degradação, principalmente das ligações mais lábeis, como as anidrogalactosídicas.

De acordo com a Tabela-6, o tratamento solvolítico não modificou significativamente a composição monossacarídica da fração. Entretanto, podemos observar uma pequena diminuição na porcentagem das unidades anidrogalactosídicas.

4.1.4- TRATAMENTO ALCALINO DA GALACTANA C2S-3

Com a finalidade de se quantificar as unidades precursoras de 3,6-anidrogalactose, ou seja, as unidades de α -galactose 6-sulfato com hidroxilas livres em C-3 (galactose-6-sulfato, galactose-2,6-dissulfato e 2-O-metilgalactose 6-sulfato) as galactanas sulfatadas são submetidas a um meio alcalino (NaOH 1M), onde as unidades precursoras são convertidas a seus respectivos derivados de 3,6-anidrogalactose. Desta forma este tratamento promove uma dessulfatação seletiva em C-6 das unidades de α -galactose (NOSEDA; CERREZO, 1995).

O tratamento alcalino da galactana C2S-3 foi conduzido a 80 °C por 5 horas, o teor de 3,6-anidrogalactose foi acompanhado pelo método do resorcinol (YAPHE, 1960), até que a quantidade de 3,6-anidrogalactose permanecesse constante. Após este tratamento químico a galactana foi denominada de C2S-3T (rendimento de 60%).

A determinação da composição monossacarídica, e a análise enantiomérica das unidades que compõem a fração C2S-3T (Tabela-6) mostraram um aumento de 3,6-anidro- α -D-galactose (4,7% $\rightarrow$ 14,3%) em relação ao enantiômero L- (11,0% $\rightarrow$ 12,4%). Portanto aliando o processo de tratamento alcalino à análise enantiomérica das unidades de 3,6-anidrogalactose neste polímero, foi possível

determinar que a fração C2S-3 apresenta 7,6% de unidades de α -D-galactose 6-sulfato e 3,3% de α -L-galactose 6-sulfato.

4.1.5- ANÁLISE DE (TRIDEUTERO)METILAÇÃO DA GALACTANA NATIVA (C2S-3), DESSULFATADA (C2S-3D) E SUBMETIDA A TRATAMENTO ALCALINO (C2S-3T)

Devido à presença de monossacarídeos naturalmente metilados (3,6-anidro-2-O-metilgalactose e 2-O-metilgalactose) (Tabela-6) a fração C2S-3 nativa e parcialmente dessulfatada (C2S-3D) foram submetidas à metilação utilizando-se iodeto de metila deuterado (ICD_3), como agente metilante. A fração C2S-3T, produto do tratamento alcalino de C2S-3, foi metilada usando CH_3I .

Previamente ao processo de (trideutero)metilação pelo método CIUCANU e KEREK (1984), as galactanas C2S-3, C2S-3D e C2S-3T foram tratadas com trietilamina (STEVENSON; 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 (trideutero)metilação estão apresentados na Tabela-7, e na Tabela-8 os resultados da análise por CG-EM dos produtos de hidrólise das galactanas C2S-3 e C2S-3D trideuterometiladas.

As unidades A (β -D-galactopiranoose) desta galactana são principalmente sulfatadas em C-2 devido à presença de 31,4 mol% de 4,6-Gal (Tabela-7). Uma menor proporção (9,8 mol%) de galactose 2,6-substituídas e não substituídas (3,0 mol%), também são observadas. A análise de metilação do polímero dessulfatado confirmou a presença majoritária de grupos sulfato em C-2, bem como que parte das unidades 2,6-di-O-substituídas correspondem a unidades de β -D-galactopiranoose 2-sulfato xiloglicosiladas em C-6, devido à presença do derivado 2,4- CD_3Gal (Tabela-8) na trideuterometilação da galactana dessulfatada.

Observamos ainda na Tabela-7 a presença de 2,5 mol% de galactose, que pode ser representativo de unidades A sulfatadas em C-2 e substituída nos carbonos 4 e 6 pelo acetal de ácido pirúvico (para cada 40 unidades

monossacarídicas 1 é piruvatada). Esta substituição é confirmada pela presença do derivado 2-CD₃Gal (2,4 mol%) na trideuterometilação da galactana dessulfatada (Tabela-8).

TABELA-7 ANÁLISE DE METILAÇÃO DAS GALACTANAS C2S-3, C2S-3D E C2S-3T.

Derivado ^a	C2S-3	C2S-3D	C2S-3T
<i>Unidades A</i>			
2,4,6-Gal	3,0	42,6	4,0
4,6-Gal	31,4	2,0	33,7
2,4-Gal	-	2,0	
4-Gal ^b	9,8	-	9,0
Gal	2,5	-	2,5
<i>Unidades B</i>			
2,3,6-Gal	7,5 ^c	23,4 ^c	7,7
2,3-Gal	13,2 ^c	-	-
3-Gal ^b	2,4	-	-
2AG	12,1 ^c	23,6 ^c	24,2
AG	13,6	2,0	16,0
<i>Unidades A e/ou B</i>			
2,6-Gal	2,2	-	-
2-Gal	-	2,4	-
<i>Unidades terminais</i>			
2,3,4-Xil	2,3	2,0	2,9
2,3,4,6-Gal	-	-	-

^aMol% de monossacarídeo contendo grupos metil ou trideuterometil nas posições indicadas.

^bDeterminado após hidrólise ácida, redução com NaBD₄ e acetilação. A proporção relativa de 4- e 3-Gal foi determinada usando os fragmentos (*m/z*) 132 and 133, respectivamente.

^cAnálise de CG-EM mostrou grupo metil natural em C-2.

Em resumo, C2S-3 apresenta a maioria das suas unidades A (91%) sulfatadas em C-2, representadas por unidades de β-galactose 2-sulfato, β-

galactose 2,6-dissulfato, β -galactose 2-sulfato 6-xilosil e 4,6-O-(1'-carboxietilideno)- β -D-galactose 2-sulfato. Os 9% restantes das unidades A são não sulfatadas (β -galactopirranose).

Com relação às unidades B da fração C2S-3, podemos observar na Tabela-7 a presença de 7,5 mol% do derivado 2,3,6-Gal na metilação da galactana nativa. A análise por CG-EM (Tabela-8) demonstrou que parte deste derivado (4,5 mol%) é proveniente de unidades não substituídas, devido a presença do derivado 2,3,6-CD₃Gal, e que o restante (3,0 mol%) são substituídas por grupo metil em C-2 (2Me-3,6-CD₃Gal). Esta galactana é também constituída por unidades B substituídas em C-6, devido a presença de 13,2 mol% do derivado 2,3-Gal, presente na metilação do polímero nativo (Tabela-7). Parte destas unidades sulfatadas em C-6 (2,3 mol%) são naturalmente metiladas em C-2, como comprovado pela presença do derivado 2Me-3-CD₃Gal entre os produtos de hidrólise do polissacarídeo permetilado (Tabela-8). A presença do derivado 3-CD₃Gal (Tabela-8) demonstra que 2,4 mol% das unidades B são substituídas em C-6 e C-2 por grupos sulfato. Estas substituições foram confirmadas pela análise de metilação comparativa do polímero nativo e dessulfatado.

Com relação às unidades de 3,6-anidrogactose, observamos na Tabela-7 a presença de 13,6 mol% do derivado AG entre os produtos de hidrólise do polímero nativo permetilado. A metilação da galactana dessulfatada confirmou que este derivado corresponde a unidades de 3,6-anidrogactose 2-sulfato (11,4 mol%), desde que entre os produtos de hidrólise do polímero dessulfatado foi observado um aumento proporcional do derivado 2AG (12,1→23,6 mol %). A baixa porcentagem (2 mol%) de AG observado na galactana C2S-3D, pode ser correspondente a unidades anidrogactosídicas que não foram dessulfatadas durante o processo de solvólise.

TABELA-8 TRIDEUTEROMETILAÇÃO DA GALACTANA NATIVA C2S-3 (N) E DA PARCIALMENTE DESSULFATADA (D).

Derivado	Composto por	Unidade Correspondente		%		(m/z) ^a
		N	D	N	D	
2,4,6-Gal	2,4,6-CD ₃ Gal	G	G + G2S + G2,6S	3,0	42,6	
4,6-Gal	4,6-CD ₃ Gal	G2S	G2S / G2R	31,4	2,0	
2,4-Gal	2,4-CD ₃ Gal		G2S6X	-	2,0	
4-Gal ^b	4-CD ₃ Gal	G2,6S + G2S6X		9,8	-	132, 192
2-Gal	2-CD ₃ Gal		GP2S	-	2,4	
Gal	Gal	GP2S		2,5	-	
2,3,6-Gal	2,3,6-CD ₃ Gal	D / L	D / L + D6S + L6S + D2,6S / L2,6S	4,5	17,8	107, 120, 167
	2Me-3,6-CD ₃ Gal	D2M / L2M	D2M / L2M + L2M6S / D2M6S	3,0	5,6	104, 117, 164
2,3-Gal	2,3-CD ₃ Gal	D6S ^c		7,6	-	107, 120, 167
		L6S ^c		3,3	-	
	2Me-3-CD ₃ Gal	L2M6S / D2M6S		2,3	-	104, 117, 164
3-Gal ^b	3-CD ₃ Gal	D2,6S / L2,6S		2,4	-	133, 193
2AG	2-CD ₃ AnGal	DA	DA + LA2S / DA2S	3,5	14,9	120
	2Me-AnGal	LA2M	LA2M	8,6	8,7	117
AG	AG	LA2S / DA2S	LA2S / LA2R / DA2S / DA2R	13,6	2,0	
2,6-Gal	2,6-CD ₃ Gal	G4S / D3S / L3S		2,2	-	
2,3,4-Xyl	2,3,4-CD ₃ Xyl	X	X	2,3	2,0	

CD₃ = Trideuterometil;

^aFragmentos usados para determinar as proporções relativas dos alditóis acetato parcialmente metilados e parcialmente trideuterometilados.

^bDeterminado após hidrólise ácida, redução com NaBD₄, acetilação e análise em CG-EM.

^cAs indicações enantioméricas foram baseadas nas análises enantioméricas do conteúdo de 3,6-anidrogactose na galactana nativa e na submetida a tratamento alcalino.

(/ = e/ ou, - = não detectado).

A análise por CG-EM do polímero dessulfatado confirmou que o derivado 2AG é composto tanto por 2-CD₃AnGal (14,9 mol%) quanto por 2Me-AnGal (8,7 mol%) (Tabela-8). Este resultado confirma, que aproximadamente metade das unidades 3,6-anidrogactosídicas na galactana C2S-3 são sulfatadas em C-2 e a outra metade, são naturalmente metiladas em C-2 ou não substituídas neste carbono.

O tratamento alcalino de C2S-3 (fração C2S-3T), como discutido anteriormente, mostrou um aumento principal de 3,6-anidro- α -D-galactose (4,8% $\rightarrow$ 12,4%) e um pequeno aumento do enantiômero L- (11,0% $\rightarrow$ 14,3%) (Tabela-6). De acordo com a proporção total de unidades α -galactose 6-sulfato na galactana nativa (C2S-3), 7,6% destas unidades pertencem a série D- e 3,3% a L-. Um pequeno aumento foi observado na metilação de C2S-3T do derivado 3,6-anidrogactose, de acordo com a proporção obtida de 2,4% na trideuterometilação do polímero nativo (2,4% de α -galactose 2,6-dissulfato). Quanto ao derivado 3,6-anidro-2-O-metilgalactose é possível observar que este derivado permaneceu constante após o tratamento alcalino (Tabela-6), de acordo com este resultado a trideuterometilação da galactana nativa, mostra a presença de pequena quantidade de 2-O-metilgalactose 6-sulfato (2,3 mol% de 2Me-CD₃Gal, Tabela-8).

Em resumo, as unidades B (α -galactose) são mais heterogêneas quando comparado às unidades A, são compostas por unidades de galactose não substituídas, unidades metiladas em C-2, sulfatadas em C-6, unidades de 3,6-anidrogactose, a qual pode estar sulfatada ou metilada em C-2 ou ainda não-substituídas.

4.1.6- ESPECTROSCOPIA DE RMN DE ¹³C DAS FRAÇÕES C2S-3, C2S-3D.

Antes de apresentar os resultados espectroscópicos de RMN de ¹³C destas galactanas, é importante ressaltar que os espectros obtidos de galactanas extraídas da ordem Halymeniales relatados na literatura são complexos e de difícil

interpretação. Algumas vezes somente o espectro da galactana dessulfatada pode ser interpretado (SEN et al., 2002).

Comparando os espectros de RMN de ^{13}C da fração nativa (C2S-3) e do seu respectivo polímero dessulfatado (C2S-3D) (Figura-4, p. 67), observamos que a dessulfatação modificou alguns sinais.

O espectro da galactana nativa (C2S-3), apresenta poucos sinais na região anomérica quando comparado ao grande número de derivados metilados obtidos na metilação desta fração. Assim, estes deslocamentos químicos podem representar a sobreposição de sinais correspondentes a mais que uma unidade monossacarídica. O espectro de RMN de ^{13}C da galactana C2S-3 apresenta sinais na região anômérica em 102,6 e 98,7 ppm, correspondentes a unidades de β -galactopiranosose ligadas a 3,6-anidro-2-O-metil- α -L-galactose (LAHAYE et al., 1989). Adicionalmente a região anômérica apresenta sinal em 101,1 ppm atribuído a unidades de β -galactose 2-sulfato ligadas a α -D-galactose (6-sulfatada ou não) sinal em 96,1 ppm. Este último deslocamento químico pode ser atribuído também ao C-1 de unidades de 3,6-anidro- α -L-galactose 2-sulfato (MILLER; BLUNT, 2000).

Embora a porcentagem de unidades A piruvatadas seja baixa, foi possível observar tanto no espectro de C2S-3 quanto no de C2S-3D, a presença em campo mais alto do deslocamento químico em 25,0 ppm, referente ao grupo metil (CH_3 -) de acetal de ácido pirúvico. Já o sinal correspondente ao grupo carbonila deste substituinte (175,7 ppm), foi observado apenas no espectro da galactana nativa (GAREGG et al., 1979; CHIOVITTI et al., 1997).

Geralmente a ressonância do carbono acetálico de ácido pirúvico em 101,6 ppm, não é observado no espectro de RMN de ^{13}C , de galactanas de algas vermelhas. Segundo GORIN et al. (1982), o tempo de relaxamento (T_1) do carbono acetálico quaternário pode impedir a sua detecção por espectroscopia de RMN de ^{13}C , mesmo quando este substituinte está presente em uma quantidade significativa. Este sinal pode também estar sobreposto a outros sinais na região anômérica.

De acordo com GAREGG et al. (1979), o sinal do grupo metil de acetal de ácido pirúvico em 25,0 ppm, corresponde a configuração R do acetal. É

importante ressaltar que em polissacarídeos de algas vermelhas só foi encontrado este substituinte na configuração R.

No espectro da galactana C2S-3, é facilmente localizado fora da região anomérica um sinal em 78,0 ppm correspondente a C-2 sulfatado, que desaparece no espectro do polímero dessulfatado (C2S-3D), confirmando os resultados de metilação onde as unidades A são majoritariamente substituídas em C-2 por grupos sulfato em C-2.

Apesar do espectro de RMN de ^{13}C da fração dessulfatada apresentar uma baixa qualidade, devido ao aumento da linha de base, foi possível determinar a presença de sinais correspondentes a unidades de:

- (1) β -galactopirranose (C-1 – C-6: 102,2; 70,0; 81,8; 68,4; 74,9; 60,9 ppm) ligadas a 3,6-anidro- α -L-galactose (C-1 – C-6: 97,8; 69,4; 79,7; 77,3; 75,3; 69,0 ppm) (LAHAYE et al., 1989);
- (2) β -galactopirranose (C-1 – C-6: 102,2; 70,0; 82,3; 68,4; 74,9; 60,9 ppm) ligadas a 3,6-anidro-2-O-metil- α -L-galactose (C-1 – C-6: 98,3; 78,5; 78,1; 77,3; 75,3; 69,0 ppm) (LAHAYE et al., 1989), além de
- (3) β -galactopirranose (C-1 – C-6: 104,4; 70,0; 78,5; 65,2; 74,9; 60,9 ppm) ligadas a α -D-galactopirranose (C-1 – C-6: 95,8; 69,0; -, 78,1; 70,0, 60,9 ppm) (USOV et al., 1980).

No espectro de C2S-3D foi possível ainda observar a presença dos sinais em 65,2 e 66,4 ppm, atribuídos ao C-6 e ao C-5 de 4,6-O-(1'-carboxietilideno)- β -D-galactopirranose. Estas unidades piruvatadas podem estar ligadas a 3,6-anidro- α -L-galactose ou a 3,6-anidro-2-O-metil- α -L-galactose. Segundo MILLER (1998), a piruvatação da unidade A não interfere significativamente nos deslocamentos químicos dos carbonos das unidades B, quando estas unidades forem constituídas por unidades de 3,6-anidro-galactose (da série L- ou D-).

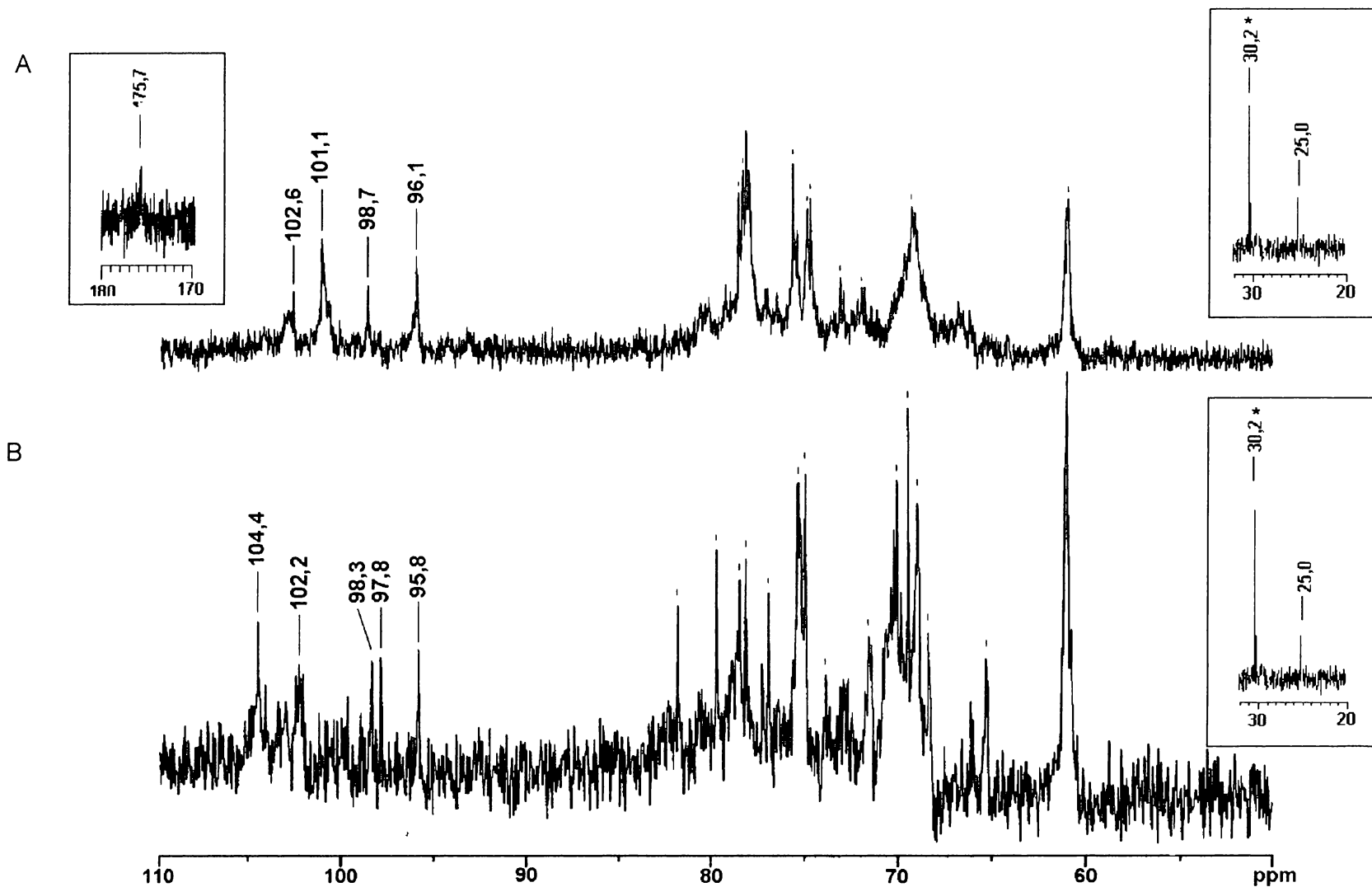
TABELA - 9 SINAIS ANOMÉRICOS (ppm) PRESENTES NOS ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DAS FRAÇÕES C2S-3 E C2S-3D.

Díades	Unidade - A	Unidade – B
G $\rightarrow$ LA ^a	102,2	97,8
G $\rightarrow$ LA2M ^a	102,2	98,3
G $\rightarrow$ D ^a	104,4	95,8
G $\rightarrow$ LA2M ^b	102,6	98,7
G2S $\rightarrow$ D(6S) ^b	101,1	96,1
G2S $\rightarrow$ LA2S ^b	-	96,1

^aDíades de C2S-3.

^bDíades de C2S-3D.

FIGURA-4 ESPECTROS DE RMN DE ^{13}C DAS GALACTANAS C2S-3(A) e C2S-3D (B).



Análise realizada à 60°C em D_2O , concentração das amostras 40 mg/mL.

*Sinal correspondente à acetona utilizada como padrão interno ($\delta = 30.2$ ppm).

4.1.7- ESTUDO DA CINÉTICA DE CICLIZAÇÃO EM MEIO ALCALINO

De acordo com os resultados de metilação e de espectroscopia de RMN de ^{13}C discutidos anteriormente, foi possível observar que a galactana C2S-3 apresenta algumas possibilidades estruturais para ciclização (díades ciclizáveis).

Como pode ser observado nas Tabelas-7 e -8, as unidades A de C2S-3 apresentam-se não sulfatadas e sulfatadas em C-2, numa proporção de 9% e 91%, respectivamente. As unidades B ciclizáveis de α -galactose 2,6-dissulfato e α -galactose 6-sulfato (ambas pertencentes a série D- e/ou -L), estão presentes numa proporção de 11% e 89%, respectivamente.

Estudos cinéticos prévios (NOSEDA et al., 2000), demonstraram que o caráter enantiomérico das unidades B não influenciam a velocidade de ciclização, ou seja a presença de unidades de α -galactose 6-sulfato da série D- ou L- não afetam a cinética.

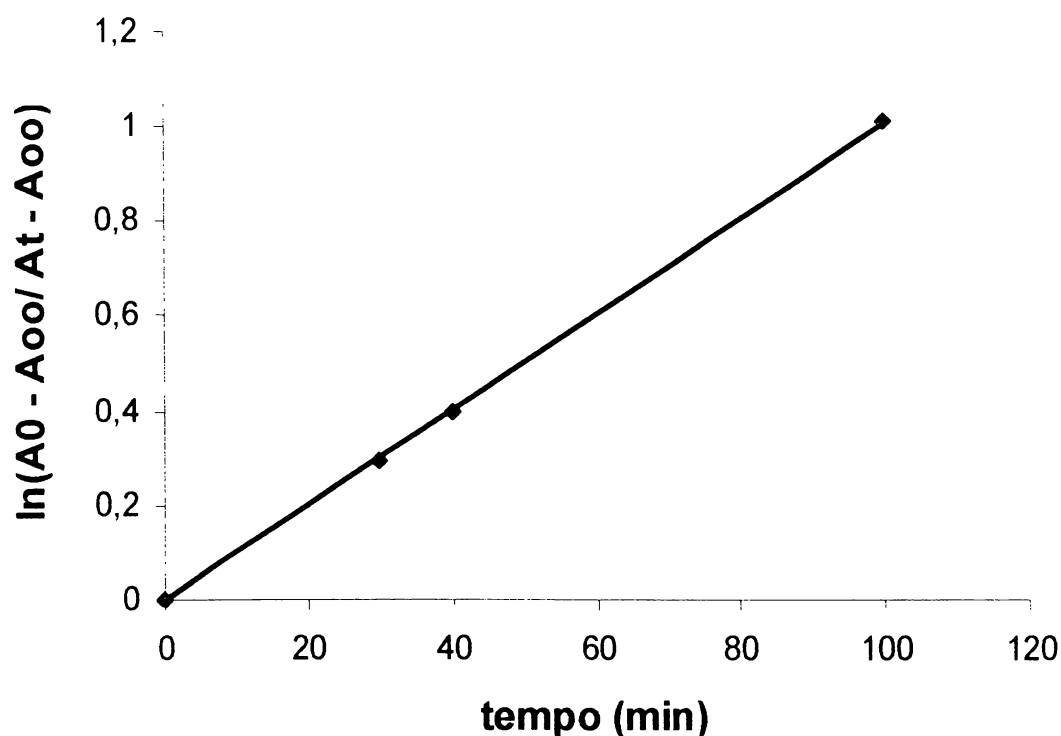
Desta forma a galactana C2S-3 pela presença de duas diferentes unidades A, e duas diferentes unidades B poderia apresentar quatro possíveis díades ciclizáveis (β -galactose 2-sulfato ligada a α -galactose 2,6-dissulfato, β -galactose 2-sulfato ligada a α -galactose 6-sulfato, β -galactose ligada a α -galactose 2,6-dissulfato e β -galactose ligada a α -galactose 6-sulfato). Estas díades determinam a constante (k) da velocidade da reação de ciclização alcalina, e o tempo de meia vida ($t_{1/2}$), que se refere ao tempo necessário de reação para que metade das unidades de α -galactose 6-sulfato sejam ciclizada em seus correspondentes derivados anidrogalactosídicos.

O estudo da cinética de ciclização alcalina da fração C2S-3 foi realizado a 80 °C, meio alcalino (NaOH 1M). Desta solução foram retiradas alíquotas em tempos determinados, e o aumento do teor de 3,6-anidrogalactose foi acompanhado pelo método do resorcinol (YAPHE, 1960). Através do gráfico (Figura-5) foi determinado a constante de velocidade da reação (k) com um valor de $1,7 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$ e o tempo de meia vida (68,6 minutos), Tabela-10.

Estes valores, quando comparados aos de outras galactanas, mostram uma

reação aproximadamente três vezes mais rápida que uma *lambda*-carragenana (β -D-galactose 2-sulfato $\rightarrow$ α -D-galactose 2,6-dissulfato) (CIANCIA et al., 1993), porém mais lenta que uma porfirana (β -D-galactose $\rightarrow$ α -L-galactose 6-sulfato) (NOSEDA et al., 2000) (Tabela-10, p.74). Assim na galactana C2S-3 de *C. crenulata* as unidades A não sulfatadas, como as presentes nas porfiranas aumentam a velocidade da reação de ciclização, enquanto as unidades A sulfatadas em C-2, como nas *lambda*-carragenanas diminuem a velocidade.

FIGURA-5 DETERMINAÇÃO DA CONSTATNE DE VELOCIDADE DA REAÇÃO DE CICLIZAÇÃO DA FRAÇÃO C2S-3 À 80°C.



O tempo de meia vida da reação de ciclização alcalina foi calculado a partir da equação da reta obtida deste gráfico. Equação da reta ($y = 0,0101x$), onde $k = 0,0101$, aplicando este valor na equação $t_{1/2} = \ln 2/k$, assim $t_{1/2} = 68,6$ minutos.

Pela análise de RMN de C^{13} desta galactana, não foi possível definir se unidades de β -D-galactose e β -D-galactose 2-sulfato estavam ligadas a α -galactose 6-sulfato ou a α -galactose, desde que o sinal anomérico destas duas últimas unidades são iguais. Assim a determinação da velocidade de ciclização nesta galactana foi importante para confirmar que tanto unidades de β -D-galactose quanto de β -D-galactose 2-sulfato estão ligadas a unidades precursoras.

A força que dirige a ciclização das unidades precursoras de 3,6-anidrogallactose em meio alcalino é a ionização do HO-3 das unidades B. Nas díades que apresentam grupos sulfato em C-2 das unidades A (*C. crenulata* e *lambda*-carragenanas), a interação deste grupo sulfato com a hidroxila em C-3 (unidade B) é esperada, protegendo a ionização do grupo hidroxil e, assim, reduzindo a velocidade de ciclização. De modo diferente a presença de grupos sulfato em C-4 da unidade A (carragenanas da família *kappa*), apresentam uma reação de ciclização alcalina mais rápida (em torno de 20 a 60 vezes) que as carragenanas da família *lambda*. Portanto a presença de sulfato em C-4 acelera a reação de ciclização alcalina (CIANCIA et al., 1993).

Nas carragenanas a desestabilização da conformação em cadeira ${}^4C_1$ da unidade B e a mudança para ${}^1C_4$ é devido a repulsão entre as cargas negativas dos íons HO-2 e HO-3 das unidades de α -D-galactose 6-sulfato ou do sulfato em C-2 e o íon HO-3 nas unidades de α -D-galactose 2,6-dissulfato.

Recentemente VIANA et al. (2004) estudaram a cinética de ciclização de uma carragenana do tipo *iota/nu*-carragenana, com aproximadamente 21% da estrutura do tipo *nu*-carragenana (100% de díades ciclizáveis de β -D-galactose 4-sulfato ligada a α -D-galactose 2,6-dissulfato). A cinética de ciclização desta galactana a 70 °C ($t_{1/2}$ = 1,5 minutos), foi mais rápida que a de uma *mu/nu*-carragenana parcialmente ciclizada ($t_{1/2}$ = 9,0 minutos a 70 °C) (CIANCIA et al., 1993). Este último tipo de galactana é constituído por aproximadamente 80% de β -D-galactose 4-sulfato ligada a α -D-galactose 2,6-dissulfato e 20% β -D-galactose 4-sulfato ligada a α -D-galactose 6-sulfato. Deste modo foi demonstrado que a presença de grupos sulfato em C-2 das unidades B, em carragenanas da família *kappa*, diminui o tempo de meia vida da reação de ciclização alcalina. A HO-2, por

ser mais ácida (LENZ, 1960; SUGIHARA, 1953) se ioniza primeiro dificultando assim a ionização da HO-3. Deste modo as unidades α -D-galactose 6-sulfato são ciclizadas mais lentamente que as unidades α -D-galactose 2,6-dissulfato.

Desta forma, os resultados obtidos para C2S-3 de *C. crenulata*, mostram a influência do sulfato em C-2 das unidades A, o que torna a ciclização mais lenta que a porfirana, porém mais rápida que uma *lambda*-carragenana. Embora o efeito da substituição por acetal de ácido pirúvico (substituindo os carbonos 4 e 6) sobre a velocidade de ciclização não tenha ainda sido investigada, é possível que tal substituínte exerça um efeito similar a sulfatação em C-4, observada nas *kappa*-carragenanas (CIANCIA et al., 1993). Deste modo a menor velocidade de ciclização de C2S-3, em relação a uma *lambda*-carragenana é explicada pela presença de unidades A sem sulfato em C-2.

TABELA-10 CONSTANTE DA VELOCIDADE E TEMPO DE MEIA VIDA DA REAÇÃO DE CICLIZAÇÃO ALCALINA DE ALGUMAS DÍADES DE CARRAGENANAS E AGARANAS. ^a

Temp. (°C)	Díades					
	G4S→D2,6S G4S→D6S ^b	G→L6S ^c	G→D2,6S ^d	G→D2,6S ^e	G2S→D(L)6S ^f	G2S→D2,6S ^g
80	26,0 (4,5)	4,9 (23,0)	4,8 (24,7)	3,2 (38,3)	1,7 (68,6)	0,67 (170)

^a A constante de velocidade da reação (k) é dada em $\times 10^4 \text{ s}^{-1}$ e o tempo de meia vida (em parênteses) em minutos.

^b Amostra (1C₃)(CIANCIA et al., 1993) *mu/hu*-carragenana parcialmente ciclizada, contendo aproximadamente 80% de G4S→D2,6S e 20% de G4S→D6S de díades ciclizáveis. ^c Porfirana de *Porphyra columbina* (NOSEDA et al., 2000). ^d Valores intermediários das frações T₂₍₂₆₎ e T₂₍₃₅₎ contendo estas díades provenientes da degradação de *lambda*-carragenana (NOSEDA; CEREZO, 1995). ^e Valores intermediários de um di- e em trissacarídeo, proveniente de hidrólise ácida parcial de *lambda*-carragenana, contendo estas díades (NOSEDA; CEREZO, 1995).

^f Fração C2S-3 da galactana de *C. crenulata* contendo aproximadamente 70% de G2S→D6S e 30% de G2S→L6S.

^g *Lambda*-carragenana (1T₂) com 100% de G2S→D2,6S díades ciclizáveis (CIANCIA et al., 1993).

4.1.8- DESPOLIMERIZAÇÃO DA GALACTANA C2S-3

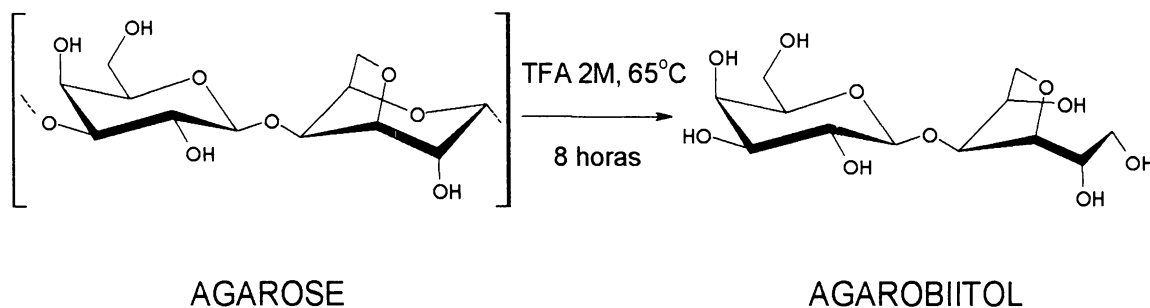
A obtenção de oligossacarídeos é uma ferramenta importante no estudo estrutural de polissacarídeos, tanto para a confirmação da sequência das unidades monossacarídicas, quanto para determinar a configuração enantiomérica e tipo de ligação (PAINTER, 1983). Várias metodologias de hidrólise são observadas na literatura, como: o uso de enzimas específicas (glicosídeses) (PAINTER, 1983), autohidrólise de carragenanas (NOSEDA; CEREZO, 1995), bem como a utilização de ácidos.

A presença típica de unidades de 3,6-anidrogactose nas galactanas de algas vermelhas, que são extremamente sensíveis à presença de ácidos (PAINTER, 1983), levou ao desenvolvimento de técnicas de hidrólise que protegessem este anidro-açúcar.

A hidrólise redutiva parcial, técnica desenvolvida por USOV e ELASHVILI (1991), vem sendo utilizada para a obtenção de oligossacarídeos sulfatados de algas vermelhas, pois esta hidrólise ácida ocorre na presença de 4-metil-morfolina borano (agente redutor estável em meio ácido), resultando numa quebra seletiva das ligações 3,6-anidrogactosídicas. Assim, os oligossacarídeos gerados apresentam em uma de suas extremidades unidades de 3,6-anidrogactitol (Figura-6).

A agarose (polímero constituído de díades repetitivas de β -galactopirranose $\rightarrow$ 3,6-anidro- α -L-gactose), quando submetida as condições de hidrólise redutiva parcial (TFA 2M, 65 °C por 8 horas), resulta unicamente na obtenção do dissacarídeo agarobiitol (Figura-6).

FIGURA-6 ESTRUTURA DA AGAROSE E DO SEU PRODUTO DE HIDRÓLISE REDUTIVA PARCIAL AGAROBIIITOL.



Como pode ser observada na Figura-6, a hidrólise redutiva parcial de galactanas com estruturas repetitivas, como a da agarose, produz oligossacarídeos de baixa massa molecular, quando se utiliza as condições de hidrólise do método original (USOV; ELASHVILI, 1991).

Galactanas do tipo DL-híbridas quando submetidas a hidrólise redutiva parcial originam oligossacarídeos com estrutura de agarana e oligossacarídeos com estrutura de carragenana, ou seja, até o presente nenhum oligossacarídeo com estrutura DL-híbrida foi obtido. Considerando que as galactanas do tipo DL-híbridas apresentam-se constituídas por blocos de agaranas ligados a blocos de carragenanas, estatisticamente é baixa a probabilidade de obtenção de um oligossacarídeo proveniente da zona de junção entre os blocos.

Deste modo, com a finalidade de se obter um oligossacarídeo representativo da molécula original, ou seja, ainda mantendo a estrutura DL-híbrida, a fração C2S-3 foi submetida à hidrólise redutiva parcial, em condições mais brandas (TFA 1,5M, 65 °C por 6 horas) que as do método original (TFA 2M, 65 °C por 8 horas) (USOV; ELASHVILI, 1991).

No presente trabalho, como esperado, foi obtida uma fração oligossacarídica com grau de polimerização elevado como descrito a seguir.

O material hidrolisado obtido foi submetido à cromatografia de troca-iônica em coluna de DEAE-Sephadex A-50, utilizando água destilada como eluente, para retirar o agente redutor (4-metil-morfolina borano) que é co-eluído com os açúcares neutros. Em seguida foi utilizado um gradiente contínuo de NaCl de 0 - 0,5M, e posteriormente um gradiente descontínuo de 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 e 1,0M de NaCl. Neste último tipo de eluição foi observado a presença de açúcar (teste de fenol-ácido sulfúrico) até 0,6M (Figura- 7).

As frações obtidas CA, CB, CC e CD apresentavam grande quantidade de sal, e a solubilização deste material resultaria em um volume muito elevado para aplicação em cromatografia de gel-permeação. Assim, previamente estas frações foram tratadas com DMSO (3 vezes), seguido de precipitação com clorofórmio (3 volumes). Após evaporação do clorofórmio, as subfrações CC (maior rendimento) e CD foram submetidas à cromatografia de gel filtração em coluna de BioGel-P2. Como é possível observar no perfil cromatográfico de gel permeação (Figuras-8 e -9), as subfrações CC e CD eluíram no volume morto, indicando que foram excluídas do gel e conseqüentemente apresentam massa molecular superior a 1800 daltons (limite de exclusão do BioGel P-2). Nesta etapa cromatográfica foi removido o restante de sal contaminante.

Neste trabalho apenas a fração CC foi investigada.

FIGURA-7 PERFIL DE ELUIÇÃO DA CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA (DEAE-SEPHADEX A-25) PRODUTO DE HIDRÓLISE REDUTIVA PARCIAL DA FRAÇÃO C2S-3 DA ALGA *C. crenulata*.

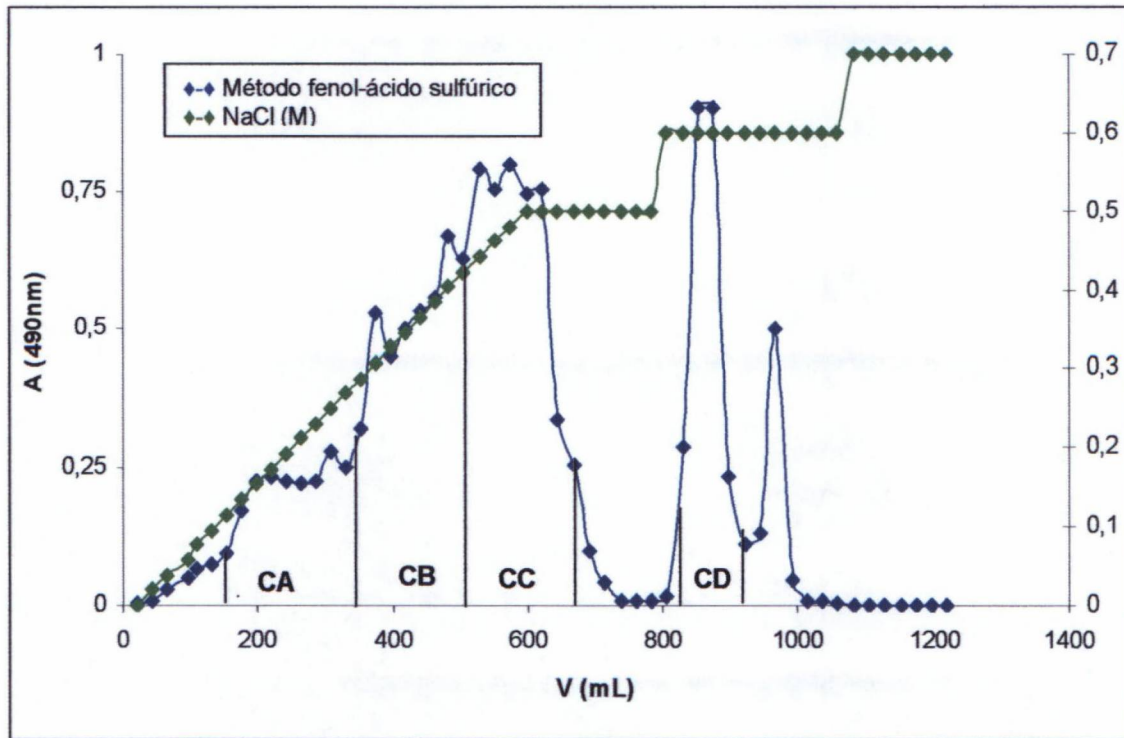


FIGURA-8 PERFIL DA CROMATOGRAFIA DE GEL FILTRAÇÃO (BioGel-P2) DA FRAÇÃO CC.

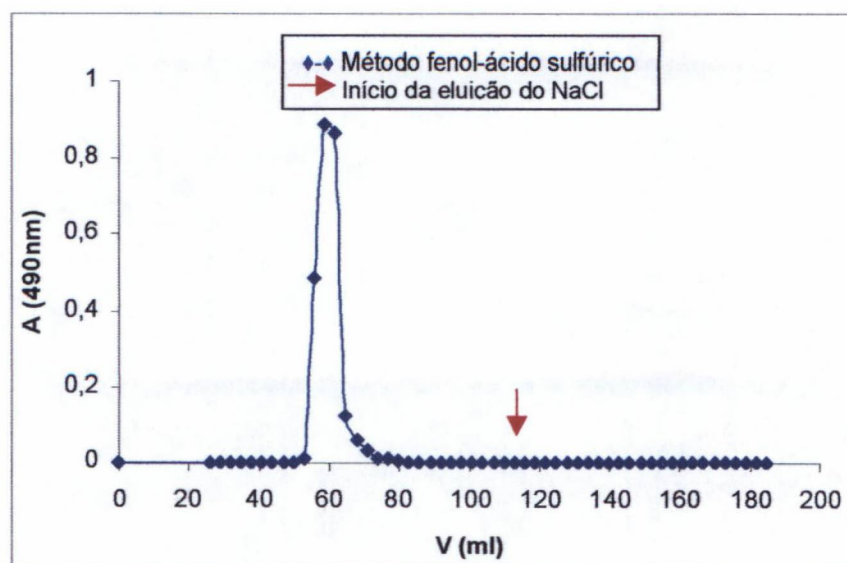
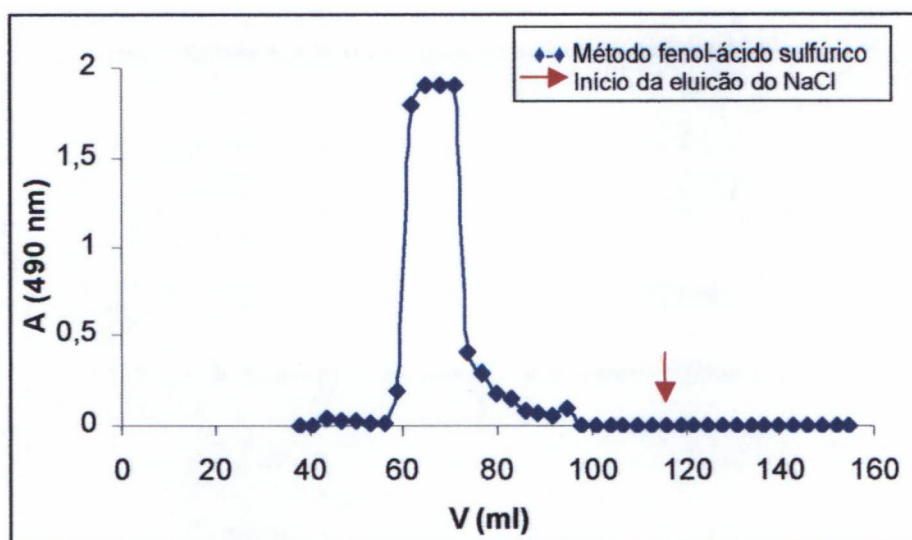


FIGURA-9 PERFIL DA CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO (BioGel-P2) DA FRAÇÃO CD.



A principal sub-fração (CC, 25,3% de sulfato) apresentou um perfil homogêneo por HPSEC-MALLS e em coluna de BioGel P-30 padronizada (Figuras-10 e -11). A massa molecular calculada conforme a eluição dos padrões de dextrana, foi de 25.000 Da. A composição monossacarídica mostra que a fração CC contém galactose, 3,6-anidro- α -galactose e 3,6-anidro-2-O-metil- α -galactose além de 2-O-metilgalactose (Tabela-11).

FIGURA-10 ANÁLISE DE HOMOGENEIDADE DA FRAÇÃO CC POR CROMATOGRAFIA DE GEL PERMEACÃO (HPSEC-MALLS).

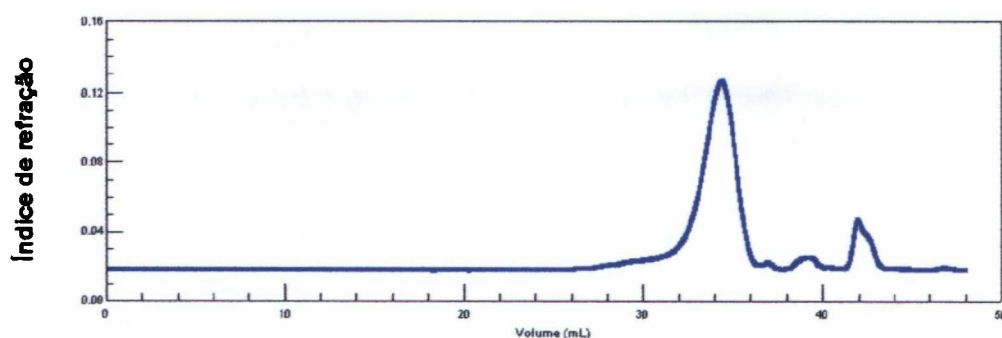


FIGURA-11 ANÁLISE DE HOMOGENEIDADE DA FRAÇÃO CC POR CROMATOGRAFIA DE GEL PERMEAÇÃO (BioGel P-30).

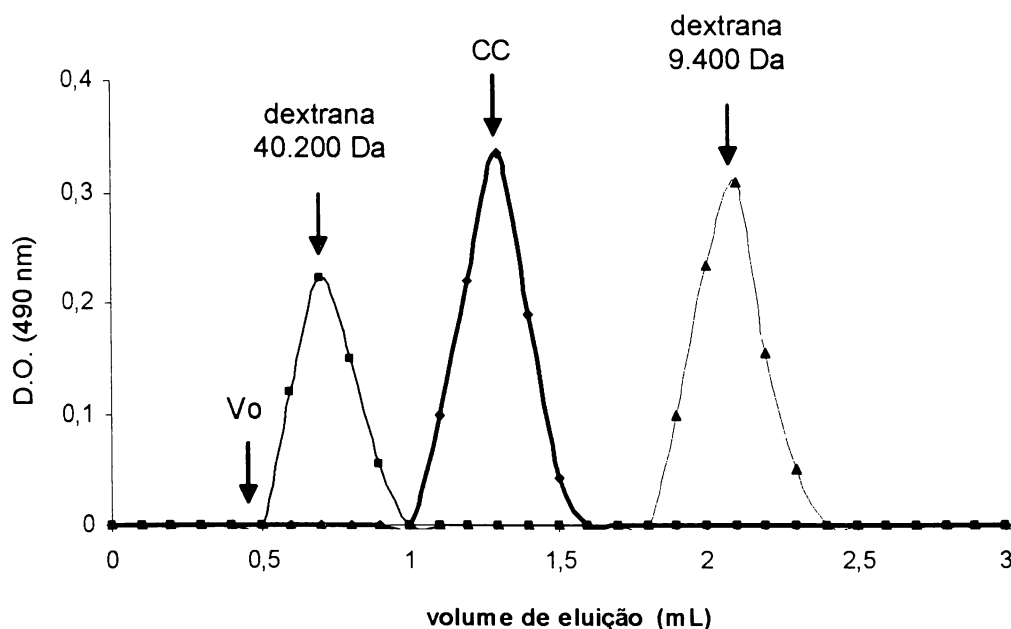


TABELA-11 ANÁLISE DO TEOR DE SULFATO E COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DA FRAÇÃO CC PROVENIENTE DA HIDRÓLISE REDUTIVA PARCIAL DA GALACTANA C2S-3 DE *C. crenulata*.

Fração	Sulfato ^a (%)	Monossacarídeos (mol %)			
		Gal ^b	AG	2AG	2Gal
CC	25,3	63,7	15,4	17,7	3,2

^a Expresso como NaSO₃.

^b Abreviatura dos monossacarídeos (Gal = galactose; AG = 3,6-anidrogactose; 2AG = 3,6-anidro-2-O-metilgalactose e 2Gal = 2-O-metilgalactose)

Comparando a análise da composição monossacarídica, da fração CC (Tabela-11) com o polímero de origem C2S-3 (Tabela-6, p. 59), podemos observar que o tratamento químico não provocou grandes alterações exceto pela ausência

de unidades de xilose e um aumento de aproximadamente duas vezes no teor das unidades de 3,6-anidro-2-O-metil- α -galactose.

A análise de metilação mostrou um padrão de complexidade similar ao observado para a galactana de origem C2S-3 (Tabela-12). A principal diferença encontrada na metilação de CC foi o aumento do derivado 2,4,6-Gal com um concomitante decréscimo de 4,6-Gal, de acordo com hidrólise de grupos sulfato em C-2 das unidades A.

A metilação mostrou ainda uma maior quantidade do derivado 2,3,6-Gal (7,5 – 13,3 mol%), com uma diminuição do derivado 2,3-Gal (13,2 - 9,2 mol%), mostrando que parte das unidades B, também perderam seus grupos sulfato em C-6 (Tabela-12).

O espectro de RMN de ^{13}C da fração CC (Figura –12, p. 83), mostra uma grande quantidade de sinais na região anomérica. Para a análise destes deslocamentos químicos foram necessários os dados de metilação previamente obtidos. O espectro de RMN de ^{13}C da fração CC, apresenta sinais em 62,8, 83,0 e 86,2 ppm, correspondentes aos C-1, C-3 e C-4, respectivamente, de unidades anidrogactosídicas reduzidas (USOV; ELASHVILI, 1991). Ainda é possível observar que algumas ligações anidrogactosídicas não foram hidrolisadas pela presença do sinal de C-1 destas unidades em 98,7 ppm.

Os sinais em 24,9, 175,3 e 101,1 ppm correspondem aos carbonos metílico, carboxílico e acetálico de acetal de ácido pirúvico, respectivamente (GAREGG et al., 1979; GORIN et al., 1982). Enquanto os sinais 104,2 - 104,3 ppm podem, em parte, corresponder ao C-1 de unidades de β -D-xilose e/ou β -D-galactose ligadas ao C-6 das unidades A (USOV et al., 1997).

É possível observar também a presença de sinais em 66,8 ppm (correspondente a C-6 sulfatado) e 65,0 - 64,8 e 63,6 ppm (correspondente a C-6 e C-5 de β -D-galactose piruvatada). Deslocamentos químicos correspondendo a grupos metil de 3,6-anidro-2-O-metilgalactose (59,9 ppm) (LAHAYE et al., 1989) e de 2-O-metilgalactose (58,1 ppm) (USOV et al., 1997) também são observados.

Algumas díades também puderam ser identificadas e estão relatadas na tabela 12, nesta estão presentes díades de carragenana e de agarana mostrando que o caráter DL-híbrido permaneceu neste material despolimerizado.

Comparando as díades obtidas a partir do espectro de RMN de ^{13}C de CC e da galactana de origem C2S-3, observamos que a fração despolimerizada mostrou a presença de díades que não eram observadas no espectro da galactana original C2S-3 (Tabela-13, p. 84).

TABELA-12 ANÁLISE DE METILAÇÃO DA GALACTANA C2S-3 E DA FRAÇÃO CC.

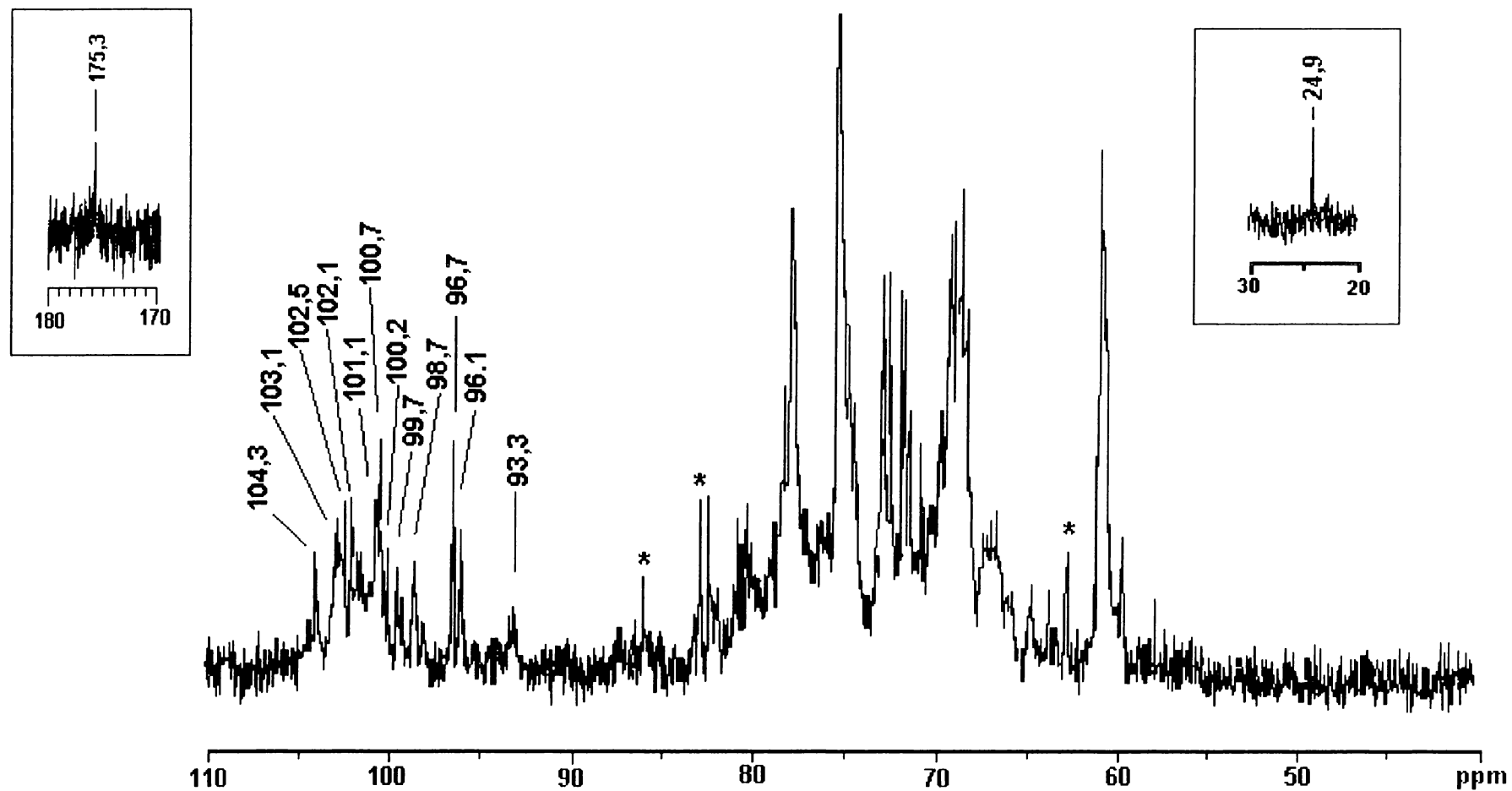
Derivado ^a	C2S-3	CC
<i>Unidades A</i>		
2,4,6-Gal	3,0	17,8
4,6-Gal	31,4	9,2
4-Gal ^b	9,8	4,7
Gal	2,5	7,5
<i>Unidades B</i>		
2,3,6-Gal	7,5 ^c	13,3
2,3-Gal	13,2 ^c	9,2
3-Gal ^b	2,4	-
2AG	12,1 ^c	10,8
AG	13,6	19,2
<i>Unidades A e/ou B</i>		
2,6-Gal	2,2	-
2-Gal	-	3,2
<i>Unidades terminais</i>		
2,3,4-Xil	2,3	2,4
2,3,4,6-Gal	-	2,7

^aMol% de monossacarídeo contendo grupos metil ou trideuterometil nas posições indicadas.

^bDeterminado após hidrólise ácida, redução com NaBH₄ e acetilação. A proporção relativa de 4- e 3-Gal foi determinada usando os fragmentos (*m/z*) 132 and 133, respectivamente.

^cAnálise de CG-EM mostrou grupo metil natural em C-2.

FIGURA -12 ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DA FRAÇÃO CC.



*Sinais de C-1, C-3 e C-4 de 3,6-anidrogallactitol.

Análise realizada à 60°C em D_2O , concentração das amostras 40 mg/mL.

TABELA - 13 SINAIS ANOMÉRICOS (ppm) PRESENTES NOS ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DAS FRAÇÕES C2S-3 E CC.

Díades	Unidade - A	Unidade - B
G $\rightarrow$ LA2M ^a	102,6	98,7
G2S $\rightarrow$ D(6S) e/ou LA2S ^a	101,1	96,1
G $\rightarrow$ D2M	104,3	93,3
G $\rightarrow$ D	104,3	96,1
G(P) ^b $\rightarrow$ L(6S)	103,1	100,7
G(P) ^b $\rightarrow$ LA2M	102,1 – 102,5	98,7
G(P) ^b $\rightarrow$ LA2S	102,1 – 102,5	96,7

^aDíades de C2S-3.

^bUnidades A (β -D-galactopiranoose) que podem estar substituídas por acetal de ácido pirúvico nos carbonos 4 e 6.

A hidrólise redutiva parcial em condições mais brandas aliada à estabilidade de grupos sulfato em C-2 das unidades anidrogalactosídicas, permitiu a obtenção de um despolimerizado rico em unidades de 3,6-anidro- α -L-galactose 2-sulfato (LA2S). Isto pode ser observado pela análise de metilação (Tabela-12), e pelo sinal em 96,7 ppm no espectro de RMN de ^{13}C (Figura-12), correspondente ao C-1 desta unidade.

Este despolimerizado também mostrou um incremento de unidades piruvatadas, pela presença de 7,5 mol% de galactose na análise de metilação.

De esta forma a despolimerização se torna uma ferramenta útil na análise de polissacarídeos complexos.

4.1.9- ANÁLISES GERAIS DA FRAÇÃO C1S

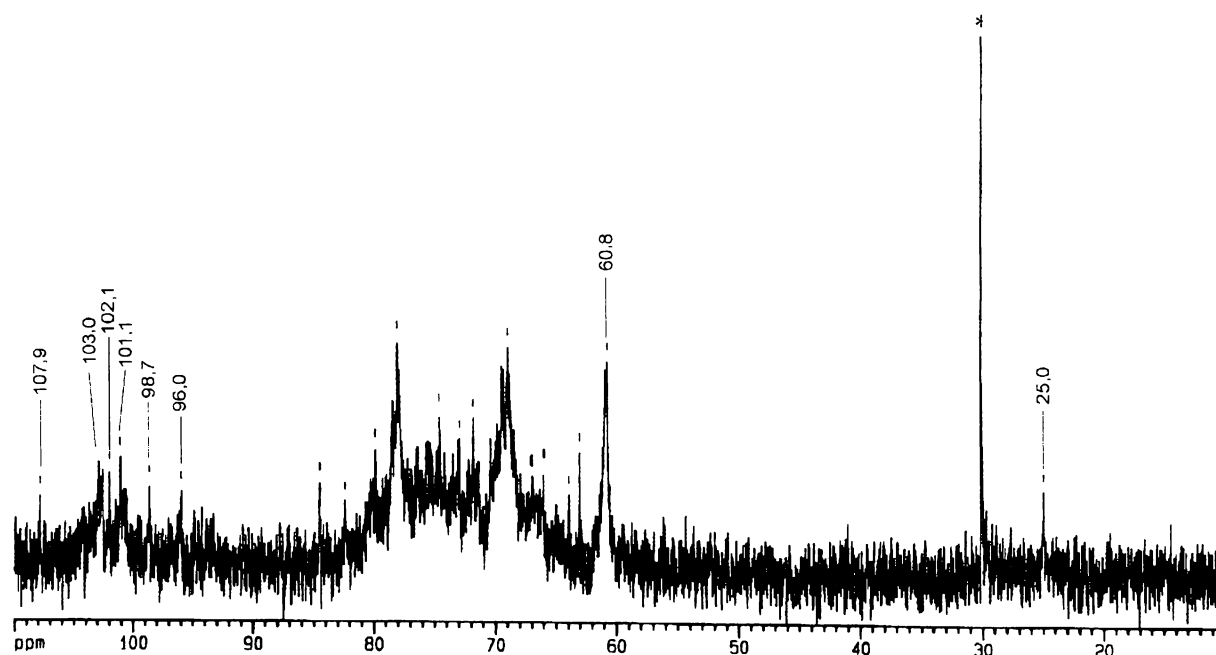
A fração C1S de *C. crenulata*, obtida por extração aquosa a 25°C e subsequente tratamento com KCl 2M (Esquema-2) (ZIBETTI, 2001), representa 94% da fração bruta (C1) que permaneceu solúvel em KCl 2M (Esquema-1, p. 52).

O espectro de RMN de ^{13}C , desta fração solúvel em KCl 2M (Figura-13), apresenta um sinal na região anomérica em 107,9 ppm, que não é comum nos espectros de galactanas de algas vermelhas. Uma possibilidade é que este sinal poderia ser correspondente ao carbono quaternário, de acetal de ácido pirúvico ligado aos carbonos 3 e 4 de unidades de β -galactose (GORIN et al., 1982). Como visto anteriormente a substituição por acetal de ácido pirúvico é comum em algas vermelhas, porém esta substituição só foi observadas nos carbonos 4 e 6 das unidades de β -galactose (HIRASE et al., 1967, CHIOVITTI et al., 1997 e 1998).

Este substituinte (acetal de ácido pirúvico), é comum em polissacarídeos extracelulares de bactérias (GAREGG et al., 1980), e também tem sido observado em polissacarídeos de origem animal (GORIN et al., 1982).

Através da análise do espectro de HMQC da fração C1S (Figura-14), foi possível observar que o sinal em 107,9 ppm está correlacionado com um próton, cujo sinal é 5,08 ppm. Caso o sinal em 107,9 ppm fosse de um carbono acetálico quaternário, este não poderia ter nenhum próton correlacionado. Portanto este sinal não corresponde a substituição de ácido pirúvico nos carbonos 3 e 4 de unidades de β -galactose.

FIGURA-13 ESPECTRO DE RMN de ^{13}C DO EXTRATO C1S DE *C. crenulata*.

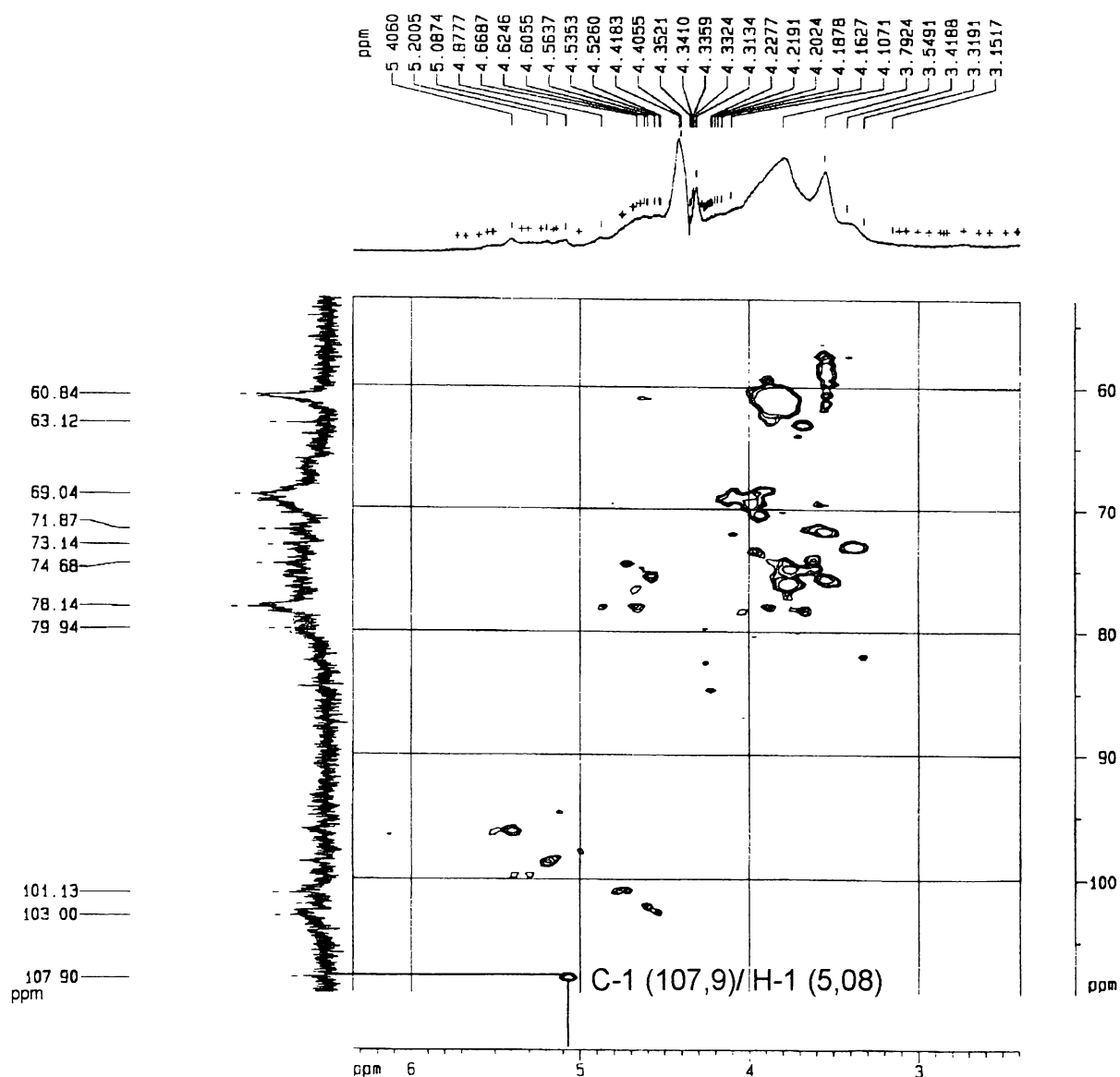


Análise realizada à 60°C em D_2O , concentração das amostras 40 mg/mL.

*Sinal correspondente à acetona utilizada como padrão interno ($\delta = 30,2$ ppm).

Outra possibilidade é que este sinal (107,9 ppm), poderia ser correspondente ao C-1 de unidades de β -D-galactofuranose. Estas unidades furanosídicas também não são comuns em galactanas de algas vermelhas. Porém em uma fração polissacarídica obtida de *Kappaphycus alvarezii* (ESTEVEZ et al., 2004), foi observado um sinal em 109,6 ppm, que poderia ser correspondente a ramificações de uma única unidade de β -D-galactofuranose. A presença deste tipo de unidade não pode ser confirmada, pois o espectro de massa desta fração metilada, hidrolisada e acetilada, não apresentou fragmentação correspondente a 2,3,5,6-tetra-O-metil-galactitol. Desta forma o aparecimento destas unidades galactofuranosídicas poderia ser proveniente de uma contaminação do material.

FIGURA-14 ESPECTRO DE HMQC DA FRAÇÃO C1S DE *C. crenulata*.

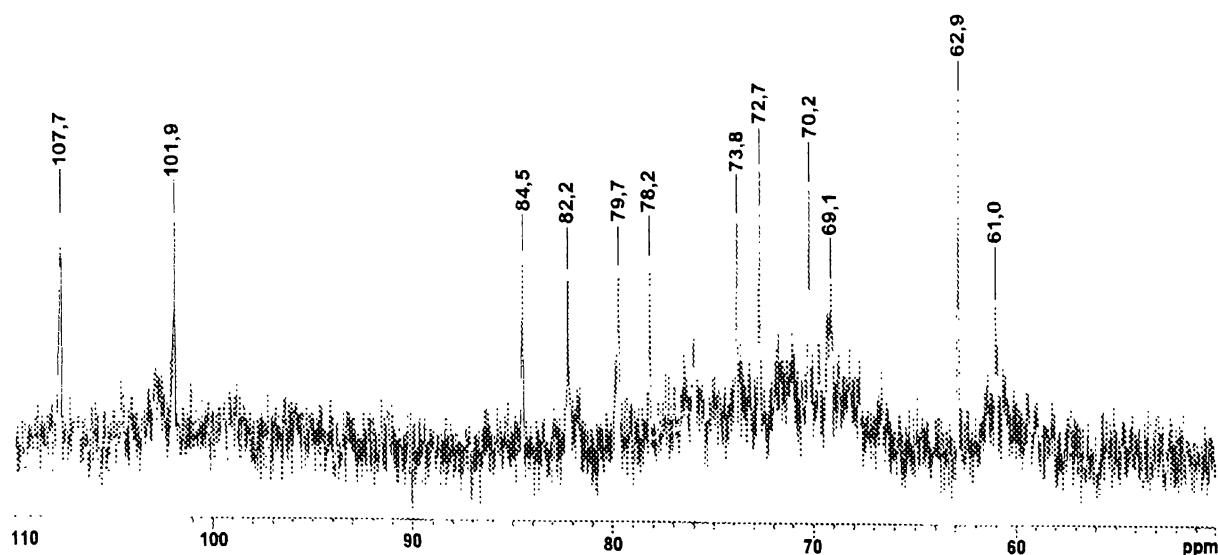


Análise realizada à 60°C em D_2O , concentração das amostras 40 mg/mL.

A partir do re-fracionamento da fração C2S-2 (Esquema-2, p. 53), que também apresentou um sinal em 107,9 ppm no seu espectro de RMN de ^{13}C , em coluna de DEAE-Sephacel foi obtido uma fração, de baixo rendimento, eluída com 0,35M de NaCl (C2S-2a). O espectro de RMN de ^{13}C de C2S-2a mostra

claramente 12 sinais (Figura-15), sendo um destes em 107,7 ppm. Deste modo sugere-se que a presença do sinal em 107,7 ppm nesta e na fração C1S, pode ser proveniente de uma contaminação.

FIGURA-15 FRAÇÃO C2S-2a, OBTIDA ATRAVÉS DO REFRACIONAMENTO DE C2S-2



Análise realizada à 60°C em D₂O, concentração das amostras 40 mg/mL.

4.1.10- PURIFICAÇÃO DE C1S

Como a fração C1S não apresentava um perfil homogêneo por HPSEC-MALLS, foi submetida à cromatografia de troca-iônica em coluna de DEAE-Sephacel, utilizando como eluente água e soluções de NaCl em concentrações crescentes. Deste fracionamento foram obtidas três frações: C1S-1, C1S-2 e C1S-3, eluídas com 0,3, 0,4 e 0,7M de NaCl, respectivamente.

TABELA-14 RENDIMENTO E ANÁLISE QUÍMICA DAS FRAÇÕES DE *C. crenulata*.

Fração	Rendimento (%)	Açúcar Total ^c (%)	Sulfato ^d (%)	Proteína ^e (%)	Ác. Píruvico ^f (%)	[α] _D ^g (°)
C1S	94,0 ^a	63,8	26,0	4,5	7,9	+25,5
C1S-1	9,6 ^b	58,0	22,3	2,6	n.d.	+14,0
C1S-2	18,0 ^b	69,0	26,5	3,3	2,2	+12,0
C1S-3	56,0 ^b	63,0	16,0	2,5	0,7	+12,0

^aRendimento calculado em relação ao extrato bruto C1, submetido ao tratamento com KCl;

^bRendimento calculado em relação a quantidade de C1S, aplicada na coluna de DEAE-Sephacel;

^{c, d, e, f}Determinado pelos métodos: fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS et al., 1956), DODGSON (1961), LOWRY et al. (1951) e KOEPEL e SHARPE (1952), respectivamente.

^gRotação óptica específica das frações polissacarídicas na concentração de 0,2 g% em água, à temperatura de 20°C .

Com relação ao fracionamento do extrato C1S por cromatografia, observa-se que a fração eluída com 0,7M de NaCl (C1S-3) apresentou rendimento notavelmente maior que as outras frações. (Tabela-14)

O valor de rotação óptica específica das subfrações de C1S são positivos, no entanto baixos (+12° - +14°), indicando a presença de unidades pertencentes à série enantiomérica L-.

Analisando a composição monossacarídica das subfrações de C1S, observa-se que todas as frações apresentam composição similar a C1S, com exceção de C1S-2 que contém maior teor de unidades de galactose e quase ausência de unidades 3,6-anidrogallactosídicas.

TABELA-15 COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DA FRAÇÃO C1S E DE SUAS SUB-FRAÇÕES.

Fração	Monossacarídeos (mol %)							
	Gal ^{a,b}		AG ^c		2AG	2Gal ^b		4Gal ^d
	D	L	D	L		D	L	
C1S	53,5 – 9,2		8,5 – 1,7		7,3	6,1 – 1,1		1,7
C1S-1	68,2		12,8		2,5	6,1		-
C1S-2	85,0		1,5		-	6,0		4,1
C1S-3	61,9		8,5		5,4	7,3		-

^a Abreviatura dos monossacarídeos (Gal = galactose; AG = 3,6-anidrogallactose; 2AG = 3,6-anidro-2-O-metilgalactose; 2Gal = 2-O-metilgalactose; 4Gal = 4-O-metilgalactose; 6Gal = 6-O-metilgalactose; Xi = Xilose e Glc = glucose).

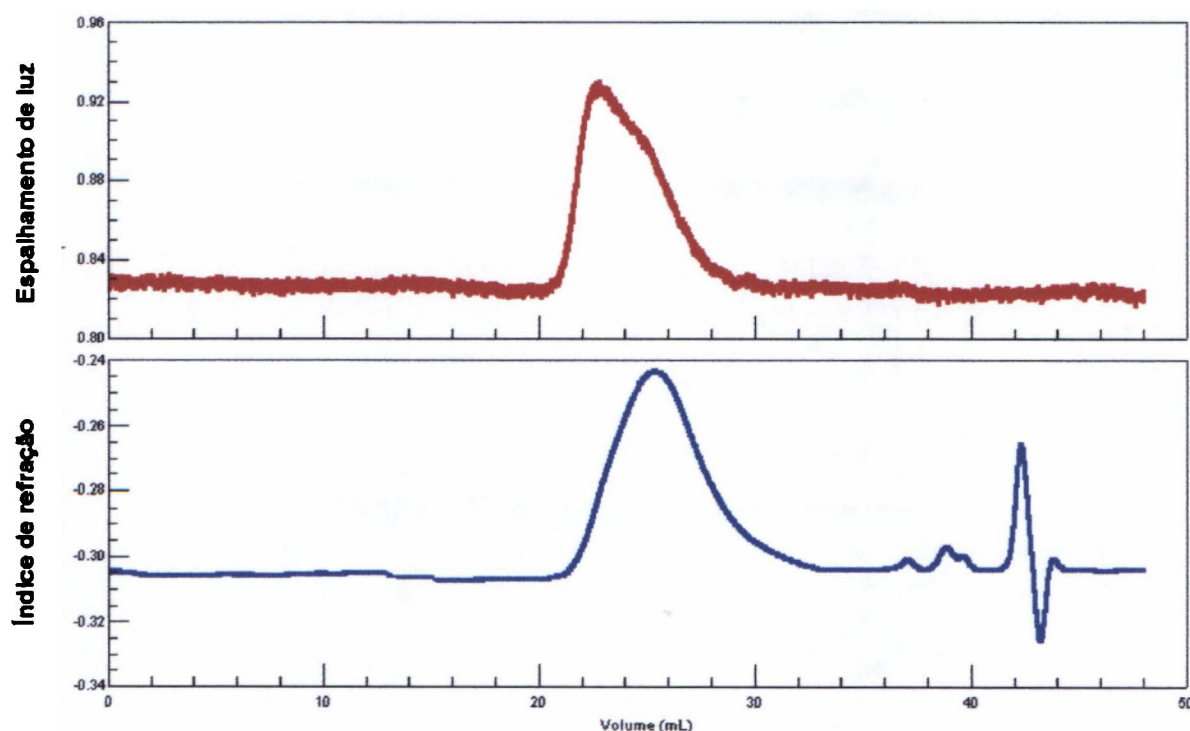
^{b, c} As análises enantioméricas das unidades de galactose e de seus derivados monometilados foram realizados pelo método de CASES et al. (1995), e das unidades anidrogallactosídicas foram realizados pelo método de ERREA et al.(1998), respectivamente.

^d Determinado após hidrólise ácida total, redução com borodeutereto de sódio e análise por CG-EM.

A fração sulfatada C1S-3, de maior rendimento (Tabela-14), mostrou perfil homogêneo por HPSEC-MALLS (Figura-16). Nesta análise o espalhamento de luz nos mostra a massa molecular média deste polímero e o índice de refração a concentração. Portanto pode ocorrer que os volumes de eluição dos dois detectores não coincidam, pois a concentração majoritária pode ser de uma determinada massa. Esta fração apresentou massa molecular média (M_w) de 315.000 Da, a qual foi determinada na variação dos índices de refração ($dn/dc = 0,063$). A composição monossacarídica de C1S-3 mostra a presença majoritária de galactose (61,9 moles %), e em menores proporções xilose, 3,6-anidrogallactose, 3,6-anidro-2-O-metilgalactose, e galactose monometilada em C-2 ou C-6.

É importante ressaltar que o processo de purificação da fração C1S originou três frações, das quais somente uma mostrou um perfil homogêneo, como mencionado anteriormente. Porém todas as frações foram submetidas à espectroscopia de RMN de ^{13}C no intuito de se identificar a fração que pudesse apresentar no seu espectro o sinal em 107,9 ppm, observado no espectro de C1S. No entanto, nenhum dos espectros apresentou o deslocamento químico em 107,9 ppm.

FIGURA-16 ANÁLISE DE HOMOGENEIDADE DA FRAÇÃO C1S-3 POR CROMATOGRAFIA DE GEL PERMEAÇÃO (HPSEC-MALLS).



4.1.11- CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DE C1S-3

4.1.11.1- DESSULFATAÇÃO SOLVOLÍTICA DE C1S-3

Devido à presença de grupos sulfato, a galactana C1S-3 (16,0% de NaSO₃), foi submetida a tratamento solvolítico pelo método de NAGASAWA et al. (1979), da mesma forma que C2S-3 (fração homogênea de *C. crenulata* discutida anteriormente). O intuito deste tratamento químico é determinar o posicionamento dos grupos sulfato, ao comparar os espectros de RMN de ¹³C, bem como os resultados de análise de metilação das galactanas nativa e dessulfatada. A galactana após dessulfatação solvolítica foi denominada de C1S-3D (49% de rendimento), e apresentou 2,1% de NaSO₃, correspondente a remoção de 87% dos grupos sulfato.

TABELA-16 TEOR DE SULFATO E COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DA GALACTANA C1S-3, E C1S-3D DE *C. crenulata*.

Fração	Sulfato ^a (%)	Monossacarídeos (mol %)					
		Gal ^b	AG	2AG	2Gal	6Gal	Xil
C1S-3	16,0	61,9	8,5	5,4	7,3	7,9	9,0
C1S-3D	2,1	79,0	3,6	2,4	11,1	2,4	1,5

^a Expresso como NaSO₃.

^b Abreviatura dos monossacarídeos (Gal = galactose; AG = 3,6-anidrogactose; 2AG = 3,6-anidro-2-O-metilgalactose; 2Gal = 2-O-metilgalactose; 6Gal = 6-O-metilgalactose e Xil = Xilose).

Como pode ser observado na Tabela-16, o tratamento solvolítico modificou de maneira significativa a composição de C1S-3. Além da degradação das unidades anidrogactosídicas houve uma diminuição também das unidades de

xilose e 6-O-metilgalactose. Por outro lado ocorreu aumento de galactose e 2-O-metilgalactose.

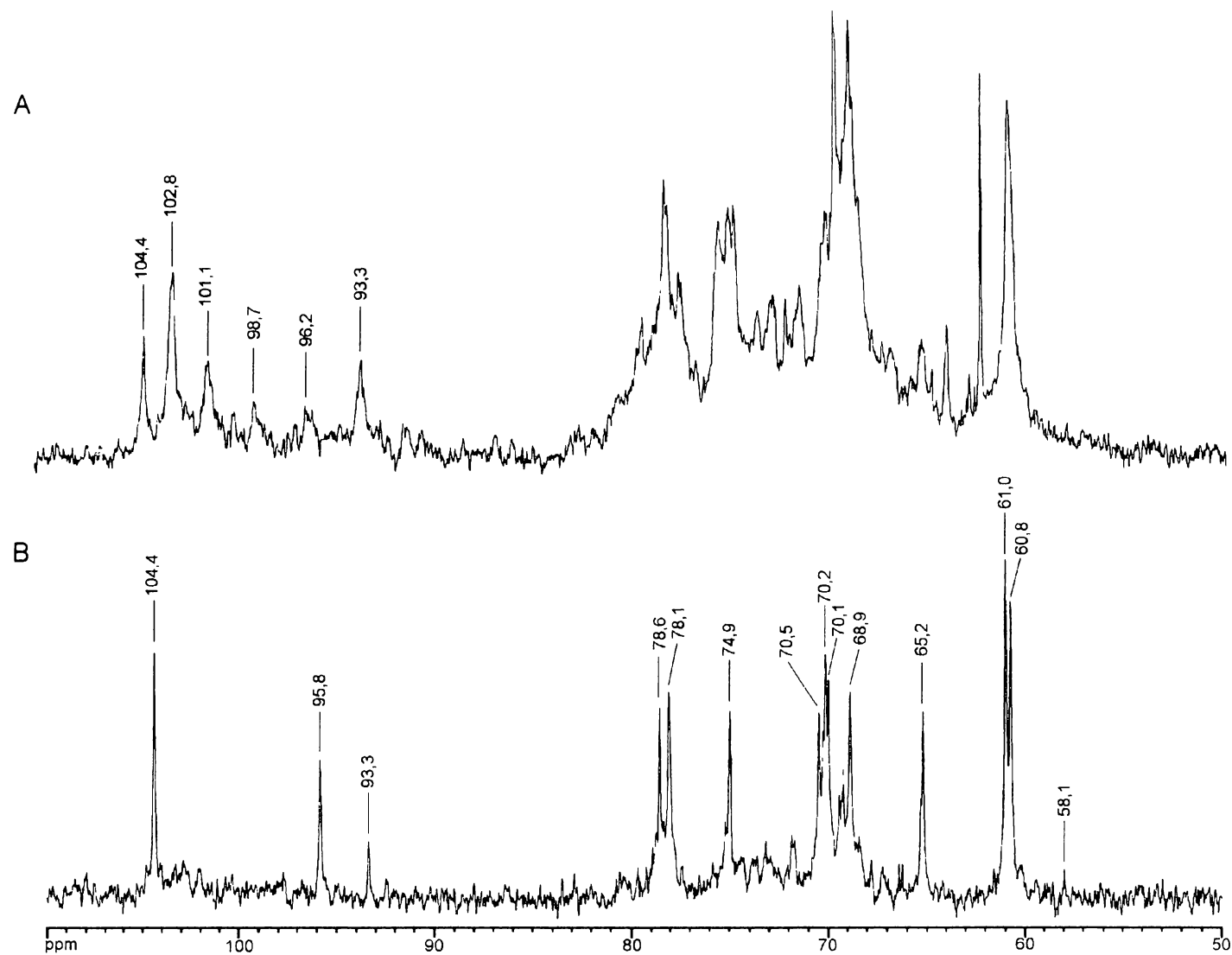
4.1.11.2- ESPECTROSCOPIA DE RMN DE ^{13}C DAS FRAÇÕES C1S-3 E C1S-3D

Os espectros de RMN de ^{13}C das galactanas C1S-3 e C1S-3D estão apresentados na Figura-17, A e B. Na galactana nativa (C1S-3) são observados na região anômérica sinais correspondentes a unidades de β -D-galactose (104,4 ppm) ligada 2-O-metil- α -D-galactose (93,3 ppm), além de sinais correspondentes as unidades de β -galactose (102,8 ppm) ligada a 3,6-anidro-2-O-metil- α -L-galactose (98,7 ppm). Unidades de β -galactose-2-sulfato (101,1 ppm) ligada a α -D-galactose (6-sulfatada ou não) e/ou 3,6-anidro- α -L-galactose-2-sulfato (96,2 ppm) também são constituintes da galactana C1S-3.

Já o espectro da galactana dessulfatada C1S-3D, apresenta sinais correspondentes a díades de β -D-galactose (C-1 - 104,4 ppm; C-2 - 70,2 ppm; C-3 - 78,6 ppm; C-4 - 65,2 ppm; C-5 - 74,9 ppm e C-6 - 60,8 ppm) ligada a α -D-galactose (C-1 - 95,8 ppm; C-2 - 68,9 ppm; C-3 - 70,5 ppm; C-4 - 78,1 ppm; C-5 - 70,1 ppm e C-6 - 61,0 ppm) (USOV et al., 1980) ou a 2-O-metil- α -D-galactose (C-1 em 93,3 ppm, C-2 em 79,4 e grupo metil em 58,1 ppm) (MILLER; BLUNT, 2000b). O sinal em 104,4 ppm pode ser ainda atribuído ao C-1 de unidades de β -D-xilopirranose e β -D-galactopirranose ligadas ao C-6 das unidades A (USOV et al., 1997). A ausência de sinais correspondentes a unidades de 3,6-anidro- α -L-galactose, está de acordo com a composição monossacarídica que mostrava uma degradação deste anidroaçúcar.

O processo de dessulfatação em C1S-3, ocasionou a degradação do polímero, com perda das unidades da série L-, levando à obtenção de um bloco semelhante a uma *lambda*-carragenana dessulfatada, com algumas de suas unidades A substituídas em C-6 por β -D-xilopirranose e β -D-galactopirranose, e parte das suas unidades B metiladas em C-2.

FIGURA-17 ESPECTROS DE RMN DE ^{13}C DAS GALACTANAS C1S-3(A) e C1S-3D (B).



Análise realizada à 60°C em D_2O , concentração das amostras 40 mg/mL.

TABELA - 17 SINAIS ANOMÉRICOS (ppm) PRESENTES NOS ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DAS FRAÇÕES C1S-3 E C1S-3D.

Díades	Unidade - A	Unidade - B
G $\rightarrow$ D2M ^a	104,4	93,3
G $\rightarrow$ LA2M ^a	102,8	98,7
G2S $\rightarrow$ D(6S) ^a	101,1	96,2
G $\rightarrow$ D ^b	104,4	95,8
G $\rightarrow$ D2M ^b	104,4	93,3

^aDíades de C1S-3.

^bDíades de C1S-3D.

4.1.11.3- ANÁLISE DE METILAÇÃO DAS GALACTANAS C1S-3 E C1S-3D.

Na análise estrutural de polissacarídeos sulfatados, para se esclarecer as substituições, é realizado um estudo comparativo entre a metilação dos polímeros nativo e dessulfatado. Como já foi mencionado anteriormente a galactana dessulfatada sofreu degradação, desta forma não permitindo assim a correlação dos resultados de metilação do polímero nativo e do correspondente polímero dessulfatado.

O padrão de metilação de C1S-3 (Tabela-18) é qualitativamente similar a o da fração C2S-3 (Tabela-7), diferindo no aspecto quantitativo.

De acordo com a análise de metilação de C1S-3 (Tabela-18), as unidades A são principalmente não substituídas, devido a presença de 24,0 mol% do derivado 2,4,6-Gal. Unidades A sulfatadas também são observadas nesta galactana, porém em menor proporção, sulfato em C-2 (aproximadamente 3,4 mol%), sulfato em C-6 (aproximadamente 4,6 mol%) e unidades sulfatadas em C-2 e C-6 (2,3 mol%).

Unidades piruvatadas também podem ser observadas em C1S-3, devido a presença de Gal na metilação da galactana nativa (3,3 mol%), correspondente a uma proporção de 1 unidade piruvatada para cada 30 unidades, na galactana C2S-3 este índice foi menor, a cada 40 unidades 1 é piruvatada.

Com relação as unidades B, o predomínio na galactana nativa é de unidades de 3,6-anidrogactose (não substituídas ou metiladas em C-2). Unidades de α -gactose sem substituição também estão presentes numa proporção de 11,5 mol%. De acordo com o sinal de RMN de ^{13}C da galactana C1S-3 (Figura-17A), as unidades de 2-O-metilgactose presentes no polímero original são constituintes das unidades B desta galactana (2-O-metil- α -D-gactose).

Unidades ciclizáveis de α -gactose 6-sulfato se encontram em baixa proporção (3,7 mol%), e por esta razão não foi realizado o tratamento alcalino preparativo, nem o estudo analítico da cinética da reação de ciclização alcalina.

É observado ainda na metilação da galactana C1S-3 a presença dos derivados 2,6-di-O-metilgactose e 2-O-metilgactose, os quais podem ser originados tanto da unidade A (β -gactose 4-O-substituída e β -gactose 4,6-di-O-substituída), quanto das unidades B (α -gactose 3-O-substituída e α -gactose 3,6-di-O-substituída) (MILLER et al., 1995). Ressalta-se, no entanto, que a análise de FTIR da galactana C1S-3 não apresentou absorção em 845 cm^{-1} . Tal fato exclui a presença de sulfato em posição secundária axial (STANCIOFF; STANLEY, 1969). Desta forma os derivados 2,6-di-O-metilgactose e 2-O-metilgactose não representam unidades de β -galactopiranoose 4-sulfato.

Unidades terminais também estão presentes (2,3,4,6-tetra-O-metilgactose e 2,3,4-tri-O-metilxilose), tanto na metilação de C1S-3 como de C1S-3D. Estas unidades glicosídicas estão substituindo o carbono 6 de unidades de β -gactose, de acordo com o sinal em 104,4 ppm no espectro de ^{13}C , que pode ser atribuído a unidades de β -D-xilopiranoose e β -D-galactopiranoose ligadas ao C-6 das unidades A (USOV et al., 1997). Na metilação podemos observar a presença dos derivados 2,4-di-O-metilgactose e 4-O-metilgactose, que podem representar em parte unidades substituídas em C-6 por unidades glicosil.

TABELA-18 ANÁLISE DE METILAÇÃO DAS GALACTANAS C1S-3 E C1S-3D.

Derivado ^a	C1S-3	C1S-3D
<i>Unidades A</i>		
2,4,6-Gal	24,0	40,0
4,6-Gal	6,5	3,1
2,4-Gal	7,6	3,0
4-Gal ^b	2,3	-
Gal	3,3	-
<i>Unidades B</i>		
2,3,6-Gal	11,5	42,6
2,3-Gal	3,7	-
3-Gal ^b	-	-
2AG	16,7	2,0
AG	-	-
<i>Unidades A e/ou B</i>		
2,6-Gal	7,1	-
2-Gal	8,2	3,4
<i>Unidades terminais</i>		
2,3,4-Xil	3,7	2,4
2,3,4,6-Gal	5,4	3,5

^aMol% de monossacarídeo contendo grupos metil nas posições indicadas.

^bDeterminado após hidrólise ácida, redução com NaBD₄ e acetilação. A proporção relativa de 4- e 3-Gal foi determinada usando os fragmentos (*m/z*) 132 and 133, respectivamente.

A análise de metilação da galactana dessulfatada C1S-3D (Tabela-18), demonstra claramente que houve degradação das unidades anidrogalactosídicas, processo este que ocorreu durante a dessulfatação solvolítica, como discutido anteriormente (Tabela-16, p. 86). Aliando ao fato de que o espectro de RMN de ¹³C da galactana C1S-3D (Figura-17B) não apresenta o sinal de 98,7 ppm, referente ao C-1 de 3,6-anidro- α -L-galactose e que no mesmo são observados

apenas sinais de carragenanas, pode-se sugerir que a porção de agarana foi degradada durante o processo solvolítico.

4.1.12- GALACTANAS DL-HÍBRIDAS VERSUS MISTURAS DE DIASTERIOISÔMEROS

Embora galactanas do tipo DL-híbrida sejam isoladas de algas pertencentes a diferentes ordens, a sua existência não foi ainda definitivamente comprovada, desde que um oligossacarídeo de baixa massa molecular, com estrutura DL-híbrida, não foi ainda isolado. Uma hipótese para explicar este fato, seria que as galactanas do tipo DL-híbrida apresentariam uma estrutura em blocos de agaranas e blocos de carragenanas (STORTZ; CERESO, 2000).

A hidrólise redutiva parcial em galactanas do tipo DL-híbrida produz oligossacarídeos de agaranas e oligossacarídeos de carragenanas. Considerando estes resultados e a hipótese de uma estrutura em blocos, a possibilidade da obtenção de um oligossacarídeo DL-híbrido é grandemente reduzida, pois em cada polímero teria apenas poucas regiões de união da estrutura de carragenana e de agarana.

Uma outra possibilidade que não pode ser descartada é que estas galactanas classificadas como do tipo DL-híbrida, possam ser uma mistura de galactanas do tipo agarana e do tipo carragenana. Ressalta-se, no entanto que para a obtenção destas frações, é geralmente realizado um cuidadoso fracionamento de seus extratos brutos, por precipitação diferencial com KCl, cromatografia de troca iônica, bem como outros fracionamentos similares. Neste aspecto, pode-se destacar que as galactanas de *C. crenulata* apresentaram-se homogêneas por análise de HPSEC-MALLS. Esta análise de homogeneidade não é freqüentemente realizada em outros estudos de galactanas classificadas como do tipo DL-híbrida. Além do mais, a galactana C2S-3 originou por hidrólise redutiva parcial um despolimerizado (25.000 Da), com estrutura de carragenana e agarana.

Por outro lado, se a presença de uma mistura de moléculas de agaranas e carragenanas vier a ser comprovada mostraria a insuficiência das técnicas

presentes até então para o fracionamento de misturas de polissacarídeos diastereoisoméricos (ZIBETTI et al., 2005).

Até que se prove o contrário, ao aplicarmos a definição clássica de homogeneidade, estas galactanas podem ser consideradas como do tipo DL-híbrida, com um fracionamento bem sucedido.

4.1.13- ATIVIDADE ANTIHERPÉTICA DAS GALACTANAS DE *C. crenulata* E SUA CORRELAÇÃO COM A ESTRUTURA.

É conhecido que os polissacarídeos sulfatados apresentam uma ampla variedade de atividades biológicas, como ação antiviral e antitumoral, variáveis efeitos no sistema imune, atividade anticoagulante entre outras. Em particular a atividade antiviral, de polímeros polissulfatados de ocorrência natural ou quimicamente sintetizado, tem sido relatada contra vírus envelopados tais como o vírus do herpes simplex tipo 1 (HSV-1) e tipo 2 (HSV-2), vírus da imunodeficiência humana (HIV), citomegalovírus humano e vírus influenza (CARLUCCI et al., 1999; DUARTE et al., 2001, 2004; TALARICO et al., 2004).

Com relação à terapia antiherpética, é importante ressaltar que no presente os agentes disponíveis estão longe de serem um fármaco ideal. O aciclovir é o composto de escolha na clínica tanto para uso tópico quanto sistêmico contra HSV-1 HSV-2 (WITVROUW et al., 1994). Outros nucleosídeos análogos ao aciclovir, todos com mecanismo de ação contra a síntese do DNA viral, têm sido recentemente licenciados para o uso humano. Porém o aparecimento de cepas virais resistentes após tratamento prolongado em pacientes imunocomprometidos é uma das principais razões para se continuar a busca de novos agentes antiherpéticos.

Desta forma os polissacarídeos sulfatados de algas marinhas representam um tipo de composto promissor na terapia antiviral.

Como mostrado anteriormente, os polissacarídeos de *C. crenulata* são altamente sulfatados, e assim algumas frações (C1-C3, C1S, C2S e C2S-1-C2S-4, Esquema-2, p. 53) foram investigadas com relação à sua atividade antiherpética.

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 em TALARICO et al. (2004).

Primeiramente, as frações de *C. crenulata* foram avaliadas quanto à 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% (CC₅₀ concentração que reduz em 50% a viabilidade celular) (Tabela-19). Nenhum efeito citotóxico a células Vero foi observado, mesmo em concentrações maiores que 1000 µg/mL.

TABELA-19 ATIVIDADE ANTI-HSV-1 E ENSAIO CITOTÓXICO DE GALACTANAS ISOLADAS DE *Cryptonemia crenulata*.

Frações	CC ₅₀ ^a (µg/mL)	IC ₅₀ ^b (µg/mL)	SI ^c	VC ₅₀ ^d (µg/mL)
C1	>1000	2,5	>400	n.d.
C2	>1000	0,5	>2000	>20
C3	>1000	1,0	>962	n.d.
C1S	>1000	0,8	>1250	>20
C2S	>1000	0,9	>1111	n.d.
C2S-2	>1000	2,8	>357	n.d.
C2S-3	>1000	0,5	>2000	>20
Heparina	>1000	3,0	>333	>20
DS8000	>1000	2,8	>357	n.d.

^aConcentração citotóxica, ou concentração necessária para reduzir em 50% a viabilidade celular de células Vero após 48 horas de incubação com cada fração. ^bConcentração inibitória, ou concentração que reduz em 50% o número de placas em células Vero. ^cÍndice de seletividade ou CC₅₀/IC₅₀. ^dConcentração virucida, ou concentração necessária para inativar os vírus em 50%, após 1,5h de incubação com as frações. Dados obtidos de 3 ensaios em duplicata. Tabela de TALARICO et al. (2004).

Desta forma foi dada continuidade na 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 representados na forma de IC₅₀.

Como pode ser observado na Tabela-19, os extratos (C1 - C3) foram muito ativos contra o HSV-1 com valores de IC₅₀ variando de 0,5 a 2,8 µg/mL. Como anteriormente apresentado no Esquema-1 (p. 47) os extratos brutos C1 e C2 foram tratados com KCl 2M. A maior parte das frações polissacarídicas permaneceu solúvel em KCl 2M (C1S e C2S). Estas frações C1S e C2S apresentaram atividade similar (0,8 - 0,9 µg/mL) às frações de origem. No entanto, quando a fração C2S foi purificada por cromatografia de troca iônica (Esquema-2), duas galactanas com eficácia antiviral foram isoladas (C2S-3 e C2S-2) (Tabela-19).

No geral, ao compararmos a atividade antiviral contra HSV-1 das frações de *C. crenulata*, com as substâncias de referência (dextrana sulfatada e heparina), observamos uma ação antiviral mais efetiva e índices de seletividade (SI - CC₅₀/IC₅₀) maiores (>2000 - >357) que os compostos de referência (>333 e >357) (Tabela-19).

Tem sido reportado que um aumento da atividade antiviral de polímeros sulfatados está correlacionado a um aumento do grau de sulfatação. Como no caso da fração C2S-3, que tem um alto teor de sulfato (28,3%), e assim apresenta uma alta atividade antiherpética. Porém outra galactana (C2S-2), com grau de sulfatação similar (25,1%) foi menos efetiva.

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

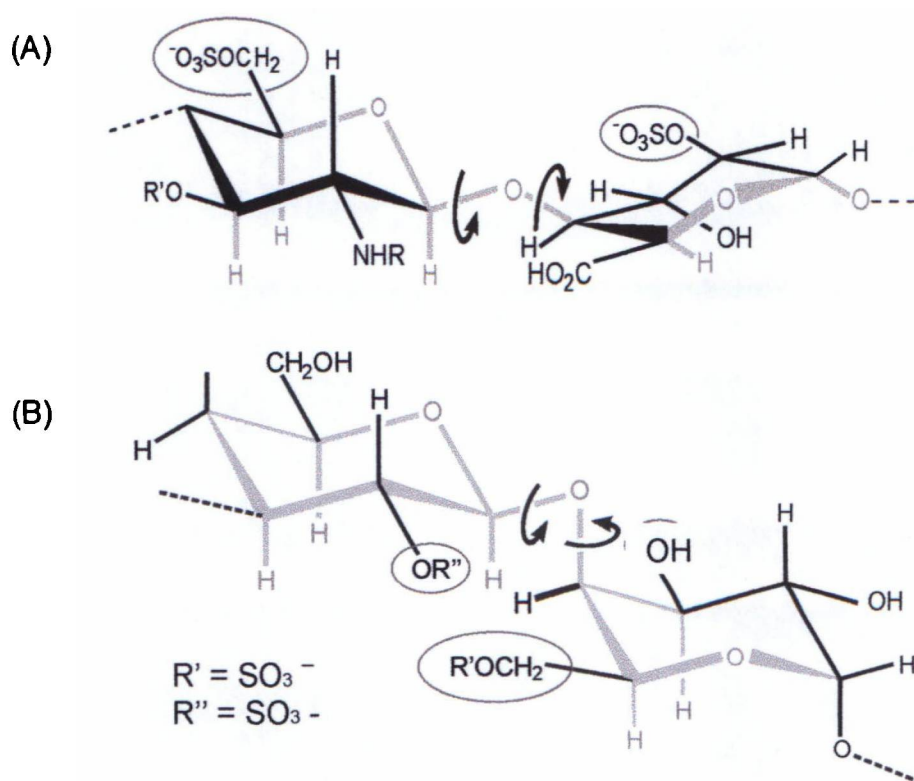
Na fração C2S-3, como visto anteriormente na sua caracterização estrutural, aproximadamente 91% das unidades A desta galactana são sulfatadas em C-2. Parte destas unidades (β-galactopirranose 2-sulfato) estão ligadas a unidades precursoras de 3,6-anidrogactose (α-galactose 6-sulfato e α-galactose 2,6-dissulfato) (unidades B).

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 $[\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-L-(}^1\text{C}_4\text{)-IdoA2-OSO}_3\text{-(1}\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-(}^4\text{C}_1\text{)-GlcNR6'-OSO}_3\text{-(1}\rightarrow]$ com no mínimo 10-12 unidades repetitivas (Figura-18A). DUARTE et al. (2004) ao avaliarem o padrão médio de sulfatação das agaranas de *Acanthophora spicifera*, mostraram a presença de unidades de β -galactopiranosose 2-sulfato ligadas à α -galactose 6-sulfato $[\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-L-(}^4\text{C}_1\text{)-Galp2-OSO}_3\text{-(1}\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-L-(}^1\text{C}_4\text{)-Galp6'-OSO}_3\text{-(1}\rightarrow]$ (Figura-18B). A conformação destas unidades sulfatadas é similar à mínima seqüência do HS, e pode ser responsável pela formação do complexo polissacarídeo-gC e assim pela atividade antiherpética destas galactanas (DUARTE et al., 2004).

Da mesma forma que as agaranas de *A. spicifera*, as galactanas de *C. crenulata*, principalmente a fração homogênea C2S-3, apresenta a díade β -D-galactose 2-sulfato ligada a α -L/D-galactose 6-sulfato, e, desta forma, pela sua analogia estrutural ao heparan sulfato, pode ser atribuída a sua atividade antiviral.

Como foi apresentado anteriormente na caracterização estrutural dos polímeros, no tratamento alcalino das galactanas ocorre a ciclização das unidades de α -galactose 6-sulfato e α -galactose 2,6-dissulfato em suas unidades anidrogalactosídicas, respectivas. CARLUCCI et al (1997) observou que as carragenanas de *Gigartina skottsbergii*, submetidas ao tratamento alcalino, apresentaram 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 ($\text{IC}_{50} > 5 \mu\text{g/mL}$) que a respectiva fração original ($\text{IC}_{50} > 1,4 \mu\text{g/mL}$) (DUARTE et al., 2004). Assim mostra a importância das unidades sulfatadas em C-6.

FIGURA-18 (A) ESTRUTURA DA MÍNIMA SEQUÊNCIA DE LIGAÇÃO DO HEPARAN SULFATO. (B) MÍNIMA ESTRUTURA DE LIGAÇÃO DA AGARANA DE *A. spicifera* (Figura de DUARTE et al., 2004)



As frações C2, C1S e C2S-3 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), e cepas de HSV-2 (G e MS), sendo determinado a IC_{50} destes polímeros. De acordo com os valores observados na Tabela-20, as frações polissacarídicas de *C. crenulata* foram efetivos contra todos os diferentes tipos de herpes vírus ensaiados.

TABELA-20 ATIVIDADE ANTI-HSV-1 E HSV-2 DE GALACTANAS ISOLADAS DE *Cryptonemia crenulata*.

Fração	IC ₅₀ ^a (µg/ml)				
	HSV-1	HSV-1	HSV-1	HSV-2	HSV-2
	B 2006	1C3-syn 13-8	1C3-syn 14-1	G	MS
C2	0,5	1,0	5,2	1,1	0,3
C1S	1,7	1,1	18	0,9	0,2
C2S-3	1,1	0,7	11,7	1,9	0,2
Heparin	1,6	1,1	12,3	1,8	0,6
DS8000	2,1	0,9	15	2,5	0,6

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

Tabela de TALARICO et al. (2004).

Através do ensaio virucida, pode se confirmar que todas as amostras foram incapazes de inativar o HSV-1, uma vez que a interação entre as galactanas sulfatadas e a glicoproteína externa do vírus, pode levar a inativação do vírus e/ou a um bloqueio da ligação do vírus ao receptor da célula hospedeira, durante a etapa de adsorção viral, devido ao sistema experimental utilizado. Portanto, os compostos sulfatados não causam inativação viral.

Para confirmar o efeito inibitório na etapa de adsorção viral, foi realizado um ensaio de redução de placas, adicionando as galactanas em diferentes etapas. 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-21).

TABELA-21 INFLUÊNCIA DOS DIFERENTES PERIODOS DE TRATAMENTO NA ATIVIDADE DAS GALACTANAS DE *Cryptonemia crenulata* CONTRA HSV-1.

Fração	IC ₅₀ ^a (µg/ml)		
	Durante adsorção viral	Após adsorção viral	Durante e após adsorção viral
C2	1,0	>10	0,9
C1S	0,8	>10	1,3
C2S-3	0,5	>10	0,8

^aConcentração 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.

Tabela de TALARICO et al. (2004).

Como foi demonstrado que as galactanas sulfatadas impedem a entrada do HSV na célula hospedeira, seria importante avaliar um uso profilático tópico destes composto.

Desta forma, além das análises *in vitro*, foi também realizado um ensaio *in vivo*, onde ratos BALB foram usados para o ensaio de proteção contra inoculação intravaginal com HSV-2 (MS). Para este fim foi escolhida a fração bruta C2, a qual foi ativa nos ensaios *in vitro* anteriormente analisados.

Antes da inoculação viral, todos os animais foram tratados com medroxiprogesterona, este tratamento é conhecido por aumentar a suscetibilidade de infecção do HSV-2 nos ratos.

Cinco dias após o tratamento com medroxiprogesterona, os animais foram divididos em quatro grupos de dez animais como pode ser observado na tabela-20. No grupo 1 e 2 os animais foram instilados (intravaginalmente) com 50µL de C2 (8 mg/mL de C2 em PBS,, o grupo 3 recebeu 50µL de C2 (0,8 mg/mL de C2 em PBS) e o grupo 4 recebeu somente PBS (placebo). Após 1 minuto de receberem C2 ou placebo, os ratos do grupo 2 - 4 foram inoculados

intravaginalmente com 1×10^5 PFU (unidades formadoras de placas) de HSV-2 (MS), os animais do grupo 1 foram inoculados com PBS para controle de uma possível toxicidade do polissacarídeo. Duas horas após a inoculação (viral ou placebo), uma segunda dose do polissacarídeo foi administrada (nas mesmas doses indicadas anteriormente). Os animais foram acompanhados por 20 dias para verificar a morbidade e a mortalidade.

Os resultados desta análise *in vivo* (Tabela-20), mostra que nenhuma toxicidade foi observada nos animais tratados com C2 (grupo 1), já que não houve mortes dentre este grupo. Por outro lado os animais do grupo 4, tratados somente com placebo, apresentaram 100% de mortalidade, entre 7 e 14 dias após a infecção. Todos os animais inoculados com vírus apresentaram secreção vaginal com alto teor de infecção, na faixa de 10^3 a 10^4 PFU/mL.

TABELA-22 EFEITO DA FRAÇÃO C2 DE *Cryptonemia crenulata* NO TRATAMENTO DA INFECÇÃO VAGINAL COM HSV-2.

Grupo	Tratamento ^a	Mortalidade		(PFU/mL) ^b
		nº de mortos / total (%)	Dias de vida após infecção ± DS	
1	C2 (8 mg/mL) (-1min) PBS (0min) C2 (8 mg/mL) (+2horas)	0/10 (0)	-	-
2	C2 (8 mg/mL) (-1min) HSV-2 (0min) C2 (8 mg/mL) (+2horas)	3/10 (30) ^c	12,3 ± 0,6	<10 ² a 6,6 x 10 ⁴
3	C2 (0,8 mg/mL) (-1min) HSV-2 (0min) C2 (0,8 mg/mL) (+2horas)	8/10 (80)	10,8 ± 2,3	1,4 x 10 ³ a 7,8 x 10 ⁴
4	PBS (-1min) HSV-2 (0min) PBS (+2horas)	10/10 (100)	9,7 ± 1,8	1,4 x 10 ³ a 1,2x 10 ⁵

^aCamundongos BALB receberam inóculos intravaginais com PBS (grupo 1) ou 10⁵ PFU de HSV-2 (grupo 2-4) no tempo 0. Doses de 50 µL de PBS ou C2 (8 ou 0,8 mg/mL solução) foram instilados dentro da vaginal nos tempos indicados pré- (-) ou pós-infecção (+). Os animais foram monitorados diariamente quanto à morbidade e mortalidade. ^bLavagens vaginais foram coletadas por três dias pós-infecção e ensaiadas pela formação de placas em células Vero. Os resultados são expressos numa faixa de ensaios virais para cada rato do grupo. ^c*p* < 0,005.

Quando os animais tratados com C2 (8 mg/mL), um alto nível de proteção foi observado (30% de mortalidade no grupo 2, $p < 0,005$), em comparação aos animais não tratados (100% de mortalidade no grupo 4, $p < 0,005$) (Tabela-22).

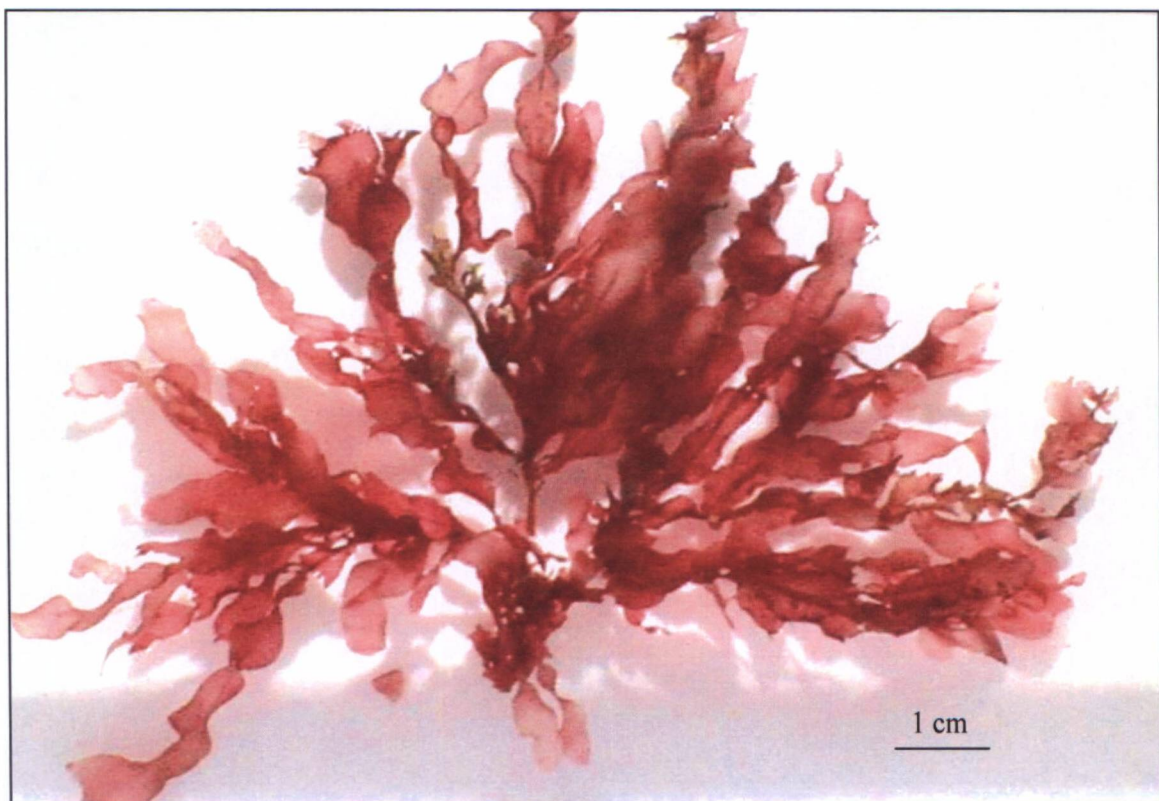
A atividade antiviral de C2 *in vivo* é dose dependente, pois o nível de proteção foi reduzido quando a concentração administrada de C2 foi 10 vezes menor.

Assim, estas galactanas que inibem a entrada do vírus na célula hospedeira, podem ser potencialmente utilizadas na profilaxia antiviral. Os resultados dos ensaios preliminares *in vivo* são encorajadores para futuros ensaios de formulações tópicas com extratos de algas.

4.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO DOS POLISSACARÍDEOS DE *Cryptonemia seminervis*

4.2.1 OBTENÇÃO E ANÁLISES DAS FRAÇÕES BRUTAS DE *C. seminervis*

FIGURA-19 FOTO DA ALGA *C. seminervis*



Posição taxonômica da alga *C. seminervis*:

Divisão: Rhodophyta

Classe: Rhodophyceae

Sub Classe: Florideae

Ordem: Halymeniales

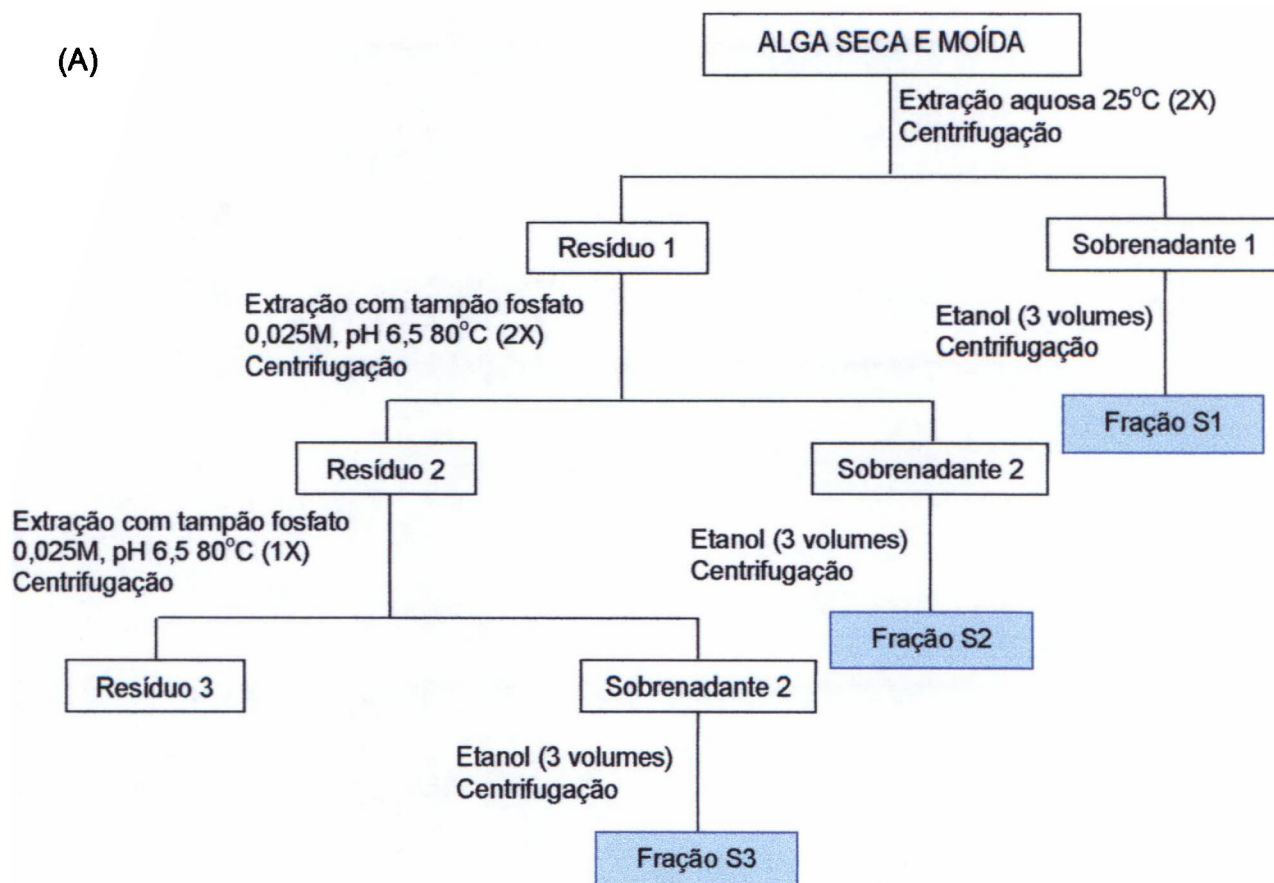
Família: Halymeniaceae

Gênero: *Cryptonemia*

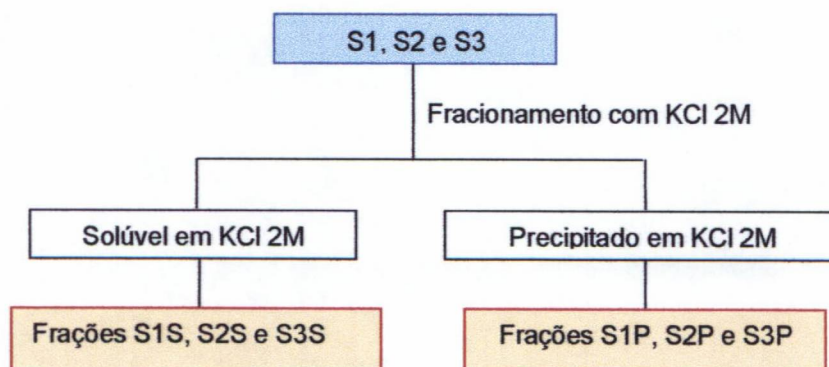
Espécie: *Cryptonemia seminervis* (C. Agardh) J. Agardh

ESQUEMA-3 EXTRAÇÃO (A) E FRACIONAMENTO (B) DOS POLISSACARÍDEOS OBTIDOS DA ALGA *Cryptonemia seminervis*.

(A)



(B)



A alga *C. seminervis* coletada em Marataízes - ES, foi submetida à extração aquosa (1,5 g%), de modo similar a alga *C. crenulata*, para fins comparativos. As extrações aquosas a 25°C foram reunidas e denominadas de S1, representando 1,4% do material inicial (Esquema-3, Tabela-23).

A alga residual (Resíduo-1, Esquema-3) foi submetida a três extrações aquosas sequenciais à 80°C, utilizando como solvente tampão fosfato 0,025M pH 6,5. Este tipo de extração, com o uso de tampão, também tem sido utilizada por MILLER et al. (1995), para extração a quente dos polissacarídeos do gênero *Pachymenia* (antiga ordem, Cryptonemiales atual ordem Halymeniales).

Cada um dos extratos obtidos a 80°C foi separadamente centrifugado, concentrado parcialmente à pressão reduzida e tratado com etanol (3 volumes). Os precipitados da 1ª e 2ª extração a quente foram reunidos e denominados de S2 (6,0% de rendimento), enquanto que S3 se refere a 3ª extração a 80°C (2,3% de rendimento) (Tabela-23). O rendimento total em polissacarídeos solúveis em meio aquoso de *C. seminervis* foi de aproximadamente 10,0%, valor este compatível com o obtido para outras algas da antiga ordem Cryptonemiales (CHOPIN et al., 1994), bem como com os 12,0 % obtidos para *C. crenulata*.

Todas as frações apresentaram-se sulfatadas, porém a extração aquosa á 25°C (S1) apresentou maior porcentagem (27,2%) de grupos sulfato (Tabela-23). O grau de substituição por sulfato em outras galactanas de algas da ordem Halymeniales esta na média de 25%, sendo que em *Kallymenia reniformis* e *Pachymenia camosa* são observadas as maiores porcentagens (37 e 32,5%, respectivamente) (CHOPIN et al., 1994).

TABELA-23 RENDIMENTO E ANÁLISE QUÍMICA DAS FRAÇÕES DE *C. seminervis* OBTIDAS POR EXTRAÇÃO AQUOSA À TEMPERATURA DE 25°C E 80°C.

Fração	Peso (g)	Rendimento ^a (%)	Açúcar total (%) ^b	Sulfato NaSO ₃ (%) ^c	Proteína (%) ^d	[α] _D ^e
S1	1,3	1,4	68,3	27,2	16,8	+9,0
S2	5,5	6,0	75,5	16,4	6,0	-18,5
S3	2,1	2,3	63,7	16,0	10,8	-25,0

^aRendimento calculado em termos de alga seca submetida a extração.

^{b, c, d} Determinado pelos métodos: fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS et al., 1956), DODGSON (1961) e LOWRY et al., 1951, respectivamente.

^eRotação óptica específica das frações polissacarídicas na concentração de 0,2 g% em água, à temperatura de 20 °C.

Utilizando o processo de hidrólise redutiva, as análises de composição monossacarídica (Tabela-24) demonstraram que as frações sulfatadas (Tabela-23) S1 S2 e S3, são constituídas principalmente por galactose (38,0 - 67,3 mol%) e 3,6-anidrogactose (6,5 - 12,9 mol%). Outros monossacarídeos monometilados (6-O-metilgalactose, 3-O- e/ou 4-O-metilgalactose, 2-O-metilgalactose, 3,6-anidro-2-O-metilgalactose) e xilose são observados em baixas porcentagens. A presença de glucose é proveniente de contaminação por glucanas (florideanas das algas vermelhas) (USOV, 1992).

TABELA-24 ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES S1, S2 E S3 DA ALGA *C. seminervis*.

Fração	Composição monossacarídica (mol%)							
	Gal ^a	AG	2AG	2Gal	3/4Gal	6Gal	Xil	Glc
S1	38,0	10,5	1,0	2,1	4,1	9,1	4,4	28,9
S2	53,4	10,6	3,8	1,5	2,8	6,3	2,7	18,7
S3	67,3	12,9	1,7	1,8	2,4	5,9	3,2	4,5

^aAbreviatura dos monossacarídeos (Gal = galactose; AG = 3,6-anidrogallactose; 2AG = 3,6-anidro-2-O-metilgalactose; 2Gal = 2-O-metilgalactose; 3/4Gal = 3-O- e/ou 4-O-metilgalactose; 6Gal = 6-O-metilgalactose; Xil = Xilose; Glc = glucose).

Com a finalidade de purificar as galactanas brutas de *C. seminervis*, foi realizado um tratamento com solução de cloreto de potássio.

As frações S1, S2 e S3, foram solubilizadas em água destilada na concentração de 0,25 g% e tratadas com KCl, com um aumento gradual do sal, até a concentração de 2M (CEREZO, 1967). As frações polissacarídicas S1, S2 e S3 quase na totalidade permaneceram solúveis em KCl 2M, e foram denominadas de S1S, S2S e S3S, respectivamente, enquanto as frações insolúveis foram denominadas de S1P, S2P e S3P.

As frações solúveis em KCl 2M correspondem a 71,0, 97,9 e 85,0% do material submetido ao fracionamento (Tabela-25), como já foi observado para os polissacarídeos de *C. crenulata*, que também permaneceram na sua maioria (mais de 90% das frações) solúveis em KCl 2M.

Como foi demonstrado por ESTEVEZ et al. (2001), para o sistema de galactanas extraídas da espécie *Gymnogongrus torulosus*, os polímeros que permaneceram solúveis em KCl 2M são as agaranas e as galactanas do tipo DL-híbrida.

TABELA 25- RENDIMENTO E ANÁLISE QUÍMICA DAS FRAÇÕES DE *C. seminervis*, OBTIDAS APÓS TRATAMENTO COM KCl .

Frações ^a	Peso (g)	Rendimento (%) ^b	Carboidrato (%) ^c	Sulfato NaSO ₃ (%) ^d	Proteína (%) ^e	[α] _D ^f
S1S	0,92	71,0	72,2	15,9	4,3	-20,0
S1P	0,38	29,0	65,9	18,9	27,0	+64,0
S2S	5,38	97,9	74,8	19,9	4,2	-20,0
S2P	0,12	2,1	44,3	6,4	18,8	+70,2
S3S	1,78	85,0	63,2	19,5	1,3	n.d
S3P	0,32	15,0	54,3	4,9	21,3	n.d

^aS1S, S2S e S3S correspondem as frações solúveis em KCl 2M; S1P, S2P e S3P correspondem às frações precipitadas em KCl 2M.

^bRendimento calculado em relação aos extratos brutos (S1, S2 e S3), submetidos ao tratamento com KCl, na concentração de 0,25 g%;

^{c, d, e}Determinado pelos métodos: fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS et al., 1956), DODGSON (1961) e LOWRY et al. (1951), respectivamente.

^fRotação óptica específica das frações polissacarídicas na concentração de 0,2 g% em água, à temperatura de 20°C.

Como pode ser observado na Tabela-25, as frações insolúveis em KCl 2M (S1P, S2P e S3P) apresentaram maior porcentagem de proteínas, que as correspondentes frações solúveis. Em relação ao teor de sulfato, podemos observar que as frações solúveis são mais sulfatadas que as frações precipitadas com KCl 2M, com exceção de S1P (18,9 % de NaSO₃).

As frações insolúveis apresentam ainda uma rotação óptica positiva (+64,0° e +71,2° para S1P e S2P, respectivamente); estes valores são similares aos encontrados para as carragenanas (em torno de +70°) (ESTEVEZ et al., 2001).

Na Tabela-26, observamos alta porcentagem de glucose (11,8 - 19,0 mol%) na composição monossacarídica das frações precipitadas em KCl 2M. A presença de

glucose é atribuída ao polímero de reserva das algas vermelhas uma α -D-glucana, denominada de amido das florídeas. A presença deste polímero de glucose justifica a rotação óptica positiva das frações S1P - S2P. Por outro lado, é possível observar baixa porcentagem de glucose na composição monossacarídica das frações solúveis; assim o amido das florídeas pode ter co-precipitando com os polímeros presentes das frações S1P - S3P, deixando as frações S2S - S3S livres deste contaminante, amplamente encontrado nas rodofíceas. A fração S1S continua apresentando elevada porcentagem de glucose (17,7 mol%).

Embora o amido das florídeas seja solúvel em água, segundo VAN DE VELDE et al. (2002), este polímero pode acompanhar as galactana do tipo carragenana tanto no processo de extração quanto nos passos de precipitação destas.

As frações S1P, S2P e S3P não foram estudadas com mais detalhes no presente trabalho.

As análises de composição monossacarídicas (Tabela-26) demonstram que as frações solúveis em KCl 2M, S1S, S2S e S3S, são constituídas principalmente de galactose (73,6 - 61,5 mol%), 3,6-anidrogallactose (13,2 - 6,7 mol%) e 6-O-metilgalactose (6,9 - 8,4 mol%). Outros monossacarídeos monometilados (3-O- e/ou 4-O-metilgalactose, 2-O-metilgalactose e 3,6-anidro-2-O-metilgalactose) e xilose são observados em baixas porcentagens, como também apresentou as frações que lhe deram origem S1, S2 e S3.

Ao comparar estes dados de composição monossacarídica com os obtidos para as frações de *C. crenulata* solúveis em KCl 2M, observamos algumas diferenças, como por exemplo, a fração S1S de *C. seminervis* não apresenta 3,6-anidro-2-O-metilgalactose e a fração S3S apresentou apenas 2,0 mol% deste monossacarídeo metilado. As correspondentes frações solúveis obtidas de *C. crenulata* apresentam maior quantidade de 3,6-anidro-2-O-metilgalactose (5,0 - 6,2 mol%). Nas frações de *C. crenulata* as unidades de 6-O-metilgalactose aparecem em baixas porcentagens (1,5 - 1,4 mol%), enquanto nas frações de *C. seminervis* na porcentagem de 6,9 - 8,4 mol%.

TABELA-26 ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES DE *C. cseminervis* SOLÚVEIS EM KCl 2 M.

Fração	Composição monossacarídica (mol%)							
	Gal ^a	AG	2AG	2Gal	3/4Gal	6Gal	Xil	Glc
S1S	61,5	6,7	-	2,1	3,6	6,9	1,5	17,7
S1P	20,8	27,2	-	-	-	33,0	-	19,0
S2S	69,2	10,0	5,4	1,7	1,2	7,0	2,9	2,4
S2P	52,5	12,2	-	-	-	16,7	-	18,6
S3S	64,3	13,2	2,0	1,7	2,3	8,4	4,3	3,8
S3P	60,0	16,3	-	1,6	-	5,7	4,6	11,8

^a Abreviatura dos monossacarídeos (Gal = galactose; AG = 3,6-anidrogactose; 2AG = 3,6-anidro-2-O-metilgalactose; 2Gal = 2-O-metilgalactose; 3/4Gal = 3-O- e/ou 4-O-metilgalactose; 6Gal = 6-O-metilgalactose; Xi l= Xilose; Glc = glucose).

As Figuras 20, 21 e 22 mostram os espectros de RMN de ¹³C das frações obtidas após tratamento com KCl 2M (S1S, S2S e S3S).

É possível observar a grande heterogeneidade química destas frações em função do grande número de sinais, e em alguns casos seu alargamento.

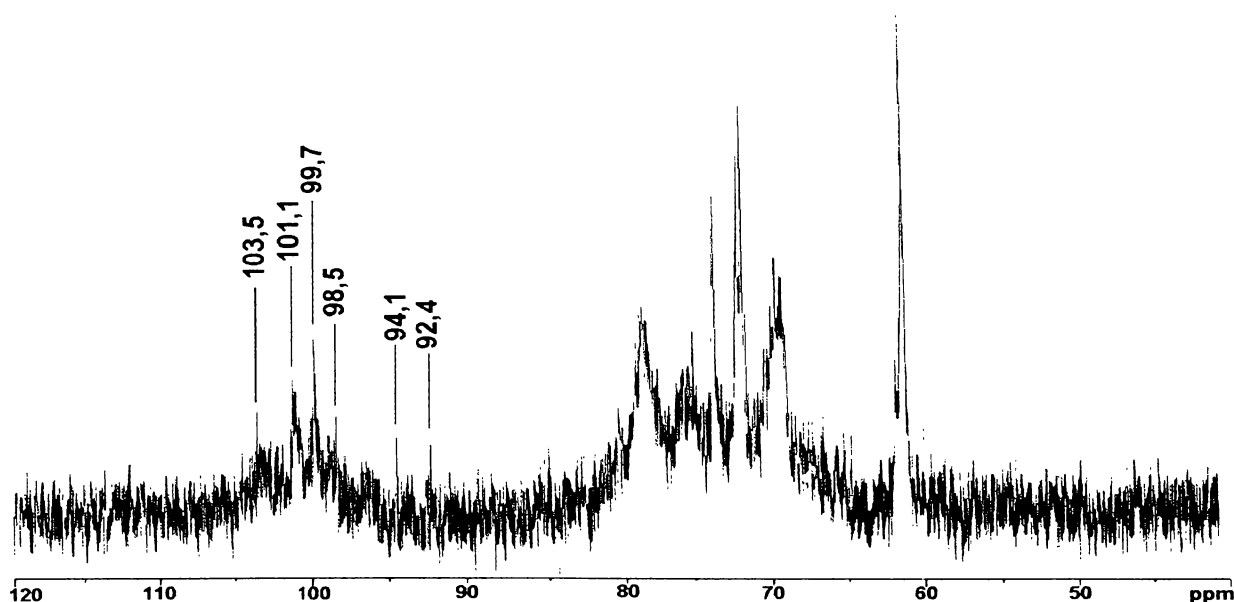
Na região anomérica (90 - 110 ppm) dos espectros das frações S1S, S2S e S3S, percebe-se que existe um mesmo grupo de sinais (92 - 104,0 ppm), decorrentes da semelhança de composição monossacarídica das frações (Tabela-26).

O espectro da fração S1S apresenta um sinal em 99,7 ppm, de maior intensidade que as frações S2S (99,6 ppm) e S3S (99,7 ppm). Este sinal pode ser atribuído ao C-1 de unidades de α-D-glucopiranosose (4-O-ligadas), correspondentes ao amido das florídeas (FALSHAW et al., 1998). A intensidade deste sinal está de

acordo com a alta porcentagem de glucose (17,7 mol%) na composição monossacarídica da fração S1S (Tabela-26).

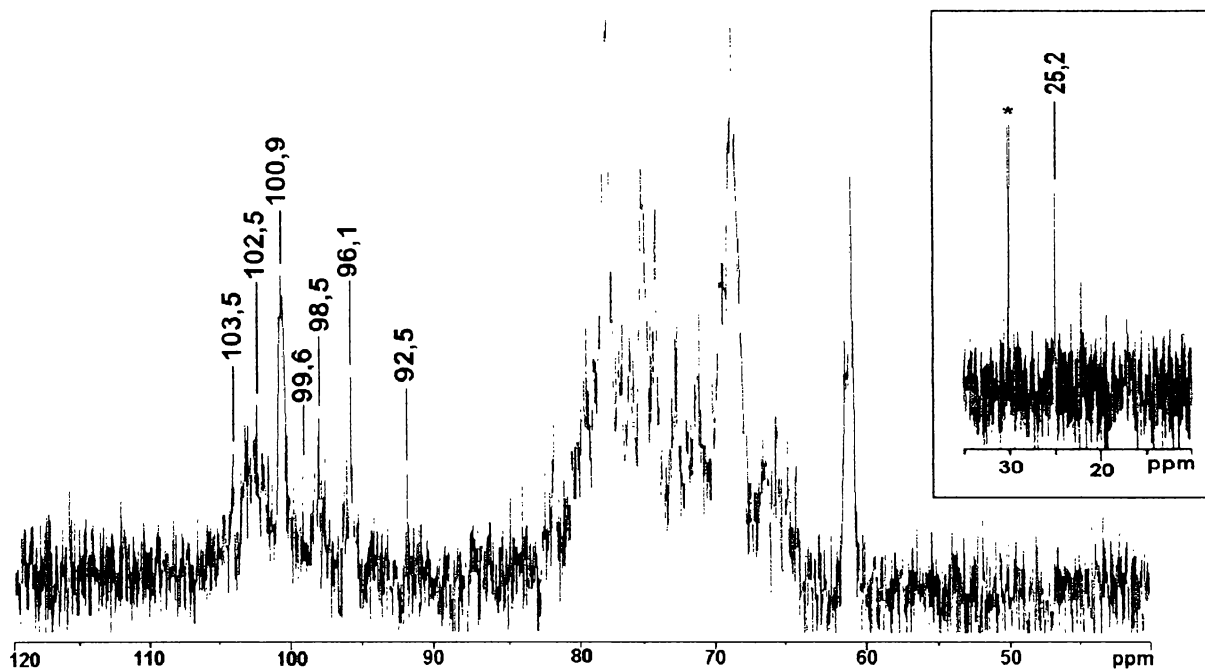
É possível observar em destaque nos espectros das frações S2S (Figura-21) e S3S (Figura-22) um sinal em 25,2 ppm, correspondente ao carbono metílico de acetal de ácido pirúvico. A presença de acetal de ácido pirúvico substituindo os carbonos 4 e 6 de unidades de β -galactopirranose (unidade A), foram encontrados em baixas proporções em outras espécies da ordem Halymeniales, sendo que no gênero *Grateloupia* foi encontrado 2,92 e 0,18 % de piruvato, para *G. elliptica* (HIRASE; WATANABE, 1972) e *G. filicina* (ZABACKIS; PEREZ, 1990), respectivamente.

FIGURA-20 ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DA FRAÇÃO S1S DE *C. seminervis*.



Análise realizada à 60°C em D₂O, concentração das amostras 40 mg/mL.

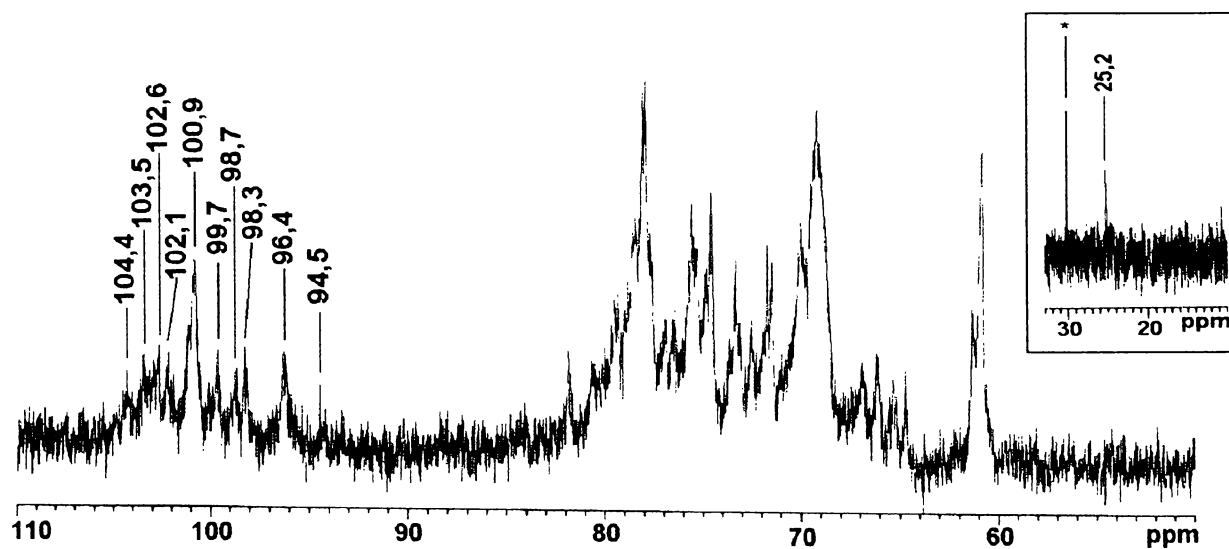
FIGURA-21 ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DA FRAÇÃO S2S DE *C. seminervis*.



Análise realizada à 60°C em D₂O, concentração das amostras 40 mg/mL.

*Sinal correspondente à acetona utilizada como padrão interno ($\delta = 30,2$ ppm).

FIGURA-22 ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DA FRAÇÃO S3S DE *C. seminervis*.



Análise realizada à 60°C em D₂O, concentração das amostras 40 mg/mL.

*Sinal correspondente à acetona utilizada como padrão interno ($\delta = 30,2$ ppm).

Segundo ZABACKIS e PEREZ (1990), a presença de acetal de ácido pirúvico nas espécies do gênero *Grateloupia*, bem como em outras espécies da família Halymeniaceae, pode ser uma característica importante na taxonomia. É importante ressaltar que este tipo de substituinte, acetal de ácido pirúvico, também é encontrado em espécies pertencentes a outras ordens, como na ordem Gigartinales como, por exemplo, em *Gigartina tenella* a qual apresenta 1,5 % de ácido pirúvico (HIRASE; WATANABE, 1972). CHOPIN et al. (1994) destaca a necessidade de estudos mais detalhados com relação à presença de acetal de ácido pirúvico nas galactanas de diferentes fontes, para que se possa sugerir um significado quimiotaxonômico para estes substituintes.

As frações S1S, S2S e S3S foram submetidas à análise de cromatografia de exclusão estérica, acoplada a detectores de espalhamento de luz e de índice de refração, com a finalidade de se observar a homogeneidade das frações (Figuras-23, 24 e 25). Como pode ser observado as frações S1S, S2S e S3S apresentam um caráter heterogêneo e, portanto polidisperso.

FIGURA-23 ANÁLISE DE HOMOGENEIDADE DA FRAÇÃO S1S.

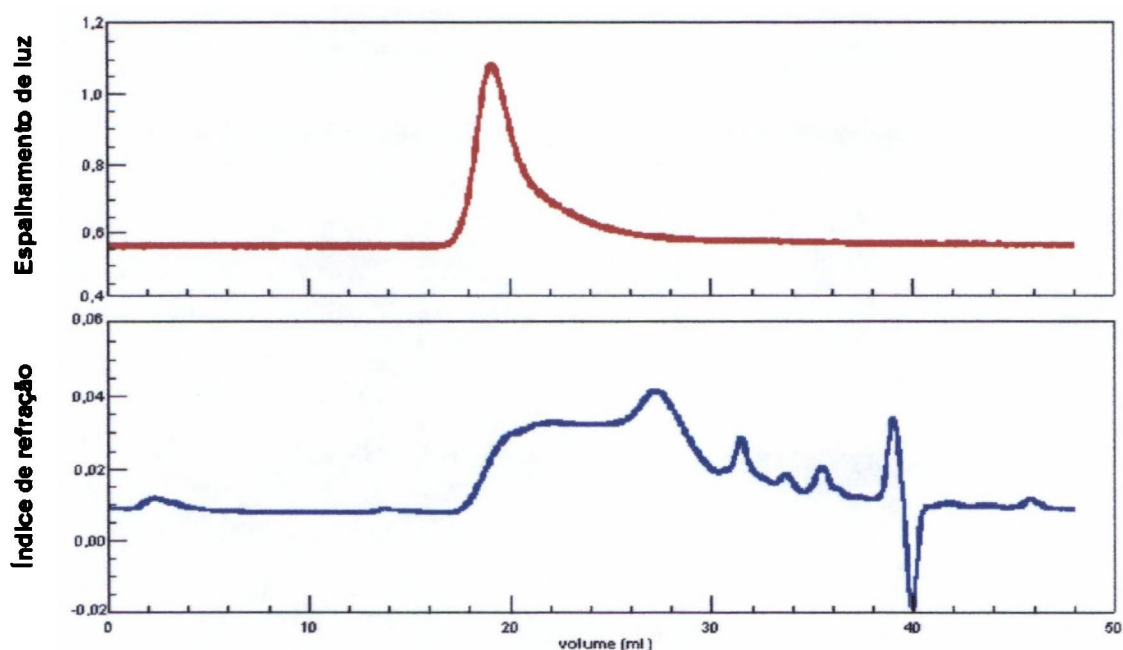


FIGURA-24 ANÁLISE DE HOMOGENEIDADE DA FRAÇÃO S2S.

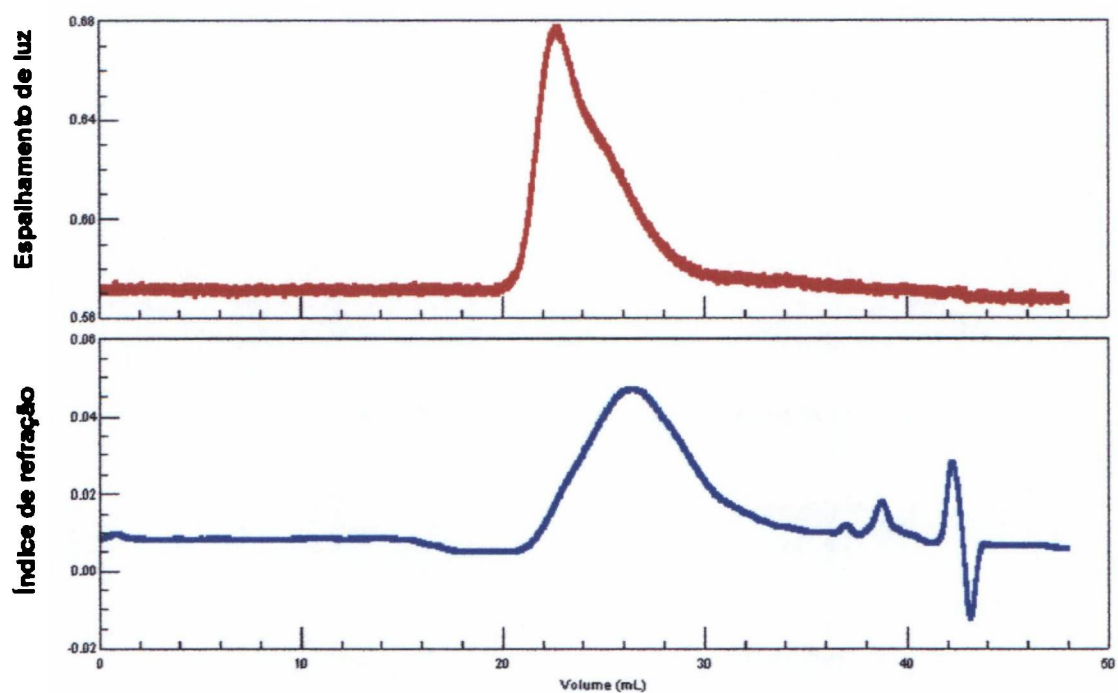
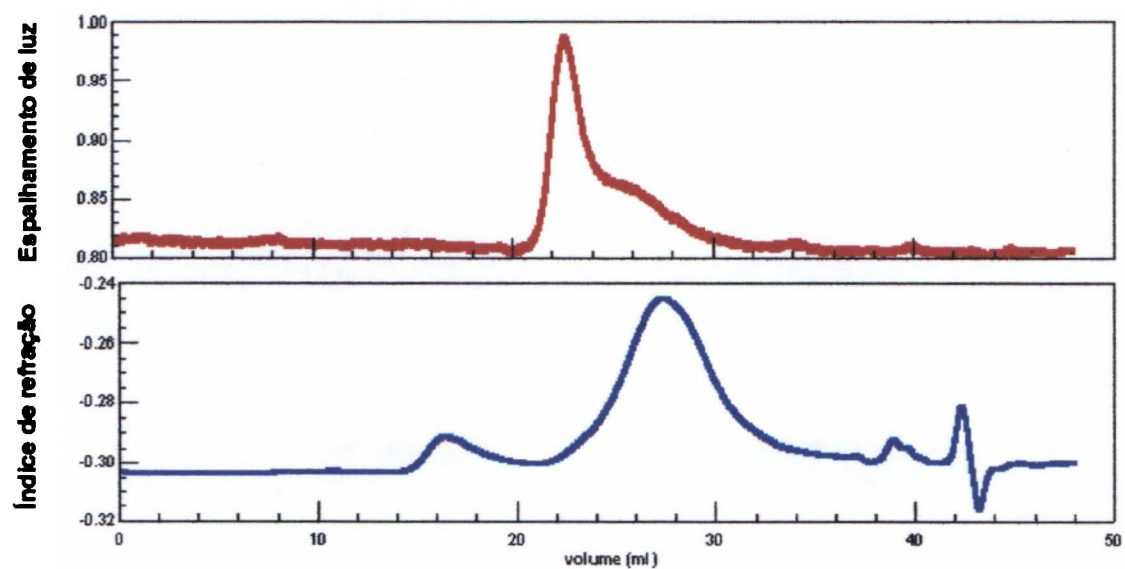


FIGURA-25 ANÁLISE DE HOMOGENEIDADE DA FRAÇÃO S3S.



4.2.2- PURIFICAÇÃO DA FRAÇÃO S2S

Com a finalidade de se purificar o material heterogêneo solúvel em KCl 2M, a fração S2S, de maior rendimento, foi submetida à cromatografia de troca iônica, em coluna de DEAE-Sephacel, utilizando como eluentes: água e soluções crescentes de NaCl (0,25 - 1,5M) (Tabela-27), foram obtidas as frações: S2S-1, S2S-2, S2S-3, S2S-4 e S2S-5, eluídas com NaCl 0,25; 0,5; 0,75; 1,0 e 1,5M, respectivamente.

Como pode ser observado na Tabela-27 as frações obtidas da coluna de troca-iônica são piruvatadas e sulfatadas. As rotações ópticas das frações S2S-2 a S2S-5 são negativas com um valor absoluto baixo, indicando a presença de unidades pertencentes à série enantiomérica L-.

TABELA-27 RENDIMENTO E ANÁLISE QUÍMICA DAS FRAÇÕES DE *C. seminervis*, OBTIDAS POR CROMATOGRAPHIA DE TROCA-IÔNICA (DEAE-Sephacel) DE S2S.

Fração	Rendimento (%) ^a	Carboidrato (%) ^b	Sulfato NaSO ₃ (%) ^c	Proteína (%) ^d	Ac. Pirúvico (%) ^e	[α] _D ^f (°)
S2S-1	7,3	68,0	8,9	5,4	2,9	+10,3
S2S-2	12,5	75,3	14,2	2,1	0,2	-23,0
S2S-3	34,7	63,2	27,2	1,8	5,1	-8,0
S2S-4	28,0	62,1	28,6	2,1	1,7	-19,0
S2S-5	5,0	48,3	22,6	5,1	0,7	-8,7

^aRendimento calculado em relação a quantidade de S2S aplicada na coluna de troca-iônica;

^{b, c, d, e} Determinado pelos métodos: fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS et al., 1956), DODGSON (1961), LOWRY et al., (1951) e KOEPEL e SHARPE (1952), respectivamente.

^fRotação óptica específica das frações polissacarídicas na concentração de 0,2 g% em água, à temperatura de 20°C.

A composição monossacarídica das frações obtidas da coluna de troca-iônica, como pode ser observado na Tabela-28, mostra a presença majoritária de galactose

(47,0 - 70,4 mol%), 3,6-anidrogactose (7,5 - 16,7 mol%), bem como do seu derivado 2-O-metilado (3,5 - 14,8 mol%), todas as frações apresentaram 6-O-metilgactose (1,1 - 18,2 mol%) e xilose (5,0 - 12,0 mol %), porém somente algumas contêm os derivados da gactose metilada em C-2 e C3 e/ou C-4. A gucose só foi presente nas frações S2S-1 e S2S-5 de menor rendimento (Tabela-28), indicando uma possível contaminação destas frações com o amido das florídeas.

TABELA-28 ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS SUBFRAÇÕES DE S2S, OBTIDAS POR CROMATOGRAFIA DE TROCA-IÔNICA (DEAE-Sephacel).

Fração	Composição monossacarídica (mol%)							
	Gal ^a	AG	2AG	2Gal	3/4Gal	6Gal	Xil	Glc
S2S-1	51,8	7,5	5,4	1,7	8,5	7,1	12,0	6,0
S2S-2	47,0	7,5	14,8	-	5,9	18,2	6,4	-
S2S-3	65,3	16,7	3,5	4,0	3,5	2,0	5,0	-
S2S-4	70,4	9,3	5,9	7,4	-	1,1	5,9	-
S2S-5	59,2	14,6	5,5	1,8	-	1,6	5,6	7,0

^aAbreviatura dos monossacarídeos (Gal = gactose; AG = 3,6-anidrogactose; 2AG = 3,6-anidro-2-O-metilgactose; 2Gal = 2-O-metilgactose; 3/4Gal = 3-O- e/ou 4-O-metilgactose; 6Gal = 6-O-metilgactose; Xil = Xilose; Glc = gucose).

As frações S2S-1, S2S-2, S2S-3 e S2S-4 foram submetidas à análise de homogeneidade em cromatografia de exclusão estérica, acoplada a detectores de espalhamento de luz e de índice de refração. Como é possível observar nas Figuras-26, 27, 28 e 29, a única fração homogênea foi a S2S-3. Esta fração apresentou massa molecular média (M_w) de 414.900 Da, a qual foi determinada baseando-se na variação dos índices de refração ($dn/dc = 0,053$).

FIGURA-26 ANÁLISE DE HOMOGENEIDADE DA FRAÇÃO S2S-1.

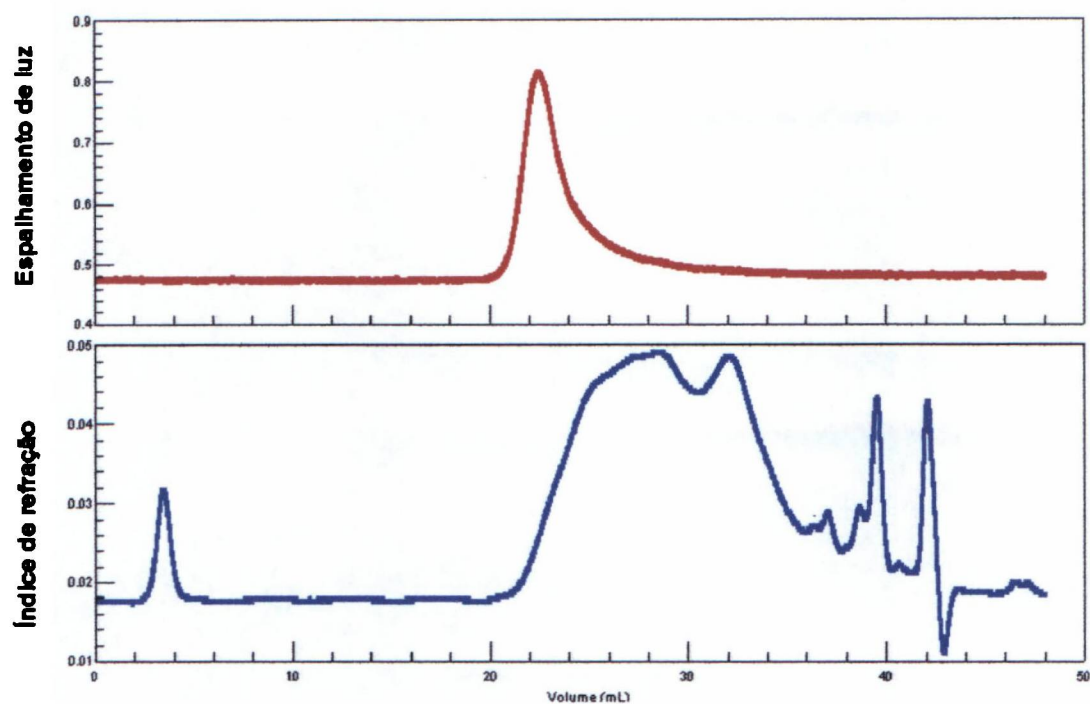


FIGURA-27 ANÁLISE DE HOMOGENEIDADE DA FRAÇÃO S2S-2.

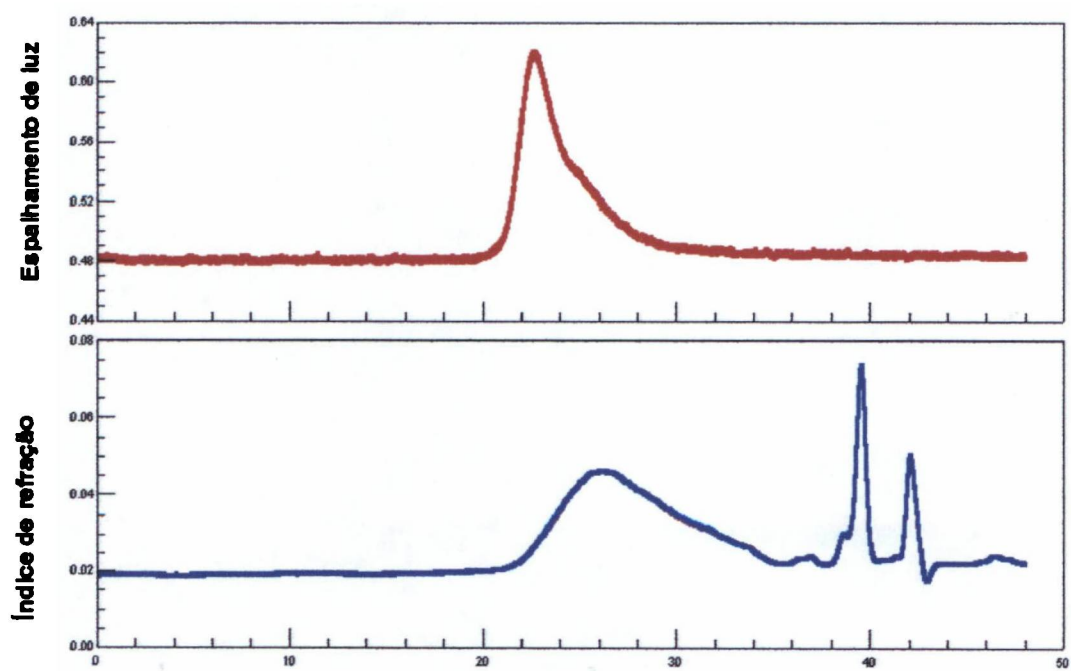


FIGURA-28 ANÁLISE DE HOMOGENEIDADE DA FRAÇÃO S2S-3.

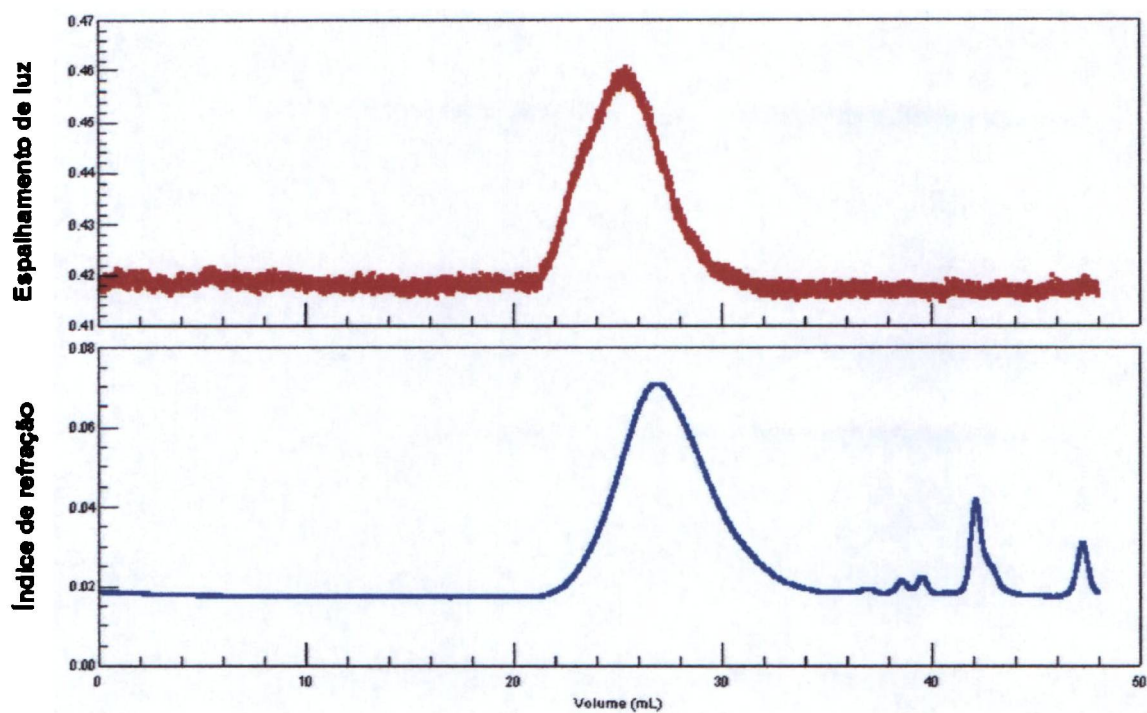
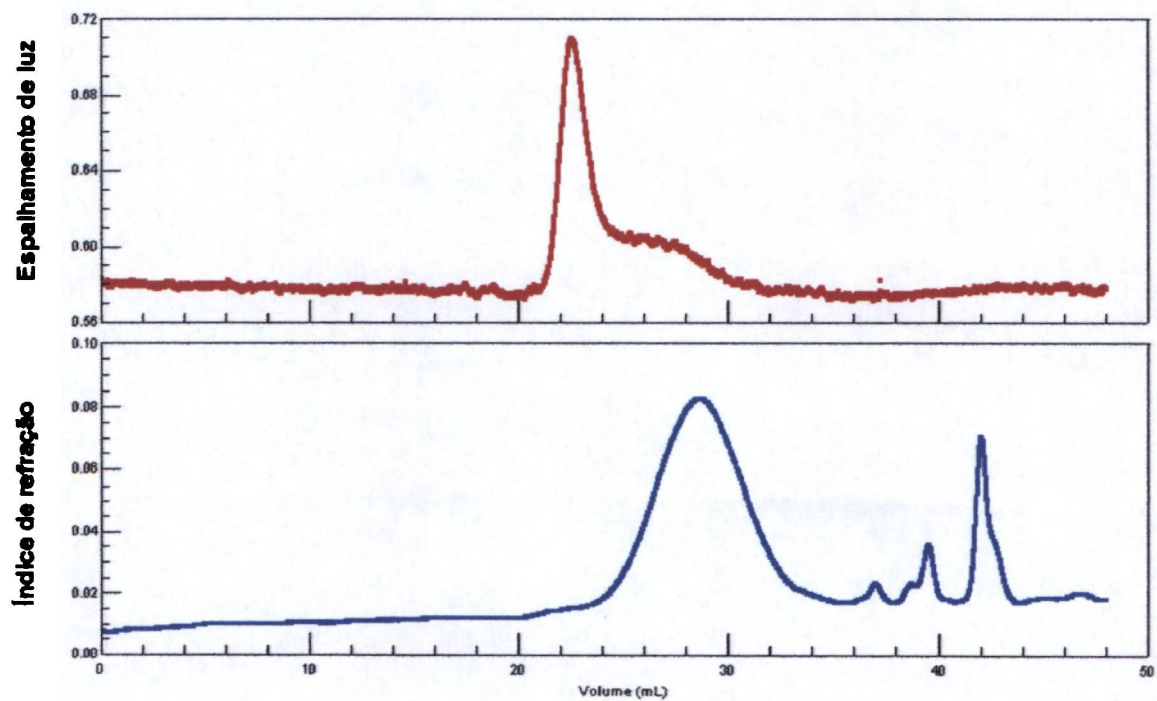


FIGURA-29 ANÁLISE DE HOMOGENEIDADE DA FRAÇÃO S2S-4.



4.2.3- CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DE S2S-3

4.2.3.1- ANÁLISE ENANTIOMÉRICA E ESPECTROSCOPIA DE RMN DE ^{13}C de S2S-3

A galactana homogênea foi submetida à análise enantiomérica dos seus monossacarídeos constituintes (Tabela-29). A partir desta análise podemos observar que a proporção de unidades D:-L- é menor que 1:1; assim esta galactana não pertence ao grupo das agaranas, e como as unidades não são somente da série D-, esta galactana também não pode ser classificada como carragenana. Desta forma ao aliarmos as análises enantioméricas e a homogeneidade da fração S2S-3, podemos classificá-la como uma galactana do tipo DL-híbrida. Esta classificação está de acordo com a rotação óptica obtida de $-8,0^\circ$ para esta fração (Tabela-27).

TABELA-29 COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA E ANÁLISE ENANTIOMÉRICA DA FRAÇÃO S2S-3 DE *C. seminervis*.

Fração	Composição monossacarídica (mol%)						
	Gal ^{a,b}	AG ^c	2AG ^c	2Gal ^b	4Gal ^d	6Gal ^b	Xil
	D - L	D - L	D - L	D - L		D - L	
S2S-3	55,6 - 9,7	tr. - 16,7	tr. - 3,5	2,5 - 1,5	3,5	2,0 - tr.	5,0

^a Abreviatura dos monossacarídeos (Gal = galactose; AG = 3,6-anidrogallactose; 2AG = 3,6-anidro-2-O-metilgalactose; 2Gal = 2-O-metilgalactose; 4Gal = 4-O-metilgalactose; 6Gal = 6-O-metilgalactose; Xil = Xilose).

^{b, c} As análises enantioméricas das unidades de galactose e de seus derivados monometilados foram realizados pelo método de CASES et al. (1995), e das unidades anidrogallactosídicas pelo método de ERREA et al.(1998), respectivamente.

^d Determinado após hidrólise ácida total, redução com borodeutereto de sódio e análise por CG-EM.
tr. = traços (quantidades menores que 1).

Podemos observar ainda na Tabela-29, que as unidades anidrogallactosídicas são pertencentes a série enantiomérica L-. De modo diferente, a galactana

homogênea de *C. crenulata* (C2S-3) apresentou tanto unidades anidrogactosídicas da série L- (majoritariamente), quanto da série D- (4,7 mol%).

A fração homogênea S2S-3 foi submetida a análise de RMN de ^{13}C , obtendo-se o espectro da Figura-30 (p. 128). O espectro apresenta sinais alargados na região anomérica, que podem ser atribuídos a mais de uma unidade monossacarídica.

Na região anomérica é possível observar a presença do sinal em 102,5 ppm correspondente a unidades de β -D-galactose ligada a 3,6-anidro- α -L-galactose, cujo sinal de C-1 aparece em 98,3 ppm. O sinal em 81,9 ppm é atribuído ao C-3 das unidades de β -galactopiranosose ligada a 3,6-anidro- α -L-galactose, confirmando a presença desta díade na galactana S2S-3. Ressalta-se que este sinal de C-3 é característico para esta díade (MILLER; BLUNT, 2000a).

O sinal bem alargado centrado em 100,7 ppm, pode ser atribuído ao C-1 de β -D-galactose 2-sulfato, cujo sinal de C-2 sulfatado aparece bem pronunciado em 78,1 ppm (MILLER; BLUNT, 2000b). Este sinal em 100,7 ppm pode ser atribuído ainda ao C-1 de α -L-galactose, a qual pode estar sulfatada em C-6 (presença do sinal em 66,6 ppm) ou não substituído. Outro sinal na região anomérica, pode ainda ser observado em 96,1 ppm, o qual pode ser correspondente a unidades de α -D-galactose e/ou 3,6-anidro- α -L-galactose 2-sulfato.

Os sinais em 175,8 e 25,1 ppm são correspondentes ao grupo carbonila ($\text{C}=\text{O}$) e ao grupo metil (CH_3 -), de acetal de ácido pirúvico, respectivamente, (GAREGG *et al.*, 1979; CHIOVITTI *et al.*, 1997). Outros sinais em 71,8, 65,9 e 64,6 ppm, podem ser atribuídos aos carbonos 4, 5 e 6 de β -galactopiranosose piruvatada, respectivamente (MILLER, 2003). Geralmente a ressonância do carbono acetálico de ácido pirúvico, não é observado no espectro de RMN de ^{13}C de galactanas de algas vermelhas. Segundo GORIN *et al.* (1982), o tempo de relaxamento (T_1) do carbono acetálico pode impedir a sua detecção por espectroscopia de RMN de ^{13}C , mesmo quando este substituinte está presente em quantidade significativa. Deste modo, o sinal em 101,6 ppm, relativo ao carbono acetálico do acetal de ácido pirúvico, não está definido e pode estar sobreposto a outros sinais na região anomérica.

Estas unidades piruvatadas, 4,6-O-(1'-carboxietilideno)- β -D-galactopiranosse, são freqüentemente encontrada em galactanas do tipo agarana, porém se mostram presentes também em algumas carragenanas (CHIOVITTI *et al.*, 1997 e 1998).

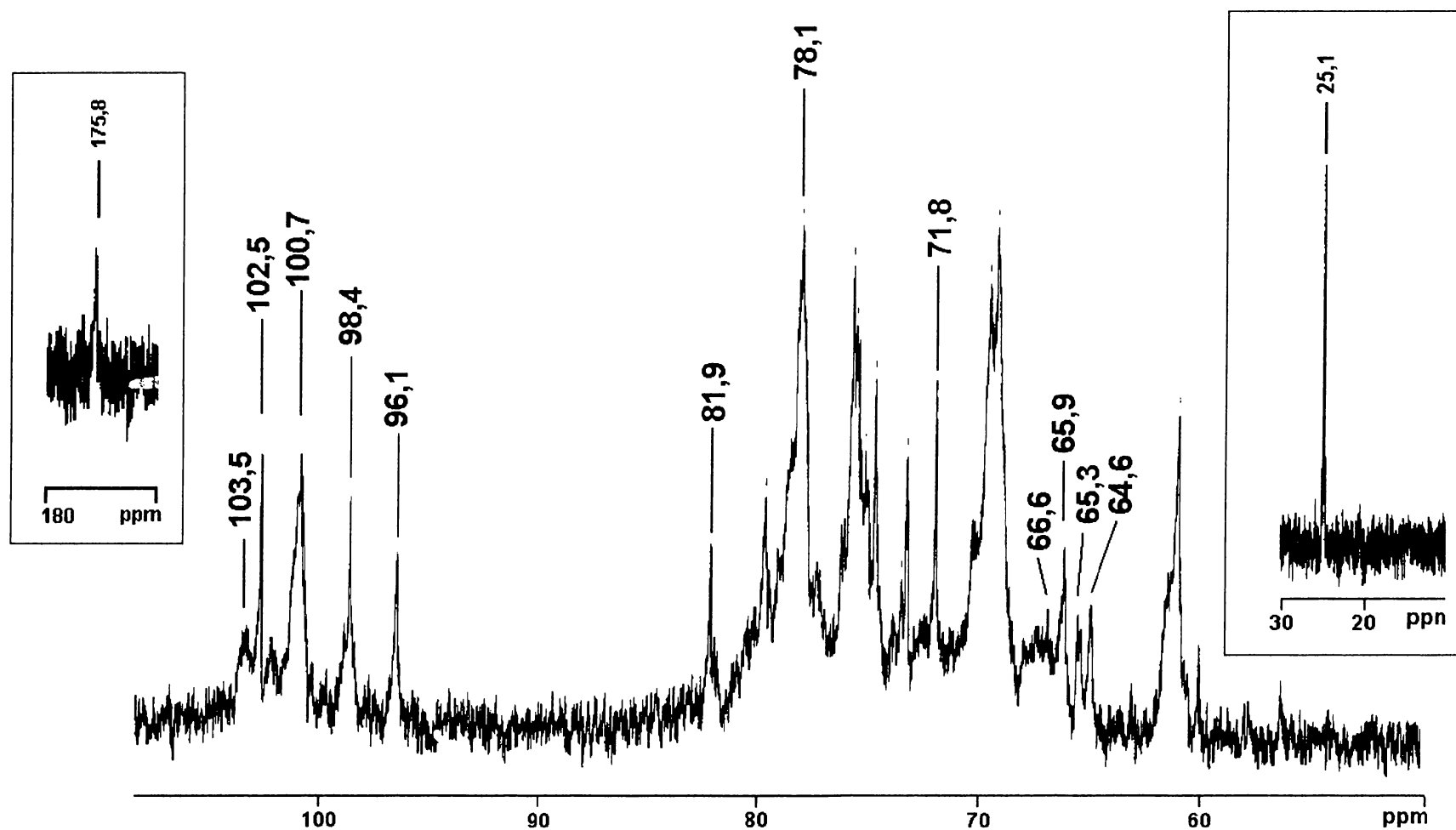
Segundo MILLER (1998), a piruvatação da unidade A não interfere significativamente nos deslocamentos químicos dos carbonos das unidades B, quando estas forem constituídas por unidades de 3,6-anidro-galactose (L- ou D-), ou por α -L-galactose (MILLER, 2003). No entanto, quando as unidades B são constituídas por α -D-galactose, a piruvatação causa um efeito significativo no deslocamento do carbono anomérico (MILLER, 2003). Como exemplo podemos citar os sinais de C-1 obtidos por FALSHAW *et al.* (2003b), para as díades de β -galactopiranosse (104,8 ppm) ligada a α -D-galactopiranosse (96,2 ppm) e 4,6-O-(1'-carboxietilideno)- β -D-galactopiranosse (104,4 ppm) ligada a α -D-galactopiranosse (95,2 ppm), onde a piruvatação ocasiona um deslocamento para campo mais alto da unidade B de aproximadamente 1,0 ppm.

O espectro de RMN de ^{13}C de S2S-3 não contém sinais correspondentes a unidades β -galactopiranosse (piruvatada ou não) ligada a unidades de α -D-galactopiranosse. Deste modo, podemos sugerir que os sinais em 102,5 e 103,5 ppm podem ser atribuídos também a unidades 4,6-O-(1'-carboxietilideno)- β -D-galactopiranosse ligadas a 3,6-anidro- α -L-galactose e α -L-galactose (6-sulfatada ou não substituída neste carbono), respectivamente.

Em resumo, estes resultados permitem a identificação de algumas díades na galactana S2S-3, bem como mostram que algumas unidades A podem estar sulfatadas em C-2, substituídas por piruvato ou sem substituição. As unidades B estão presentes na forma de: α -L-galactose sulfatada em C-6 ou não substituída neste carbono, 3,6-anidro- α -L-galactose que podem estar substituídos em C-2 por grupo metil ou sulfato, e ainda na forma de α -D-galactose.

Estes resultados espectroscópicos foram também observados na galactana C2S-3 de *C. crenulata*.

FIGURA -30 ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DA FRAÇÃO S2S-3 DE *C. seminervis*.



Análise realizada à 60°C em D_2O , concentração das amostras 40 mg/mL

TABELA - 30 SINAIS ANOMÉRICOS (ppm) PRESENTES NOS ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DA FRAÇÃO S2S-3.

Díades	Unidade - A	Unidade – B
G $\rightarrow$ LA	102,5	98,3
G $\rightarrow$ L	103,5	100,7
G2S $\rightarrow$ LA	100,7	98,3

4.2.3.2- DESSULFATAÇÃO SOLVOLÍTICA DE S2S-3

Como foi anteriormente observado, a galactana S2S-3 com 27,2% de sulfato apresentou um espectro de RMN de ^{13}C complexo compatível com o alto teor de sulfatação. No intuito de se determinar o posicionamento dos grupos sulfato, e de se obter uma simplificação no espectro de RMN de ^{13}C a galactana S2S-3 foi submetida à dessulfatação solvolítica pelo método de NAGASAWA et al. (1979). A determinação do posicionamento dos grupos sulfato se dá através da análise comparativa de metilação da galactana nativa e dessulfatada como será mostrado posteriormente.

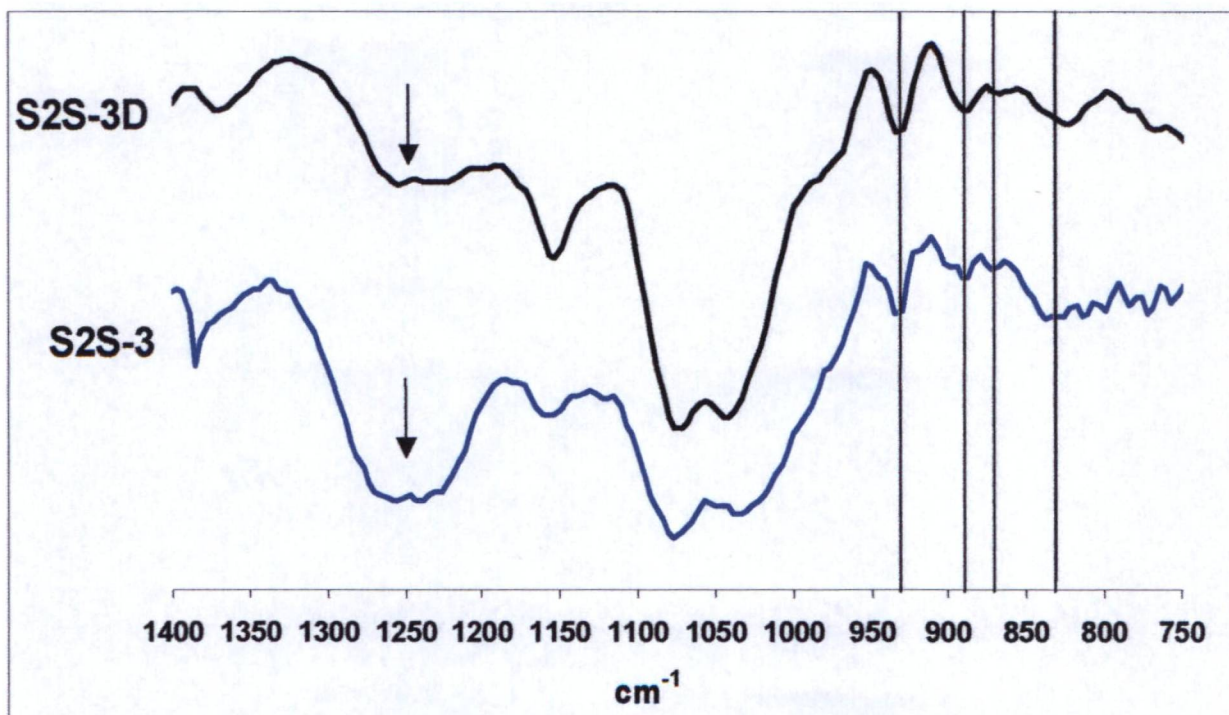
A galactana S2S-3 após dessulfatação solvolítica foi denominada S2S-3D (rendimento de 73,0%) com 5,2% de NaSO_3 , o que corresponde a 81% de dessulfatação.

A remoção dos grupos sulfato pode ser observada no espectro de infravermelho (FT-IR - Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier) (Figura-31), por uma diminuição da banda de absorção em 1240 cm^{-1} , correspondente ao teor de sulfato total (STANCIOFF; STANLEY, 1969), observada na fração S2S-3D.

No espectro de FT-IR (Figura-31), é possível observar na região que define os posicionamentos dos grupos sulfato ($950 - 800\text{ cm}^{-1}$), a presença de uma banda em 940 cm^{-1} , característica de 3,6-anidrogactose. Uma banda de baixa intensidade em

890 cm^{-1} também é observada no traçado do espectro da galactana S2S-3, e se torna mais acentuada no traçado da galactana dessulfatada (S2S-3D). De acordo com estes resultados, esta banda (890 cm^{-1}) é atribuída a unidades de β -galactopiranosose não sulfatada (WHYTE et al., 1985; ZABACKIS; SANTOS 1986). A partir da análise do espectro de FT-IR de carragananas altamente piruvatadas, extraídas de algas do gênero *Collophycus*, CHIOVITTI et al. (1997) atribuíram a banda de absorção de 890 - 900 cm^{-1} , tanto a unidades A não substituídas quanto a unidades substituídas por acetal de ácido pirúvico nos carbonos 4 e 6. Devido à presença de acetal de ácido pirúvico na galactana S2S-3, comprovada tanto por análise colorimétrica quanto por espectroscopia de RMN de ^{13}C , podemos atribuir a esta banda em 890 cm^{-1} , tanto a unidades de β -D-galactopiranosose não sulfatada quanto a unidades de 4,6-O-(1'-carboxietilideno)- β -D-galactopiranosose.

FIGURA-31 ESPECTRO DE INFRAVERMELHO DAS FRAÇÕES S2S-3 e S2S-3D



No espectro de infravermelho de S2S-3, uma banda larga (825 - 850 cm^{-1}) centrada em 832 cm^{-1} também pode ser observada. A banda em 830 cm^{-1} é

representativa de sulfato em carbono secundário equatorial (β -D-galactopiranosose 2-sulfato), cujo sinal de C-2 sulfatado foi identificado no espectro de RMN de ^{13}C de S2S-3. Esta banda de 825 - 850 cm^{-1} , também pode corresponder a uma menor proporção de unidades sulfatadas em carbono secundário axial (β -D-galactopiranosose 4-sulfato), cuja absorção ocorre em 850 cm^{-1} .

A presença de sulfato em carbono primário (galactose 6-sulfato) é atribuída à banda (de baixa intensidade) em 820 cm^{-1} (STANCIOFF; STANLEY, 1969), (Figura-31).

Posteriormente será discutido o posicionamento dos grupos sulfato em diferentes unidades da galactana S2S-3, através da análise comparativa da metilação da galactana nativa e dessulfatada.

Os dados da Tabela-31 demonstram que o tratamento solvolítico não afetou significativamente a composição monossacarídica desta fração. Outra metodologia de dessulfatação, como a metanólise que é catalizada por ácido, mostra grande perda de unidades anidrogalactosídicas (TAKANO, 2002).

TABELA-31 COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES NATIVA (S2S-3) E DESSULFATADA (S2S-3D) DE *C. seminervis*.

Fração	Composição monossacarídica (mol%)						
	Gal ^a	AG	2AG	2Gal	4Gal ^b	6Gal	Xil
S2S-3	65,3	16,7	3,5	4,0	3,5	2,0	5,0
S2S-3D	64,4	17,1	3,2	4,3	3,3	2,4	5,3

^a Abreviatura dos monossacarídeos (Gal = galactose; AG = 3,6-anidrogalactose; 2AG = 3,6-anidro-2-O-metilgalactose; 2Gal = 2-O-metilgalactose; 4Gal = 4-O-metilgalactose; 6Gal = 6-O-metilgalactose; Xil = Xilose).

^{b, c} Determinado após hidrólise ácida total, redução com borodeutereto de sódio e análise por CG-EM.

O espectro de RMN de ^{13}C (Figura-32) demonstra que a dessulfatação modificou alguns sinais quando comparado com o espectro da fração nativa (Figura-

30). Nesta Figura-32, pode ser observado ainda, um maior número de sinais na região anomérica.

Antes de discutir os assinalamentos da região anomérica, é importante ressaltar que os sinais correspondentes ao grupo carbonila (-C=O) e ao grupo metil (CH_3 -), de acetal de ácido pirúvico, em 175,8 e em 25,1 ppm, respectivamente, se encontram presentes no espectro da galactana dessulfatada (S2S-3D), mostrando que o processo solvolítico, além de não ter degradado as unidades anidrogactosídicas, não ocasionou depiruvatação do polissacarídeo.

No polímero dessulfatado os sinais da região anomérica podem ser agrupados em pares correspondentes ao C-1 das unidades que compõe as díades presentes no polímero, 104,4 ppm - 95,8 ppm (β -D-galactopiranosose ligada a α -D-galactopiranosose) (USOV et al., 1980), 103,1 ppm - 100,7 ppm (β -D-galactopiranosose ligada a α -L-galactopiranosose), 102,4 ppm - 98,4 ppm (β -D-galactopiranosose ligada a 3,6-anidro-2-O-metil- α -L-galactopiranosose) e 101,9 ppm - 98,0 ppm (β -D-galactopiranosose ligada a 3,6-anidro- α -L-galactopiranosose) (LAHAYE et al., 1989).

As unidades de 3,6-anidrogactopiranosose (C-1 98,0 ppm), quando substituídas em C-2 por grupo metil, apresentam um deslocamento químico no seu C-1, de aproximadamente +0,5 ppm, o que está de acordo com o assinalamento em 98,4 ppm atribuído ao C-1 de 3,6-anidro-2-O-metil- α -L-galactopiranosose (LAHAYE et al., 1989).

No espectro do polímero dessulfatado, além da atribuição dos sinais da região anomérica, observamos o desaparecimento do sinal em 66,6 ppm, presente na galactana nativa (Figura-30, p. 128), confirmando que algumas unidades de α -galactose são substituídas por sulfato em C-6.

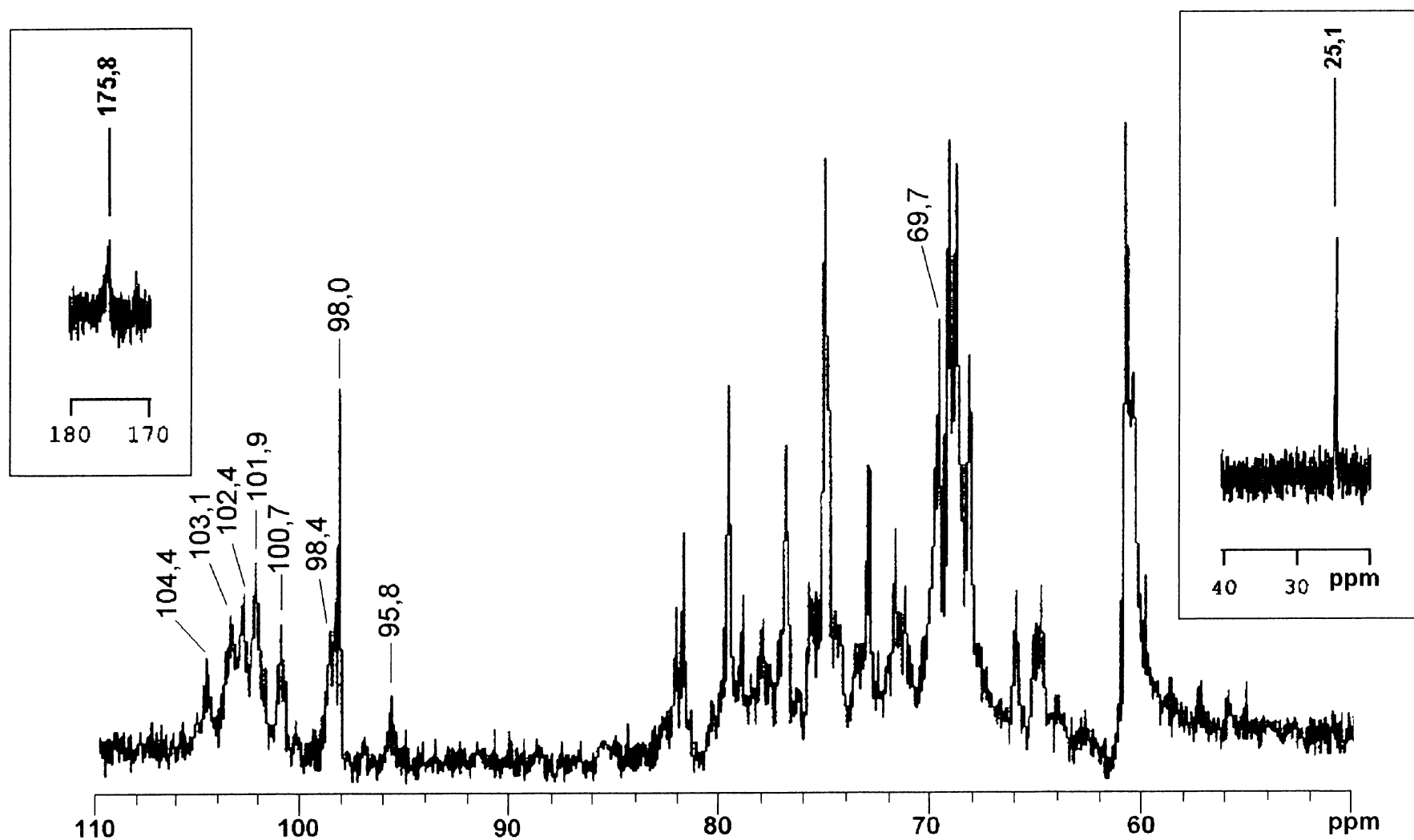
Outra diferença significativa ao compararmos os espectros de S2S-3D e S2S-3, foi a diminuição quase que total do sinal em 78,1 ppm, observado no espectro da galactana nativa (Figura-30), e atribuído ao C-2 sulfatado de unidades de β -galactopiranosose. Por outro lado, no espectro da galactana dessulfatada é definido o sinal de C-2 de β -galactosose não substituída, em 69,7 ppm. Esta diferença, de aproximadamente +8,0 ppm para o sinal de C-2 sulfatado, está de acordo com os valores propostos por MILLER e BLUNT (2000b). O sinal em 101,9 ppm presente no

espectro da fração S2S-3D corresponde ao C-1 de unidades de β -galactopiranosose, condizente com o efeito β (1,3 ppm) da sulfatação em C-2, como observado no polímero original S2S-3 (C-1 em 100,7 ppm) (MILLER; BLUNT, 2000b).

TABELA - 32 SINAIS ANOMÉRICOS (ppm) PRESENTES NOS ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DA FRAÇÃO S2S-3D.

Díades	Unidade - A	Unidade – B
G $\rightarrow$ D	104,4	95,8
G $\rightarrow$ L	103,1	100,7
G $\rightarrow$ LA2M	102,4	98,4
G $\rightarrow$ LA	101,9	98,0

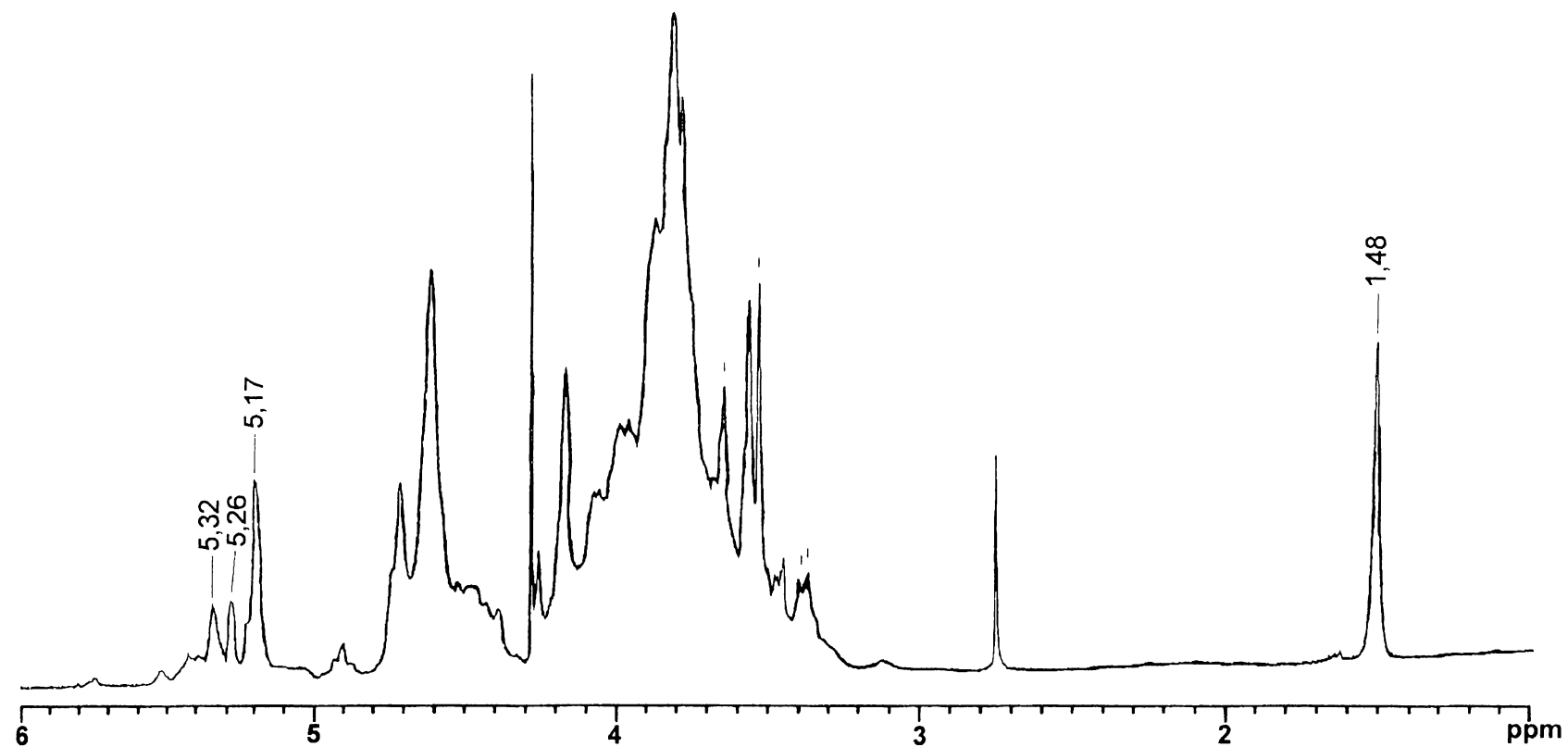
FIGURA-32 ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DA FRAÇÃO S2S-3D DE *C. seminervis*.



Análise realizada à 60°C em D_2O , concentração das amostras 40 mg/mL.

No espectro de RMN de próton da fração S2S-3D (Figura-33), o acetal de ácido pirúvico também pode ser detectado através da ressonância do grupo metil em 1,48 ppm (GORIN; ISHIKAWA, 1967). Neste espectro pode ainda ser determinado os sinais de H-1 de α -galactose (5,32 ppm) e de 3,6-anidro- α -galactose (5,17 ppm). O sinal em 5,26 ppm também é atribuído ao H-1 de 3,6-anidro- α -galactose, porém quando este monossacarídeo está ligado a unidades piruvatadas. Desta forma, podemos concluir que pelo menos uma parte das unidades de 4,6-O-(1'-carboxietilideno)- β -D-galactopirranose estão ligadas a 3,6-anidro- α -L-galactose (MURANO et al., 1992; NELSON et al., 1994).

FIGURA-33 ESPECTRO DE RMN DE ^1H DA FRAÇÃO S2S-3D DE *C. seminervis*.



Análise realizada à 70°C em D_2O , concentração das amostras 40 mg/mL.

4.2.3.3- TRATAMENTO ALCALINO DE S2S-3

A fração homogênea S2S-3 foi também submetida a tratamento alcalino, onde ocorre a ciclização de unidades de α -galactose 6-sulfato contendo hidroxilas livres em C-3 (unidades precursoras). A ciclização destas unidades precursoras ocorre através da formação de uma ligação éter entre o C-3 e o C-6, com a saída do grupo sulfato em C-6, originando as unidades 3,6-anidrogactosídicas. Desta forma esta reação em meio alcalino promove uma dessulfatação seletiva do polímero (NOSEDA; CEREZO, 1995).

Para se determinar o tempo de meia vida desta reação de ciclização e a constante da velocidade de ciclização alcalina, foi realizado o tratamento alcalino analítico, onde o polissacarídeo foi incubado à 80°C em meio alcalino (NaOH 1M). Desta solução reacional, foi retirado alíquotas em tempos determinados, e o teor de 3,6-anidrogactose foi então dosado pelo método do resorcinol (YAPHE, 1960). Assim foi obtido o gráfico da Figura-34, e a partir da equação da reta foi determinado que a constante de velocidade da reação (k) é de $5,7 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$ e o tempo de meia vida de 20,2 minutos.

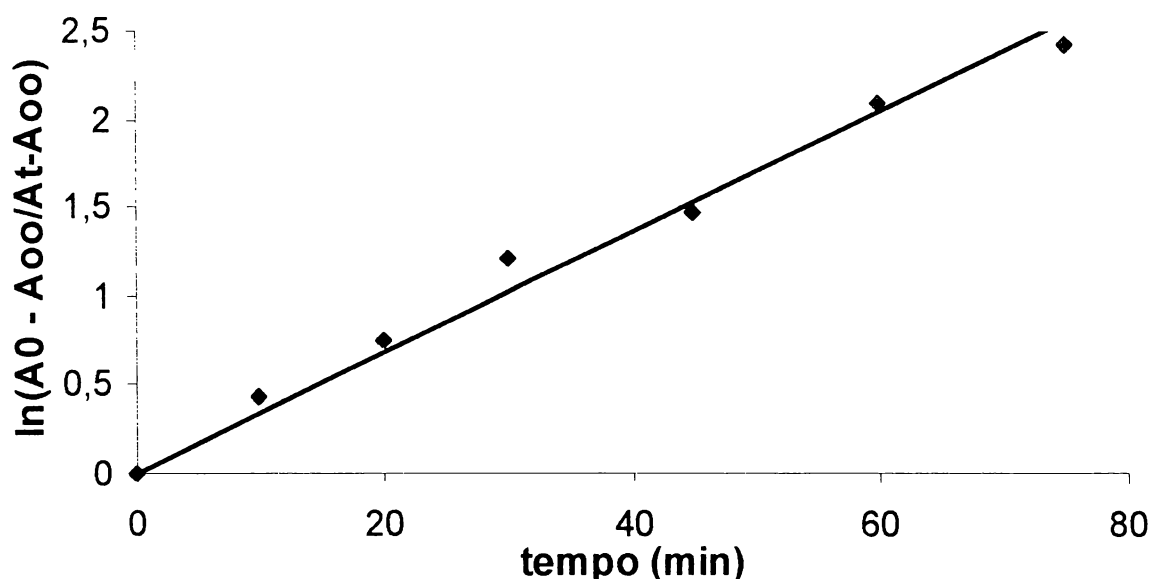
O tempo de meia vida desta reação de ciclização nos fornece o tempo racional para o tratamento químico destas moléculas, bem como nos auxilia na determinação estrutural do polímero.

Como foi demonstrado por NOSEDA e CEREZO (1995), certos grupos substituintes interferem na cinética desta reação de ciclização, como discutido anteriormente na galactana C2S-3 de *C. crenulata*. A presença de grupos sulfato em C-2 das unidades de β -galactose dificultam a ionização da HO-3 da unidade α -, diminuindo a velocidade de ciclização. Para uma *lambda*-carragenana com 100% das suas unidades ciclizáveis ligadas a β -galactose 2-sulfato o tempo de meia vida é de 170 minutos (CIANCIA et al., 1993).

Embora a galactana S2S-3 apresente unidades A sulfatadas em C-2, o tempo de meia vida à 80 °C, obtido (20,2 min.), é similar ao tempo de meia vida obtido para uma porfirana [(→3)- β -D-Galp-(1→4)- α -L-Galp 6-sulfato-(1→)] (23 minutos) NOSEDA et al., (2000). Desta forma pode-se sugerir que as unidades ciclizáveis de S2S-3

estão ligadas a unidades de β -galactose não sulfatadas em C-2, como ocorre com a porfirana de *Porphyra columbina* (NOSEDA et al., 2000).

FIGURA-34 GRÁFICO DO TRATAMENTO ANALÍTICO DA GALACTANA S2S-3 DE *C. seminervis*.



O tempo de meia vida da reação de ciclização alcalina foi calculado a partir da equação de reta obtida deste gráfico. Equação da reta ($y = 0,034x$), onde $k = 0,034$, aplicando este valor na equação $t_{1/2} = \ln 2/k$, assim $t_{1/2} = 20,2$ minutos.

A reação de ciclização alcalina da galactana de *C. crenulata* (C2S-3), apresentou uma cinética mais lenta ($t_{1/2} = 68,6$ min.), possivelmente pela influência das unidades de β -galactopiranosose 2-sulfato. Como comentado anteriormente não foi investigado o efeito das unidades piruvatadas sobre a velocidade da reação de ciclização alcalina, e como este substituinte também está presente na galactana S2S-3, não pode ser descartada uma possível interferência destes substituintes nesta reação de ciclização.

Para o tratamento alcalino preparativo, a fração S2S-3 foi submetida as mesmas condições descritas acima, por um tempo de 2 horas (aproximadamente 10 vezes o tempo de meia vida determinado no tratamento alcalino analítico), obtendo-se a fração S2S-3T.

Ao comparar a composição monossacarídica das frações S2S-3 e S2S-3T (Tabela-33), podemos observar um aumento das unidades 3,6-anidro- α -galactose (16,7 $\rightarrow$ 23,6 mol%) na fração submetida a tratamento alcalino, e uma proporcional diminuição das unidades de α -galactose. Desta forma, podemos comprovar a presença de aproximadamente 6,9% de α -galactose 6-sulfato na fração original.

TABELA-33 COMPARAÇÃO DA COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DA FRAÇÃO S2S-3 DE *C. seminervis* ANTES E APÓS TRATAMENTO ALCALINO.

Fração	Composição monossacarídica (mol%)						
	Gal ^{a,b}	AG ^c	2AG ^c	2Gal ^f	4Gal ^d	6Gal ^b	Xil
	D - L	D - L	D - L	D - L		D - L	
S2S-3	55,6 - 9,7	tr. - 16,7	tr. - 3,5	2,5 - 1,5	3,5	2,0 - tr.	5,0
S2S-3T	58,0 - tr.	tr. - 23,6	tr. - 4,8	2,8 - tr.	3,6	2,6 - tr.	4,6

^a Abreviatura dos monossacarídeos (Gal = galactose; AG = 3,6-anidrogallactose; 2AG = 3,6-anidro-2-O-metilgalactose; 2Gal = 2-O-metilgalactose; 4Gal = 4-O-metilgalactose; 6Gal = 6-O-metilgalactose; Xil = Xilose).

^{b, c} As análises enantioméricas da galactose e de seus derivados monometilados foram realizados pelo método de CASES et al. (1995), e as das unidades anidrogallactosídicas pelo método de ERREA et al. (1998), respectivamente.

^d Determinado após hidrólise ácida total, redução com borodeutereto de sódio e análise por CG-EM.
tr. = traços (quantidades menores que 1).

Com relação às unidades de 3,6-anidro-2-O-metil- α -L-galactose, houve apenas um pequeno aumento (3,5 $\rightarrow$ 4,8 mol%), com diminuição proporcional das unidades de 2-O-metil- α -galactose, demonstrando que a galactana S2S-3 apresenta

aproximadamente 1,3 mol% de díades precursoras metiladas em C-2 (2-O-metil- α -galactose 6-sulfato).

Os dados da composição monossacarídica e análise enantiomérica após tratamento alcalino da galactana C2S-3 e S2S-3 obtidas de *C. crenulata* e *C. seminervis*, respectivamente, são distintos. Na primeira houve principalmente um aumento das unidades de 3,6-anidro- α -D-galactose, enquanto que em S2S-3 unidades precursora da série D- não constituem esta galactana.

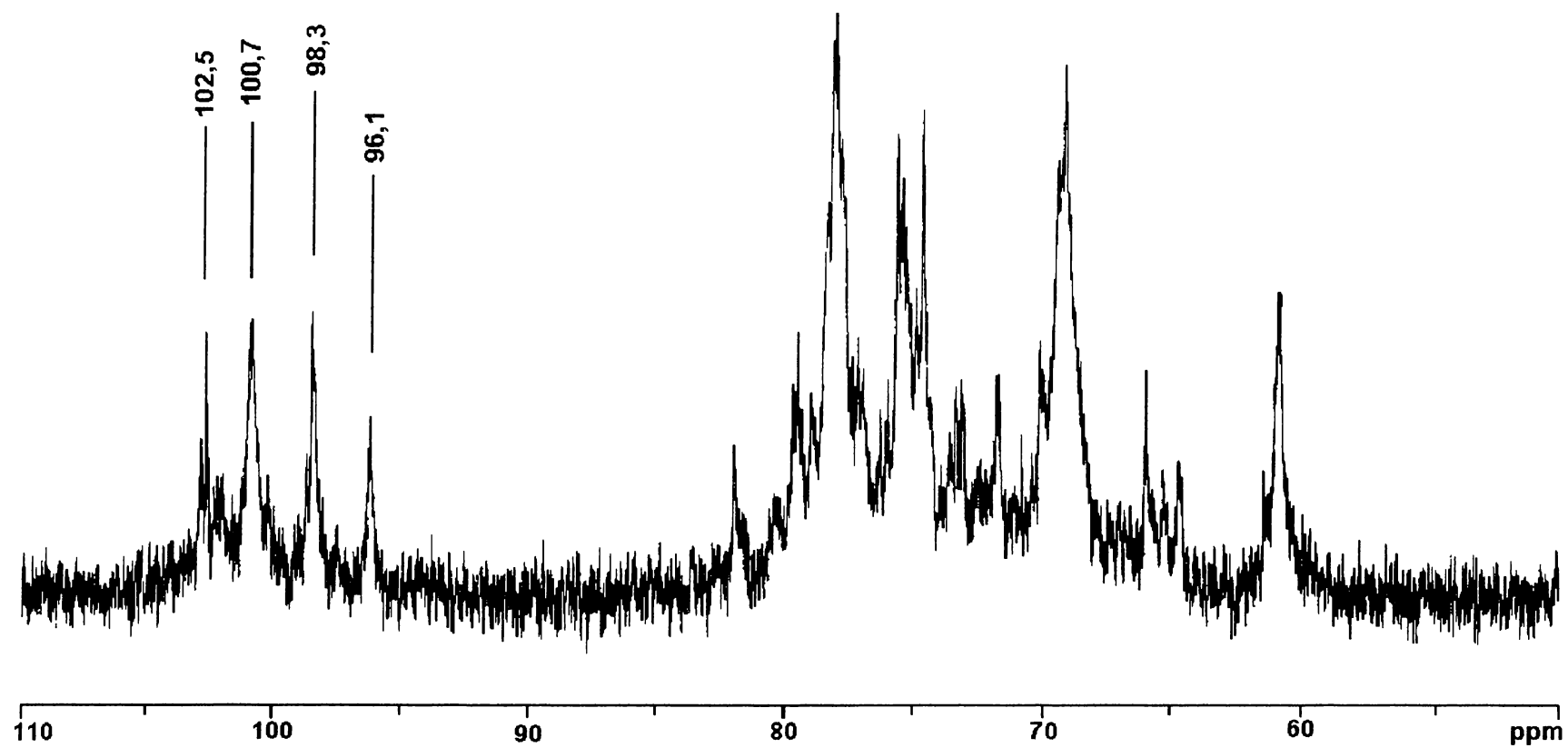
O espectro de RMN de ^{13}C de S2S-3T (Figura-35), apresenta os mesmos sinais na região anomérica, observados no espectro da galactana nativa (Figura-32), havendo um pequeno incremento do sinal centrado em 98,3 ppm referente ao C-1 de unidades de 3,6-anidro- α -L-galactopiranoose. Este resultado mostra que a galactana nativa apresenta unidades precursoras (α -galactose-6-sulfato) pertencentes à série enantiomérica L-. O espectro não apresenta sinais correspondentes a unidades de 3,6-anidro- α -D-galactopiranoose, o que está de acordo com as análises enantioméricas anteriormente discutidas (Tabela-33).

Na Figura-35 podemos também notar que em S2S-3T há o desaparecimento dos sinais em 103,5 e 66,6 ppm (observados no espectro de S2S-3), atribuídos ao C-1 de unidades de β -galactopiranoose ligadas a α -L-galactopiranoose 6-sulfato e ao C-6 sulfatado desta última unidade, respectivamente. Este resultado é esperado desde que tratamento alcalino promove a ciclização das unidades de α -galactose 6-sulfato em 3,6-anidrogalactose.

TABELA - 34 SINAIS ANOMÉRICOS (ppm) PRESENTES NOS ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DA FRAÇÃO S2S-3T.

Díades	Unidade - A	Unidade - B
G $\rightarrow$ LA	102,5	98,3
G2S $\rightarrow$ LA	100,7	98,3

FIGURA-35 ESPECTRO DE RMN* DE ^{13}C DA FRAÇÃO S2S3-T DE *C. seminervis*



Análise realizada à 60°C em D_2O , concentração das amostras 40 mg/mL.

4.2.3.4- ANÁLISE DE (TRIDEUTERO)METILAÇÃO DA GALACTANA NATIVA (S2S-3), DESSULFATADA (S2S-3D) E SUBMETIDA A TRATAMENTO ALCALINO (S2S-3T)

As análises de metilação da galactana homogênea S2S-3 foram conduzidas no polímero nativo (S2S-3), parcialmente dessulfatado (S2S-3D) e após tratamento alcalino (S2S-3T) utilizando o método de CIUCANU e KEREK (1984), da mesma maneira que a utilizada para as galactanas de *C. crenulata*.

Conforme foi observado anteriormente (Tabela-33), a fração S2S-3 apresenta unidades naturalmente metiladas na sua composição monossacarídica, desta forma esta galactana nativa e seu respectivo polímero dessulfatado S2S-3D, foram então submetidos a trideuterometilação (Tabela-36).

Os polissacarídeos permetilados foram hidrolisados utilizando o método de hidrólise redutiva descrito por FALSHAW e FURNEAUX (1994).

Os resultados de análise por CG-EM estão apresentados nas Tabelas-30 e 31.

Uma vez que o posicionamento dos grupos sulfato no polímero original é obtido com a análise comparativa, do polissacarídeo nativo e após dessulfatação solvolítica, os resultados de análise de metilação do polímero nativo e dessulfatado serão discutidos conjuntamente.

Como pode ser observado na Tabela-35 (p. 144), S2S-3 apresenta alta porcentagem do derivado 4,6-di-O-metilgalactose (20,0 mol%), que corresponde a unidades de β -D-galactose 2-sulfato. A presença de grupos sulfato em carbono-2 é comprovada pela análise de metilação da fração dessulfatada (S2S-3D), onde a maior parte deste grupo é removido, originando o derivado 2,4,6-tri-O-metilgalactose. Deste modo a galactana S2S-3 apresenta aproximadamente 18,2 mol% de β -galactose 2-sulfato, cujo posicionamento dos grupos sulfato está de acordo com os dados de RMN de ^{13}C anteriormente discutidos.

A unidade A altamente sulfatada em C-2 também constitui a galactana C2S-3 de *C. crenulata*, porém esta apresentou 29,4% de β -galactose 2-sulfato, portanto 11,2 % a mais que o encontrado em S2S-3.

Além de unidades A 2-sulfatadas, S2S-3 apresenta 4,8 mol% (Tabela-35) de β -galactopiranosose não substituída, um valor próximo ao encontrado para C2S-3 (3,0 mol%).

Ainda com relação as unidades A, podemos observar que a metilação de S2S-3, apresentou uma alta porcentagem de galactose (12,9 mol%), o qual desaparece entre os produtos de metilação de S2S-3D havendo concomitantemente um aumento do derivado 2-O-metilgalactose (2,2 $\rightarrow$ 8,9 mol%). Estes resultados são compatíveis com a presença de β -galactose 4,6-piruvatada e sulfatada em C-2. Na metilação de S2S-3D, pode ser notado que há somente 8,9 mol% de 2-O-metilgalactose, desta forma os 4,0 mol% de galactose restantes podem ser provenientes de unidades de galactose tri-O-substituídas. Assim S2S-3 apresenta uma maior proporção (8,9 mol %) de 4,6-O-(1'-carboxietilideno)- β -D-galactopiranosose 2-sulfato que C2S-3 (2,5 mol%) .

Em menor proporção, a metilação de S2S-3 mostra a presença do derivado 2,4-di-O-metilgalactose (4,1 mol%) e 4-O-metilgalactose (5,4 mol%), correspondentes a unidades de galactose substituídas em C-6 e galactose substituídas em C-6 e C-2, respectivamente. Na galactana dessulfatada S2S-3D, somente o derivado 2,4-di-O-metilgalactose (5,2 mol%) é observado. Deste modo, podemos concluir que as unidades galactose substituídas em C-6 e C-2 da galactana S2S-3 (derivado 4-O-metilgalactose) são correspondentes a unidades de galactose 2,6-dissulfato e/ou e galactose 2-sulfato 6-glicosil. As unidades sulfatadas em C-2 e C-6 após dessulfatação estariam presentes na forma do derivado 2,4,6-tri-O-metilgalactose.

Em resumo, as unidades A de S2S-3 apresentam-se aproximadamente 77% sulfatadas em C-2 (β -galactopiranosose 2-sulfato, β -galactopiranosose piruvatada e sulfatada em C-2, β -galactopiranosose 2,6-dissulfato e β -galactose 2-sulfato 6-glicosiladas). Os 23% restantes são constituídos por unidades não sulfatadas (β -galactopiranosose não substituída e β -galactopiranosose 6-glicosilada).

Na galactana C2S-3 de *C. crenulata* as unidades A apresentam-se mais sulfatadas em C-2 que a galactana S2S-3 de *C. seminervis*, porém está última

apresenta maior proporção de unidades piruvatadas (1 unidade piruvatada a cada 12 unidades).

TABELA-35 RESULTADOS DAS ANÁLISES DE METILAÇÃO DAS FRAÇÕES S2S-3, S2S-3D e S2S-3T.

Derivado ^a	S2S-3	S2S-3D	S2S-3T
<i>Unidades A</i>			
2,4,6-Gal	4,8	29,3	5,2
4,6-Gal	20,0	1,8	20,2
2,4-Gal	4,1	5,2	4,5
4-Gal ^b	5,4	-	5,9
Gal	12,9	-	12,4
<i>Unidades B</i>			
2,3,6-Gal	5,7	20,3	5,8
2,3-Gal	6,4	-	-
3-Gal ^b	3,6	-	-
3, 6-Gal	1,0	-	1,0
2AG	15,4	17,6	23,4
AG	4,9	2,2	7,5
<i>Unidades A e/ou B</i>			
6-Gal	2,7	-	2,9
2,6-Gal	3,6	8,2	2,1
2-Gal	2,2	8,9	2,3
<i>Unidades terminais</i>			
2,3,4-Xil	3,6	3,2	3,4
2,3,4,6-Gal	3,7	3,3	3,4

^aMol% de monossacarídeo contendo grupos metil ou trideuterometil nas posições indicadas.

^bDeterminado após hidrólise ácida, redução com NaBD₄ e acetilação. A proporção relativa de 4- e 3-Gal foi determinada usando os fragmentos (*m/z*) 132 and 133, respectivamente.

^c Análise de CG-EM mostrou grupo metil natural em C-2.

Com relação às unidades B, podemos observar a presença do derivado 3,6-anidro-2-O-metilgalactose (15,4 mol%) no polímero nativo, indicando que as unidades anidrogactosídicas apresentam-se na sua maioria sem substituição em C-2. A composição monossacarídica de S2S-3 (Tabela-33) mostra a presença de somente 3,5% deste derivado naturalmente metilado, portanto 11,9 mol% são correspondentes as unidades anidrogactosídicas sem substituição em C-2. Na galactana dessulfatada observamos 17,6 mol% de 3,6-anidro-2-O-metilgalactose, este aumento é compatível com a presença de 3,6-anidrogactose 2-sulfato (~ 2,2 mol%).

A presença do derivado 2,3-di-O-metilgalactose na metilação de S2S-3 (6,4 moles%), indica a presença de unidades precursoras de 3,6-anidrogactose (α -galactose 6-sulfato), como pode ser confirmado pela metilação da galactana dessulfatada onde este derivado di-metilado está ausente, havendo um aumento do derivado 2,3,6-tri-O-metil-galactose. Na metilação da galactana submetida a tratamento alcalino (S2S-3T), também ocorre o desaparecimento do derivado 2,3-di-O-metilgalactose. Neste polímero as unidades de α -galactose 6-sulfato são convertidas a 3,6-anidrogactose, sendo o aumento na porcentagem do derivado 3,6-anidro-2-O-metilgalactose (15,4 $\rightarrow$ 23,4 mol%) correspondente as unidades precursoras.

Ainda com relação às unidades precursoras de 3,6-anidrogactose, o derivado 3-O-metilgalactose (3,6 mol%) presente na metilação de S2S-3, (unidades α -galactose 2,6-dissulfato), está ausente tanto na metilação da galactana dessulfatada (onde ocorre um aumento de 2,3,6-tri-O-metilgalactose). quanto na metilação da galactana S2S-3T. Nesta há um aumento de 3,6-anidrogactose (4,9 $\rightarrow$ 7,5 mol%) correspondente a presença de 2,6 mol% de 3,6-anidrogactose 2-sulfato proveniente da ciclização. Pode ser notado que na metilação da galactana dessulfatada S2S-3D permaneceu 2,2 % de 3,6-anidrogactose; este pode estar substituído em C-2 por unidades de xilose ou galactose terminais, ou ainda estas unidades podem estar sulfatadas em C-2, pois o polímero S2S-3D é parcialmente dessulfatado.

As unidades de α -galactopiranosose de S2S-3 também estão presentes na forma não substituída (5,7 mol%). Uma pequena porcentagem de 3,6-di-O-metilgalactose (1,0 mol%) (Tabela-35) é observado tanto na metilação de S2S-3 como de S2S-3T, que desaparece na análise de metilação de S2S-3D, indicando uma pequena proporção de unidades de α -galactopiranosose 2-sulfatadas.

Em resumo as unidades B de S2S-3 são principalmente encontradas na forma de 3,6-anidrogallactose (~55 % do total de unidades B), sendo que 56% destas são não substituídas, 20% são naturalmente metiladas em C-2, e ~24% são sulfatadas em C-2. É importante ressaltar que a galactana C2S-3 de *C. crenulata*, apresenta uma maior proporção de unidades 3,6-anidrogallactosídicas naturalmente metiladas em C-2 (8,6 %), bem como apresenta uma maior proporção destas unidades sulfatadas em C-2 (20 % de suas unidades anidrogallactosídicas).

Em menor proporção S2S-3 apresenta unidades de α -galactose não substituída, 6-sulfatada, 2,6-dissulfatada e ainda somente sulfatada em C-2.

É observado também na metilação de S2S-3 a presença dos derivados 2,6-di-O-metilgalactose e 6-O-metilgalactose, os quais podem ser originados tanto da unidade A (β -galactose 4-O-substituída e β -galactose 2,4-di-O-substituída), como das unidades B (α -galactose 3-O-substituída e α -galactose 2,3-di-O-substituída) (MILLER et al., 1995). A presença do derivado 6-O-metilgalactose, na metilação de *Gloiopeltis furcata* foi interpretada por TAKANO et al. (1998), como unidade A, ou seja β -galactose 2,4-dissulfato, devido a presença da banda de absorção em 850 cm^{-1} (correspondente a sulfato em C-4 axial) no espectro de FT-IR.

O espectro de FT-IR da galactana S2S-3 (Figura-31, p. 130) apresenta uma banda larga de $825 - 850\text{ cm}^{-1}$, na região que define os posicionamentos dos grupos sulfato. Portanto uma pequena proporção de unidades sulfatadas em carbono secundário axial (β -D-galactopiranosose 4-sulfato), podem estar presentes na galactana S2S-3.

Os resultados de metilação mostram claramente a presença de unidades terminais de xilose (3,2 - 3,6%) e galactose (3,3 - 3,8%). Estas unidades glicosídicas podem estar substituindo o C-4 de unidades de β -galactose ou o C-3 de α -galactose,

devido a presença do derivado 2,6-di-O-metilgalactose (8,2 mol%) na análise de metilação da galactana dessulfatada (S2S-3D).

Os resultados de trideuterometilação das galactanas S2S-3 e S2S-3D (Tabela-36), reforçam os resultados discutidos anteriormente e nos indicam o posicionamento das unidades naturalmente metiladas.

As unidades A (β -galactopiranosose) que compõem a galactana S2S-3, são na sua maioria substituídas em C-2 por grupos sulfato (G2S), pela presença do derivado 4,6-CD₃Gal (20,0 mol% na galactana nativa). Podem estar sulfatadas em C-2 e substituídas em C-6 por glicose ou xilose ou sulfatadas em C-2 e C-6 (5,4 mol%). Ainda podem apresentar sulfato em C-2 e piruvato nos carbonos 4 e 6 (GP2S) (8,9 mol% de 2-CD₃Gal na galactana dessulfatada).

As unidades A não sulfatadas em C-2, são representadas por 2,8% de β -galactopiranosose não substituída (2,4,6-CD₃Gal, na galactana nativa), 2,0 mol% de 4-O-metil- β -galactopiranosose (4Me-2,6-CD₃Gal) e 4,1% de unidades de β -galactopiranosose 6-glicosilada e/ou 6-sulfatada (2,4-CD₃Gal).

Portanto as unidades A de S2S-3 sulfatadas e não sulfatadas em C-2, estão presentes numa proporção de 77% e 23%, respectivamente.

A galactana de C2S-3 de *C. crenulata* apresentou proporção maior de unidades A sulfatadas em C-2 (91%), do que a galactana S2S-3 (77%), sendo que nesta última as unidades 2-sulfatadas não estão ligadas a unidades precursoras de 3,6-anidrogallactose, de acordo com os resultados da cinética de ciclização.

Os monossacarídeos naturalmente metilados no carbono 2 são todos pertencentes a unidade B, conforme os resultados da análise por CG-EM (alditol acetato) das galactanas trideuterometiladas (Tabela-36). De acordo com a composição monossacarídica (Tabela-33) a galactana S2S-3 apresenta 4 mol% de 2-O-metilgalactose. Na análise por CG-EM dos produtos de hidrólise de S2S-3 trideuterometilado é observado a presença de 1,8 mol% de 2Me-3,6-CD₃Gal e 1,2 mol% de 2Me-CD₃Gal, correspondente às unidades naturalmente metiladas, 2-O-metil- α -galactose e 2-O-metil- α -galactose 6-sulfato, respectivamente.

Com relação às unidades anidrogallactosídicas é possível observar na composição monossacarídica da galactana S2S-3 3,5 mol% de 3,6-anidro-2-O-

metilgalactose (Tabela-33, p. 139), na análise de trideuterometilação (Tabela-36, p. 150) observamos a presença de 4,0 mol% (no polímero nativo) e 3,1 mol% (no polímero dessulfatado) do derivado 2Me-AnGal, de acordo com a sua composição.

O derivado 2-CD₃AnGal (11,4 mol%), na galactana S2S-3, corresponde a unidades 3,6-anidrogalactosídicas não substituídas. Este mesmo derivado deuterado, na galactana dessulfatada, está presente numa proporção de 14,5 mol%. Assim o aumento de 3,1% se deve a presença de unidades de 3,6-anidrogalactose 2-sulfato. Esta última unidade aparece na metilação da fração S2S-3 como AG (4,9 mol%), esta porcentagem é reduzida em 2,7% na metilação da fração dessulfatada, devido a remoção dos grupos sulfato. Assim conforme foi concluído na análise da Tabela-35, as unidades anidrogalactosídicas estão predominantemente não substituídas na galactana S2S-3.

A análise por CG-EM dos produtos de hidrólise da galactana S2S-3 as unidades de galactose presentes como terminais não redutoras são todas naturalmente metiladas em C-4 (4Me-2,3,6-CD₃Gal). A proporção de unidades de 4-O-metilgalactose como terminais não redutores (3,3 - 3,7 mol%) está de acordo com a porcentagem encontrada na composição monossacarídica (3,5 mol%), desta galactana.

A presença de galactose mono-metilada parece ser comum, nas galactanas extraídas de algas da ordem Halymeniales (Tabela-2, p. 21). Embora as unidades de galactose metiladas sejam freqüentemente associadas às agaranas, é importante ressaltar que estas unidades metiladas também têm sido reportadas em caragenanas. Recentemente CHIOVITTI et al. (2004) identificou uma carragenana com 45 mol% de 6-O-metilgalactose, extraída da alga *Claviconium ovatum* (ordem Gigartinales).

Em algumas galactanas extraídas de algas da ordem Halymeniales tem sido observado a presença de unidades de 2-O-metilgalactose e 4-O-metilgalactose pertencentes a série enantiomérica L- (CHOPIN et al., 1994). Na galactana biossintetizada pela espécie *Aeodes ulvoidea*, foram encontrados unidades de 4-O-metil-L-galactose como terminais não redutoras substituindo o carbono 6 de algumas unidades de galactose (ALLSOBROOK et al., 1971).

Desta forma o resultado obtido para a galactana S2S-3, com relação as unidades terminais não redutoras de galactose naturalmente metiladas, podem apresentar importância taxonômica. É importante ressaltar que a análise enantiomérica destas unidades não foi investigada para tal atribuição.

Como foi discutido anteriormente, a presença de unidades de xilose tem sido encontrada em galactanas de diferentes espécies de algas vermelhas, as quais não parecem ter importância taxonômica. Pequenas quantidades de xilose são freqüentemente encontradas em polissacarídeos provenientes de espécies de algas da ordem Halymeniales, como pode ser observado na Tabela-2. De modo similar, na galactana S2S-3 foi encontrado uma pequena porcentagem de unidades de xilose. De acordo com a análise de metilação, estas unidades estão presentes como unidades terminais não redutoras (2,3,4-CD₃Xyl). Como foi caracterizado por BARBAKADZE e USOV em 1978, estas unidades de xilose se encontram ligadas à cadeia principal da galactana, como ramificações individuais.

TABELA-36 TRIDEUTEROMETILAÇÃO DA GALACTANA NATIVA S2S-3 (N) E DA PARCIALMENTE DESSULFATADA S2S-3D (D).

Derivado	Composto por	Unidade Correspondente		mol%		(m/z) ^a
		N	D	N	D	
2,4,6-Gal	2,4,6-CD ₃ Gal	G	G + G2S + G2,6S	2,8	27,3	107, 167
	6Me-2,4-CD ₃ Gal	G6M	G6M	2,0	2,0	104, 164
4,6-Gal	4,6-CD ₃ Gal	G2S	G2S / G2R	20,0	1,8	
2,4-Gal	2,4-CD ₃ Gal	G6S / G6R	G2S6R / G6S	4,1	5,2	
4-Gal ^b	4-CD ₃ Gal	G2,6S / G2S6R		5,4	-	132, 192
2,3,6-Gal	2,3,6-CD ₃ Gal	D / L	D / L + L6S + L2,6S	3,9	17,5	107, 120, 167
	2Me-3,6-CD ₃ Gal	D2M / L2M	D2M / L2M + L2M6S	1,8	2,8	104, 117, 164
2,3-Gal	2,3-CD ₃ Gal	L6S ^c		5,2	-	107, 120, 167
	2Me-CD ₃ Gal	L2M6S ^c		1,2	-	104, 117, 164
3-Gal ^b	3-CD ₃ Gal	L2,6S ^c		3,6	-	133, 193
3,6-Gal	3,6-CD ₃ Gal	D2S / L2S	D2S / L2S	1,0	-	
2AG	2-CD ₃ AnGal	LA ^c	LA + LA2S	11,4	14,5	120
	2Me-AnGal	LA2M ^c	LA2M	4,0	3,1	117
AG	AG	LA2S ^c	LA2S / LA2X	4,9	2,2	
2-Gal	2-CD ₃ Gal	Gal-3,6-s / Gal-4,6-s	GP2S	2,2	8,9	
Gal	Gal	GP2S / gal-tri-s		12,9	-	
2,6-Gal	2,6-CD ₃ Gal	Gal-3-s / Gal-4-s	Gal-2,3-s / Gal-2,4-s	3,6	8,2	
6-Gal	6-CD ₃ Gal	Gal-2,3-s / Gal-2,4-s		2,7	-	
2,3,4-Xil	2,3,4-CD ₃ Xil	R	R	3,6	3,2	
2,3,4,6-Gal	4Me-2,3,6-CD ₃ Gal	R	R	3,7	3,3	104, 132, 151, 211

CD₃ = Trideuterometil; ^aFragmentos usados para determinar as proporções relativas dos alditóis acetato parcialmente metilados e parcialmente trideutériometilados. ^bDeterminado após hidrólise ácida, redução com NaBD₄, acetilação e análise em CG-EM. ^cAs indicações enantioméricas foram baseadas nas análises enantioméricas do conteúdo de 3,6-anidrogactose na galactana nativa e na submetida a tratamento alcalino.

R= Terminal não redutor (xilose ou 4-O-metilgalactose) glicosilando as posições indicadas.

(/ significa e/ou, - significa não detectado, s significa substituição não determinada nas posições indicadas).

4.2.3.4- DESPOLIMERIZAÇÃO PARCIAL DA GALACTANA S2S-3

A galactana S2S-3 foi parcialmente despolimerizada, de modo similar a galactana de *C. crenulata* C2S-3.

O material parcialmente hidrolisado de *C. seminervis* foi tratado de modo diferente a galactana parcialmente despolimerizada de *C. crenulata*. Após evaporação do ácido o material hidrolisado foi dialisado, em membrana de diálise de 14.000 Da, contra água destilada para a remoção do agente redutor 4-metil-morfolina borano. Desta forma, foi obtido um maior rendimento de material parcialmente despolimerizado. É importante ressaltar que este método de purificação só foi possível, devido ao conhecimento prévio da massa molecular média da fração despolimerizada de *C. crenulata* (CC).

A fração despolimerizada de S2S-3 foi denominada de CS. A composição monossacarídica mostra uma alta porcentagem de galactose e de 3,6-anidrogallactose.

Comparando a análise da composição monossacarídica, da fração CS (Tabela-37) com o polímero de origem S2S-3 (Tabela-33), podemos observar que CS contém as mesmas unidades monossacarídicas encontradas na sua fração de origem S2S-3: galactose, 3,6-anidrogallactose, 3,6-anidro-2-O-metilgalactose, galactose monometilada em C-2, C-4 e C-6 e xilose (Tabela-37). O tratamento químico provocou um aumento no teor das unidades de 3,6-anidrogallactose, e não ocasionaram a perda significativa dos grupos sulfato, desde que a fração CS apresentou 21,4 % de NaSO₃.

As unidades de xilose em CS permaneceram numa proporção similar ao polímero nativo S2S-3, o que não ocorreu na fração CC parcialmente despolimerizada de C2S-3, que não apresentou na sua composição unidades de xilose.

TABELA-37 ANÁLISE DO TEOR DE SULFATO E COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DA FRAÇÃO CS PROVENIENTE DA HIDRÓLISE REDUTIVA PARCIAL DA GALACTANA S2S-3 DE *C. seminervis*.

Fração	Sulfato ^a (%)	Monossacarídeos (mol %)						
		Gal ^b	AG	2AG	2Gal	4Gal ^c	6Gal	Xil
CS	21,4	52,8	25,2	5,5	4,6	3,2	3,5	5,2

^aExpresso como NaSO₃.

^bAbreviatura dos monossacarídeos (Gal = galactose; AG = 3,6-anidrogallactose; 2AG = 3,6-anidro-2-O-metilgalactose; 2Gal = 2-O-metilgalactose; 4Gal = 4-O-metilgalactose; 6Gal = 6-O-metilgalactose; Xil = Xilose).

^cDeterminado após hidrólise ácida total, redução com borodeutereto sódio e análise por CG-EM.

A análise de metilação mostrou um padrão de complexidade similar ao observado para a galactana de origem S2S-3 (Tabela-38). Algumas diferenças podem ser observadas na metilação de CS, como o aumento do derivado 2,4,6-tri-O-metilgalactose com um concomitante decréscimo de 4,6-di-O-metilgalactose. Embora a dosagem do teor de sulfato não tenha sido alterada, estes dados da metilação mostram que a hidrólise resultou em saída de grupos sulfato em C-2 das unidades A. Esta dessulfatação das unidades A foi mais pronunciada na despolimerização da galactana (fração CC) de *C. crenulata*, cujo despolimerizado passou a apresentar 17,8 mol% do derivado 2,4,6-tri-O-metilgalactose na sua metilação.

A metilação de CS mostrou aumento dos derivados 2,3,6-tri-O-metilgalactose, 3,6-anidrogallactose e 3,6-anidro-2-O-metilgalactose, bem como uma diminuição na porcentagem de 2,3-di-O-metilgalactose (Tabela-38).

As unidades terminais não redutoras de xilose e galactose não foram alteradas pela despolimerização, como já havia sido observado na análise de composição monossacarídica a presença de 5,2 mol% de xilose e 3,2 mol% de 4-O-metilgalactose.

TABELA-38 ANÁLISE DE METILAÇÃO DA GALACTANA S2S-3 E DA FRAÇÃO CS.

Derivado ^a	S2S-3	CS
<i>Unidades A</i>		
2,4,6-Gal	4,8	10,8
4,6-Gal	20,0	8,2
2,4-Gal	4,1	4,4
4-Gal ^b	5,4	4,3
Gal	12,9	10,6
<i>Unidades B</i>		
2,3,6-Gal	5,7	7,7
2,3-Gal	6,4	3,9
3-Gal ^b	3,6	2,0
3,6-Gal	1,0	-
2AG	15,4	23,1
AG	4,9	6,6
<i>Unidades A e/ou B</i>		
6-Gal	2,7	3,7
2,6-Gal	3,6	3,0
2-Gal	2,2	4,5
<i>Unidades terminais</i>		
2,3,4-Xil	3,6	4,1
2,3,4,6-Gal	3,7	3,3

^aMol% de monossacarídeo contendo grupos metil nas posições indicadas.

^bDeterminado após hidrólise ácida, redução com NaBD₄ e acetilação. A proporção relativa de 3- e 4-Gal foi determinada usando os fragmentos (*m/z*) 132 and 133, respectivamente.

O espectro de RMN de ¹³C da fração CS (Figura-36, p. 157), mostra maior número de sinais na região anomérica quando comparado ao espectro da galactana S2S-3, de modo similar ao obtido para a fração CC, despolimerizado da galactana C2S-3 de *C. crenulata*.

Para a análise destes deslocamentos químicos foram necessários os resultados de metilação previamente obtidos.

Os sinais em destaque na Figura-36 (p. 157), 25,1 e 175,4 ppm correspondem aos carbonos metílico e carboxílico de acetal de ácido pirúvico, respectivamente (GAREGG et al., 1979; GORIN et al., 1982).

Os deslocamentos químicos correspondentes a unidades de 3,6-anidrogallactitol (C-1 e C-3 em 62,8 e 83,5 ppm, respectivamente) (USOV; ELASHVILI, 1991) podem ser observados claramente na Figura-36, indicando a clivagem de parte das unidades 3,6-anidrogallactosídicas.

Dois outros sinais em 86,3 e 85,6 ppm, de baixa intensidade, também são assinalados na Figura-36, de acordo com GONÇALVES et al. (2002), ambos sinais são atribuídos ao C-4 de 3,6-anidrogallactitol, quando ligados a unidades de β -gallactopiranosose 2-sulfato e 4,6-O-(1'-carboxietilideno)- β -gallactopiranosose 2-sulfato, respectivamente. Estes resultados confirmam que as unidades piruvatadas estão em partes ligadas a unidades de 3,6-anidrogallactose no polímero de origem S2S-3.

A presença de unidades A sulfatadas e piruvatadas (GP2S) está de acordo com a presença de gallactose (12,9 e 10,6 mol%) na análise de metilação da gallactana S2S-3 e da fração despolimerizada CS, respectivamente.

Conforme foi mencionado anteriormente o espectro de RMN de ^{13}C da fração CS, indica a clivagem de parte das unidades 3,6-anidrogallactosídicas, devido à presença dos sinais correspondentes as unidades de 3,6-anidrogallactitol. O deslocamento químico na região anômérica centrado em 98,3 ppm, corresponde ao C-1 de unidades anidrogallactosídicas, é importante ressaltar que este sinal compreende uma faixa de 97,8 - 98,5 ppm. Os sinais em 81,9 e 82,5 ppm são atribuídos ao C-3 de unidades de β -gallactopiranosose ligadas a 3,6-anidro-L-gallactose e a 3,6-anidro-2-O-metil-L-gallactose, respectivamente. Como foi ressaltado anteriormente, estes sinais de C-3 são característicos quando as díades de β -gallactopiranosose ligadas a 3,6-anidro-L-gallactose e a de β -gallactopiranosose ligada a 3,6-anidro-2-O-metil-L-gallactose, estão presentes no polímero em análise (MILLER; BLUNT, 2000a). O sinal em 81,9 ppm já era observado no espectro da gallactana S2S-3, porém o sinal de 82,5 ppm só foi evidenciado na fração despolimerizada.

Outros sinais também foram somente observado no espectro de CS, como o sinal em 104,2 ppm que pode, em parte, corresponder ao C-1 de unidades de β -D-xilose e/ou β -D-galactose ligadas ao C-6 das unidades A, bem como pode ser atribuído ao C-1 de unidades de β -galactopiranosose ligadas a α -D-galactose, cujo sinal em 96,1 ppm corresponde ao carbono anomérico desta última unidade.

O sinal em 96,7 ppm foi somente observado nas frações despolimerizadas CC de *C. crenulata* e CS de *C. seminervis*. Este sinal pode ser atribuído ao C-1 de 3,6-anidro- α -L-galactose 2-sulfato. Estas unidades anidrogalactosídicas sulfatadas em C-2 são bem caracterizadas nas carragenanas (*iota*- e *alpha*-carragenana), portanto quando pertencentes a série D-. Porém as unidades de 3,6-anidro- α -L-galactose 2-sulfato foram apenas relatadas por MILLER e BLUNT (2000b) para a galactana de *Cladhymania oblongifolia*, após tratamento alcalino. O sinal em 97,1 ppm foi atribuído pelos autores ao C-1 destas unidades. Recentemente DUARTE et al. (2004) identificaram através da análise de metilação, a presença, em baixas percentagens de unidades de 3,6-anidro- α -L-galactose 2-sulfato em galactanas de *Acanthophora spicifera*.

A presença destas unidades de 3,6-anidro- α -L-galactose 2-sulfato nas frações despolimerizadas, pode indicar que estas unidades são mais resistentes a hidrólise redutiva parcial, pela proximidade do grupo sulfato a ligação glicosídica.

Desta forma, podemos observar que a fração despolimerizada CS, além de manter as características estruturais do polímero de origem, como a presença de parte dos grupos substituintes e a permanência do caráter DL-híbrido da galactana, possibilitou a determinação de algumas díades (Tabela-39, p. 156), bem como a presença de unidades que não eram observadas nos espectros de RMN de ^{13}C da galactana de origem.

Assim a despolimerização, como já mencionado se torna uma ferramenta útil na análise estrutural de polissacarídeos altamente complexos.

É importante ressaltar que a ressonância magnética nuclear de ^{13}C fornece informações valiosas sobre as conexões das unidades monossacarídicas constituintes (as díades), já que as galactanas de algas vermelhas apresentam uma

estrutura alternante repetitiva de unidades A e B, como já mencionado. Porém com uma ressalva a este respeito, esta metodologia espectroscópica é valiosa para galactanas que apresentam uma regularidade estrutural significativa.

Galactanas altamente sulfatadas e não repetitivas (com mais de 20% de NaSO_3), apresentam espectros pouco resolvidos de difícil interpretação. Para algumas destas galactanas complexas, somente a análise espectroscópica do correspondente polímero dessulfatado fornece informações importantes para a sua caracterização estrutural.

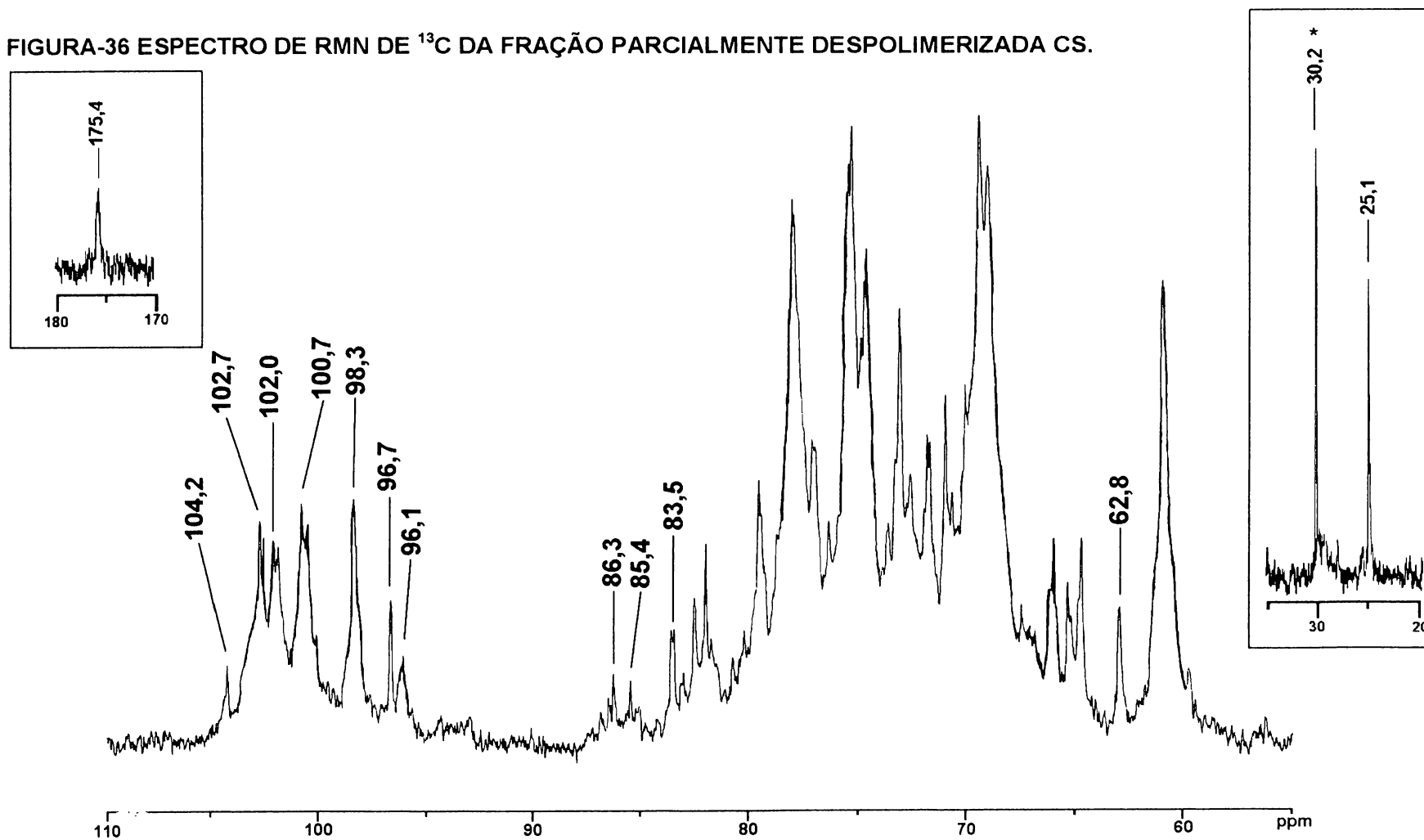
Em galactanas com alto teor de sulfato, e contendo outras substituições como acetal de ácido pirúvico, grupos metil, xilosil e galactosil, e ainda que apresentam unidades B pertencentes a série D- e L-, além da análise do polímero dessulfatado, é necessário a análise da galactana parcialmente despolimerizada.

TABELA-39 DESLOCAMENTOS QUÍMICOS (ppm) DE DÍADES ENCONTRADAS NO ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DA FRAÇÃO CS.

Díades	Unidade - A	Unidade - B
G → D	104,2	96,1
G(P) → LA2M	102,7	97,8 - 98,5
G(P) → LA	102,5	97,8 - 98,5
G2S → LA	100,7	97,8 - 98,5
G(P)2S → LA	100,7	97,8 - 98,5
G(P) → L	n.d ^a	100,5
G(P) → LA2S	n.d ^a	96,7

^aNão determinado, devido ao alargamento ou a sobreposição de sinais.

FIGURA-36 ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DA FRAÇÃO PARCIALMENTE DESPOLIMERIZADA CS.



Análise realizada à 60°C em D_2O , concentração das amostras 40 mg/mL.

*Sinal correspondente à acetona utilizada como padrão interno ($\delta = 30,2$ ppm).

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO DOS POLISSACARÍDEOS DE *Halymenia floridana*

4.3.1 OBTENÇÃO E ANÁLISES DAS FRAÇÕES BRUTAS DE *H. floridana*

FIGURA -37 FOTO DA ALGA *H. floridana*



Posição taxonômica da alga *H. floridana*:

Divisão: Rhodophyta

Classe: Rhodophyceae

Sub Classe: Florideae

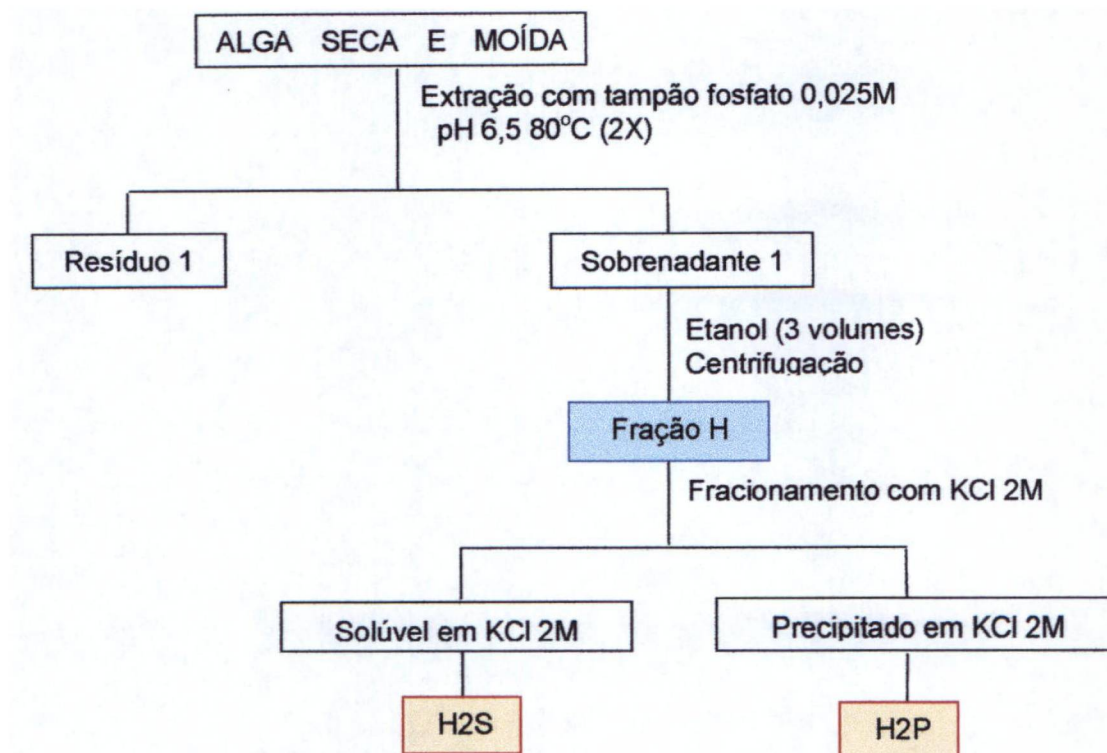
Ordem: Halymeniales

Família: Halymeniaceae

Gênero: *Halymenia*

Espécie: *Halymenia floridana* J. Agardh

ESQUEMA-4 EXTRAÇÃO E FRACIONAMENTO DOS POLISSACARÍDEOS OBTIDOS DA ALGA *Halymenia floridana*.



A alga *H. floridana*, coletada em Caiobá – PR, foi submetida a duas extrações (1,5 g%) seqüenciais a 80°C, utilizando como solvente tampão fosfato 0,025M pH 6,5. Este tipo de extração, com tampão, também foi utilizado nas extrações a 80°C de *C. crenulata* e de *C. seminervis*.

Cada um dos extratos obtidos a 80°C foram separadamente centrifugados, concentrados parcialmente a pressão reduzida, e tratados com etanol (3 volumes). Os precipitados etanólicos da 1ª e 2ª extrações foram reunidos e denominados de fração H (25,0% de rendimento, expresso em termos de alga seca e moída) (Tabela-40). O rendimento total em polissacarídeos *H. floridana* foi

um pouco maior que o de *C. crenulata* (aproximadamente 12,0%) e de *C. seminervis* (aproximadamente 10,0%)

TABELA-40 RENDIMENTO E ANÁLISE QUÍMICA DA FRAÇÃO DE *H. floridana* OBTIDA POR EXTRAÇÃO AQUOSA A 80°C.

Fração	Rendimento ^a (%)	Açúcar total (%) ^b	Sulfato NaSO ₃ (%) ^c	Proteína (%) ^d
H	25,0	58,0	26,0	8,3

^aRendimento calculado em relação ao peso seco de alga moída submetida a extração.

^{b, c, d} Determinado pelos métodos: fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS et al., 1956), DODGSON (1961) e LOWRY et al. (1951), respectivamente.

Como observado na Tabela-40, a fração H apresenta um elevado teor de sulfato (26,0%), como também foi observado nas frações brutas C2 e S2 de *C. crenulata* e de *C. seminervis*, respectivamente.

A composição monossacarídica (Tabela-41) demonstrara que a fração bruta H é constituída principalmente por galactose (74,4 mol%), 3,6-anidrogallactose (8,1 mol%) e 6-O-metilgalactose (8,5 mol%). Outros monossacarídeos como 3,6-anidro-2-O-metilgalactose, 2-O-metilgalactose e xilose são observados em baixas porcentagens.

Como pode ser notado na Tabela-41, a fração H não apresentou glucose na sua composição monossacarídica, assim está livre de contaminação por amido das florídeas (USOV, 1992).

É importante ressaltar que as frações brutas de *C. seminervis* (S1 - S3), apresentaram um elevado teor de glucose na sua composição monossacarídica (4,5 - 28,9 mol%), enquanto que nas frações brutas de *C. crenulata* (C1 - C3) foram menores (2,5 - 7,5 mol%).

TABELA-41 ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DA FRAÇÃO H DE *H. floridana* OBTIDA POR EXTRAÇÃO AQUOSA A 80°C.

Fração	Composição monossacarídica (mol%)					
	Gal ^a	AG	2AG	2Gal	6Gal	Xil
H	78,4	8,1	1,0	2,5	8,5	1,5

^aAbreviatura dos monossacarídeos (Gal = galactose; AG = 3,6-anidrogactose; 2AG = 3,6-anidro-2-O-metilgalactose; 2Gal = 2-O-metilgalactose; 6Gal = 6-O-metilgalactose; Xil = Xilose).

Com a finalidade de purificar a fração H de *H. floridana*, foi realizado um tratamento com solução de cloreto de potássio.

A fração H foi então solubilizada em água destilada, na concentração de 0,25 g%, e tratada com KCl, com um aumento gradual do sal, até a concentração de 2M (CEREZO, 1967). De acordo com a Tabela-42, 60% da fração polissacarídica H permaneceu solúvel em KCl 2M, e foi denominada de HS, enquanto que os 40% restantes foram precipitados em KCl 2M (HP).

A fração HS, de maior rendimento, apresentou também maior teor de sulfato (30,3%) que a fração HP (20,0% de sulfato).

Com relação as rotações ópticas específicas destas frações tratadas com KCl (Tabela-42), observamos que ambas são positivas, porém estes valores são baixos (+12,0° e +32,5°) quando comparados aos valores de rotação em torno de +70°, para galactanas do tipo carragenana. A galactana C2S-3 de *C. crenulata* também apresentou rotação óptica positiva (+23,5°) intermediária aos valores obtidos para as frações de *H. floridana*. Desta forma, as frações polissacarídicas HS e HP apresentam também unidades pertencentes à série L-.

TABELA-42 RENDIMENTO E ANÁLISE QUÍMICA DAS FRAÇÕES TRATADAS COM KCl DE *H. floridana*.

Fração	Rendimento ^a (%)	Açúcar total (%) ^b	Sulfato NaSO ₃ (%) ^c	Proteína (%) ^d	Ác. Pirúvico (%)	[α] _D ^e
HP	40,0	53,1	20,0	7,3	n.d	+32,5
HS	60,0	62,0	30,3	3,6	4,5	+12,0

^aRendimento calculado em relação ao total de material recuperado após tratamento com KCl.

^{b, c, d}Determinado pelos métodos: fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS et al., 1956), DODGSON (1961) e LOWRY et al. (1951), respectivamente.

^eRotação óptica específica das frações polissacarídicas na concentração de 0,2 g% em água, à temperatura de 20°C .

n.d, significa não determinado.

Na Tabela-43 observamos uma semelhança com relação à composição monossacarídica das frações HS e HP. Porém, como pode ser notado, somente a da fração que precipitou com KCl 2M (HP) apresentou unidades de xilose na sua composição monossacarídica, e também apresentou maior proporção de 3,6-anidro-α-L-2-O-metilgalactose.

Como já foi comentado anteriormente, as unidades de xilose são comumente encontradas em baixas proporções, em galactanas provenientes de diferentes espécies de algas vermelhas.

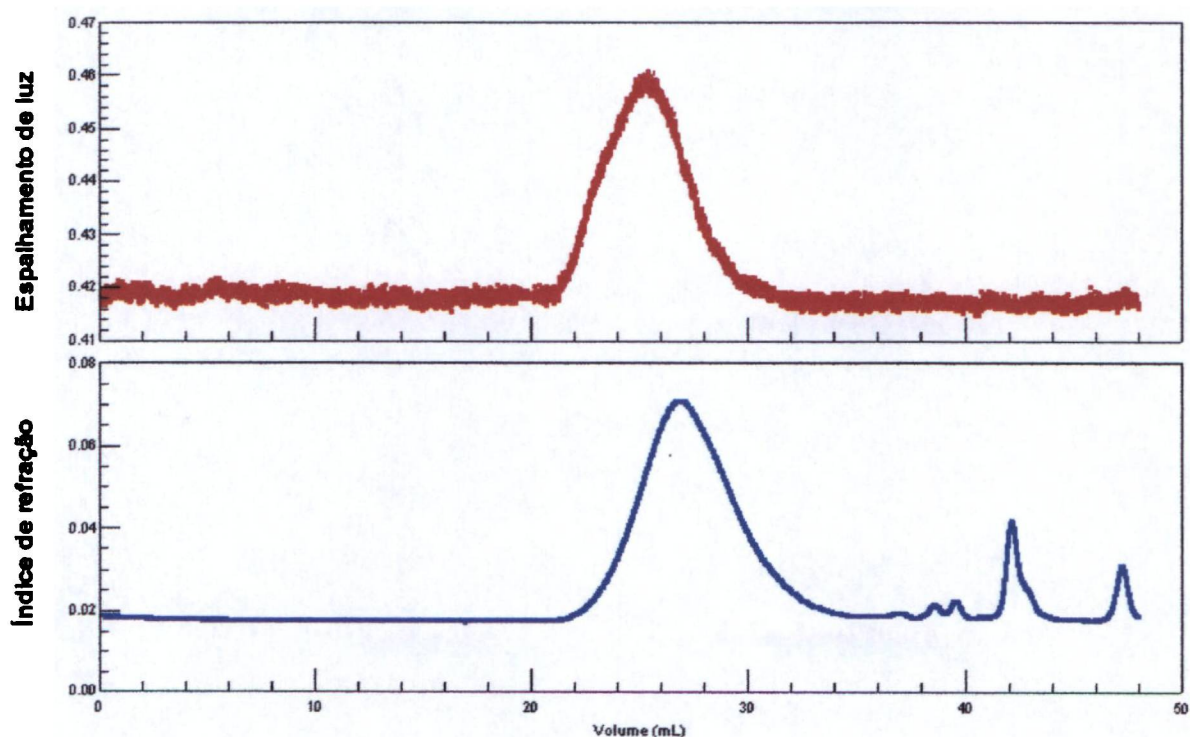
A fração HS foi submetida à análise de homogeneidade em cromatografia de exclusão estérica, acoplada a detectores de espalhamento de luz e de índice de refração. Como é possível observar na Figura-43, a fração HS mostrou um perfil homogêneo. É importante ressaltar que esta fração foi somente purificada por tratamento com KCl, não foi preciso submeter o material à coluna de troca-iônica, como foi necessário para a obtenção das galactanas homogêneas C2S-3, C1S-3 de *C. crenulata* e S2S-3 de *C. seminervis*.

TABELA-43 ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES HS E HP DE *H. floridana* OBTIDAS POR TRATAMENTO COM KCl.

Fração	Composição monossacarídica (mol%)					
	Gal ^a	AG	2AG	2Gal	6Gal	Xil
HS	81,6	7,8	1,2	2,3	5,3	-
HP	77,0	7,1	4,6	2,0	9,3	1,8

^aAbreviatura dos monossacarídeos (Gal = galactose; AG = 3,6-anidrogactose; 2AG = 3,6-anidro-2-O-metilgalactose; 2Gal = 2-O-metilgalactose; 6Gal = 6-O-metilgalactose; Xil = Xilose).

FIGURA-38 ANÁLISE DE HOMOGENEIDADE DA FRAÇÃO HS.



4.3.2- CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DE HS

4.3.2.1- ESPECTROSCOPIA DE RMN DE ^{13}C de HS

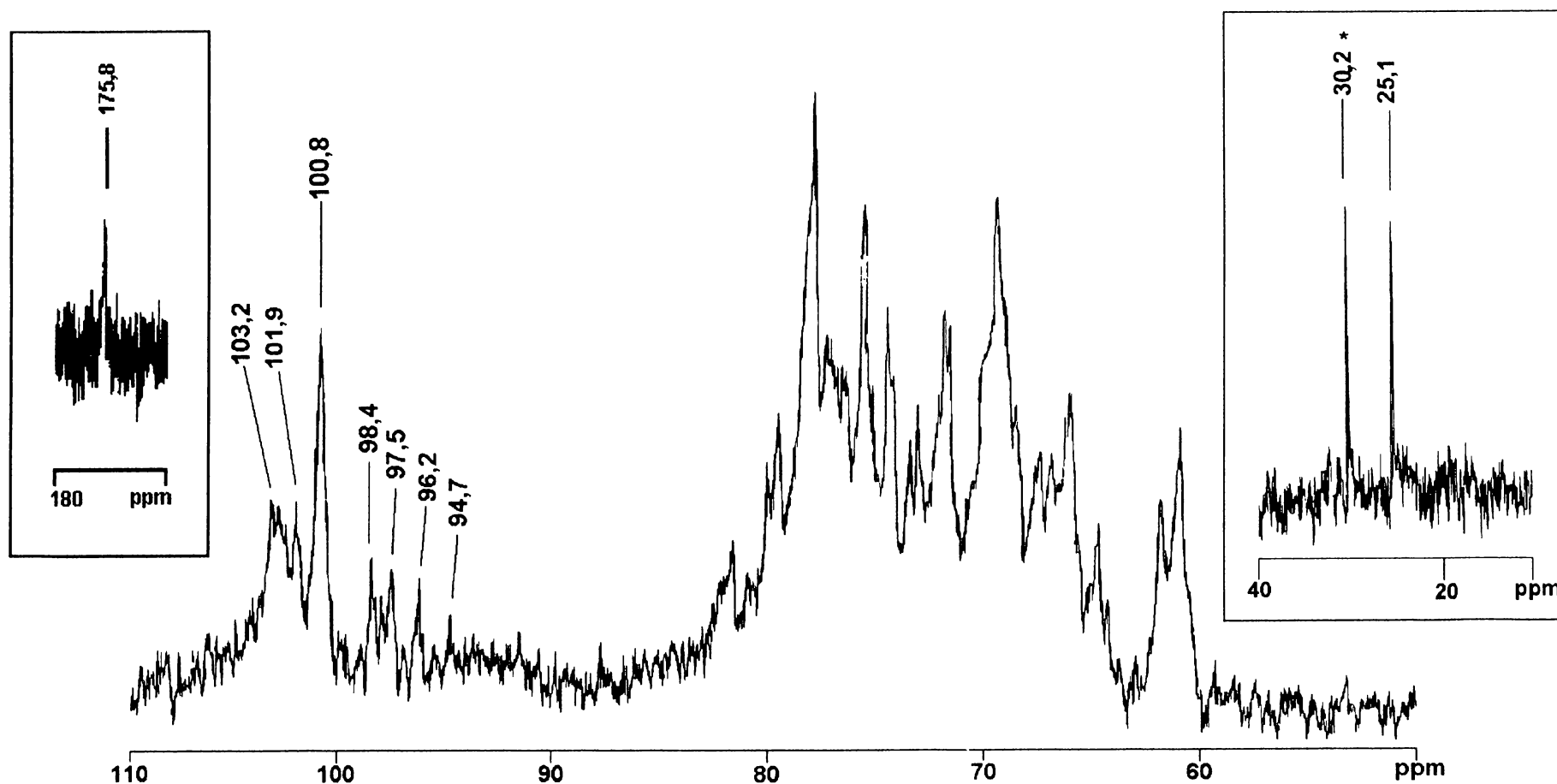
A fração homogênea HS foi submetida à análise de RMN de ^{13}C , obtendo-se o espectro da Figura-39. O espectro apresenta sinais alargados na região anomérica, principalmente na região de 101,9 - 103,2 ppm, provavelmente havendo sobreposição de sinais. Podemos observar que o espectro de HS (Figura-39) apresenta maior complexidade, quando comparado aos espectros das galactanas homogêneas C2S-3 e S2S-3. Desta forma, somente é possível fazer algumas atribuições.

Na região anomérica é possível observar a presença do sinal em 100,8 ppm, correspondente a unidades de β -D-galactose 2-sulfato, como observado também em C2S-3 e S2S-3. De acordo com esta atribuição, fora da região anomérica do espectro (Figura-39), é possível observar o sinal em 78,1 ppm, correspondente ao C-2 sulfatado destas unidades A.

O sinal em 100,8 ppm pode ser atribuído ao C-1 de unidades de α -L-galactose que pode estar sulfatada em C-6 ou não substituída. O sinal de C-1 da unidade de β -galactose ligada a esta unidade de α -L-galactose, pode ser representado pelo deslocamento químico centrado em 103,2 ppm.

O sinal de C-1 de unidades de 3,6-anidro-2-O-metil- α -L-galactose, aparece em 98,4 ppm. Já o deslocamento químico em 97,5 ppm é correspondente ao C-1 de 3,6-anidro- α -L-galactose, esta unidade pode estar ligada a unidades de β -galactose 2-sulfato (100,8 ppm) ou a unidades de β -galactose não sulfatadas (101,9 ppm). Com relação a esta última atribuição, é possível observar o sinal em 81,9 ppm, que é atribuído ao C-3 das unidades de β -galactopiranosose ligada a 3,6-anidro- α -L-galactose, confirmando a presença desta díade na galactana H2S (MILLER; BLUNT, 2000a).

FIGURA-39 ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DA FRAÇÃO HS



Análise realizada à 60°C em D_2O , concentração das amostras 40 mg/mL.

*Sinal correspondente à acetona utilizada como padrão interno ($\delta = 30,2$ ppm).

Ainda na Figura-44, é possível observar a presença do sinal em 94,7 ppm, que pode ser atribuído tanto ao C-1 de unidades de α -D-galactose ligadas a β -galactose 2-sulfato (C-1 em 103,2 ppm) (MILLER; BLUNT, 2000b), como ao C-1 de unidades de 3,6-anidro- α -D-galactose 2-sulfato (FALSHAW et al., 1996).

Outro sinal em 96,2 ppm, observado no espectro de HS, pode também ter mais de uma atribuição. Este deslocamento químico pode ser correspondente ao C-1 de α -D-galactose, bem como ao C-1 de 3,6-anidro- α -L-galactose 2-sulfato (MILLER; BLUNT, 2000b).

Os sinais em 175,8 e 25,1 ppm são correspondentes ao grupo carbonila ($\text{C}=\text{O}$) e ao grupo metil (CH_3 -), de acetal de ácido pirúvico, respectivamente, (GAREGG et al., 1979; CHIOVITTI et al., 1997), mostrando que unidades piruvatadas (4,6-O-(1'-carboxietilideno)- β -D-galactopirranose) também fazem parte das unidades A desta galactana homogênea (HS).

É importante ressaltar que foi publicado apenas um espectro de RMN ^{13}C de galactanas extraídas de algas do gênero *Halymenia*, *H. ceylanica* (LAI et al., 1994). A qualidade deste espectro não permitiu sua análise pelos autores. Sendo assim, a obtenção de um espectro de galactanas deste gênero já é um avanço na análise estrutural destes polímeros.

4.3.2.2- DESSULFATAÇÃO SOLVOLÍTICA DE HS

Como foi observado a galactana HS com 30,3% de sulfato, apresentou um espectro de RMN de ^{13}C com alta complexidade, compatível com o alto teor de sulfatação. No intuito de se determinar o posicionamento dos grupos sulfato, e de se obter uma simplificação no espectro de RMN de ^{13}C a galactana HS foi submetida a dessulfatação solvolítica pelo método de NAGASAWA et al. (1979), do mesmo modo que as galactanas C2S-3 e S2S-3, descritas anteriormente.

A galactana HS após dessulfatação solvolítica foi denominada HS-D (rendimento de 63,0%) com 3,2% de NaSO_3 , o que corresponde a 89% de dessulfatação.

De acordo com a Tabela-44, podemos observar através da comparação da composição monossacarídica da fração original e da dessulfatada, que o tratamento solvolítico não ocasionou alteração significativa da composição monossacarídica da fração, removendo eficientemente os grupos sulfato.

TABELA-44 ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES HS E HS-D DE *H. floridana*.

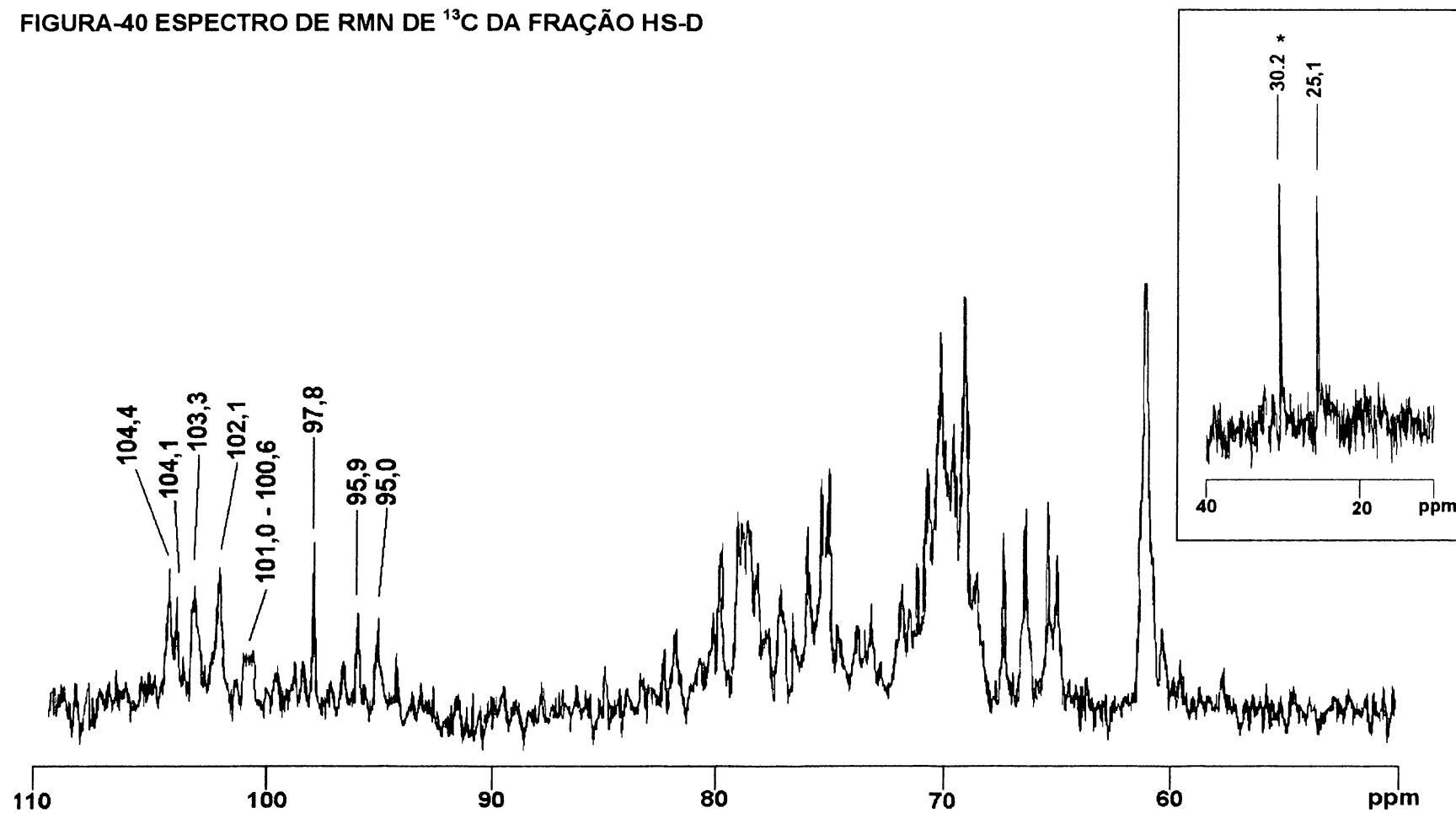
Fração	Composição monossacarídica (mol%)				
	Gal ^a	AG	2AG	2Gal	6Gal
HS	81,6	7,8	1,2	2,3	5,3
HS-D	83,8	7,5	1,0	1,9	5,8

^aAbreviatura dos monossacarídeos (Gal = galactose; AG = 3,6-anidrogactose; 2AG = 3,6-anidro-2-O-metilgalactose; 2Gal = 2-O-metilgalactose; 6Gal = 6-O-metilgalactose).

O espectro de RMN de ^{13}C (Figura-40) demonstra que a dessulfatação modificou alguns sinais quando comparado com o espectro da fração nativa (Figura-39), onde se pode observar também a presença de um maior número de sinais, bem definidos, na região anomérica.

É importante ressaltar que o sinal correspondente ao grupo metil de acetal de ácido pirúvico em 25,1 ppm, se encontra presente no espectro da galactana dessulfatada (HS-D), mostrando que o processo solvolítico além de não ter degradado as unidades monossacarídicas constituintes não ocasionou depiruvatação do polímero.

FIGURA-40 ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DA FRAÇÃO HS-D



Análise realizada à 60°C em D_2O , concentração das amostras 40 mg/mL.

*Sinal correspondente à acetona utilizada como padrão interno ($\delta = 30,2$ ppm).

No espectro do polímero dessulfatado (Figura-40), os sinais da região anomérica podem ser agrupados em pares, correspondentes ao C-1 das unidades que compõem as díades presentes no polímero.

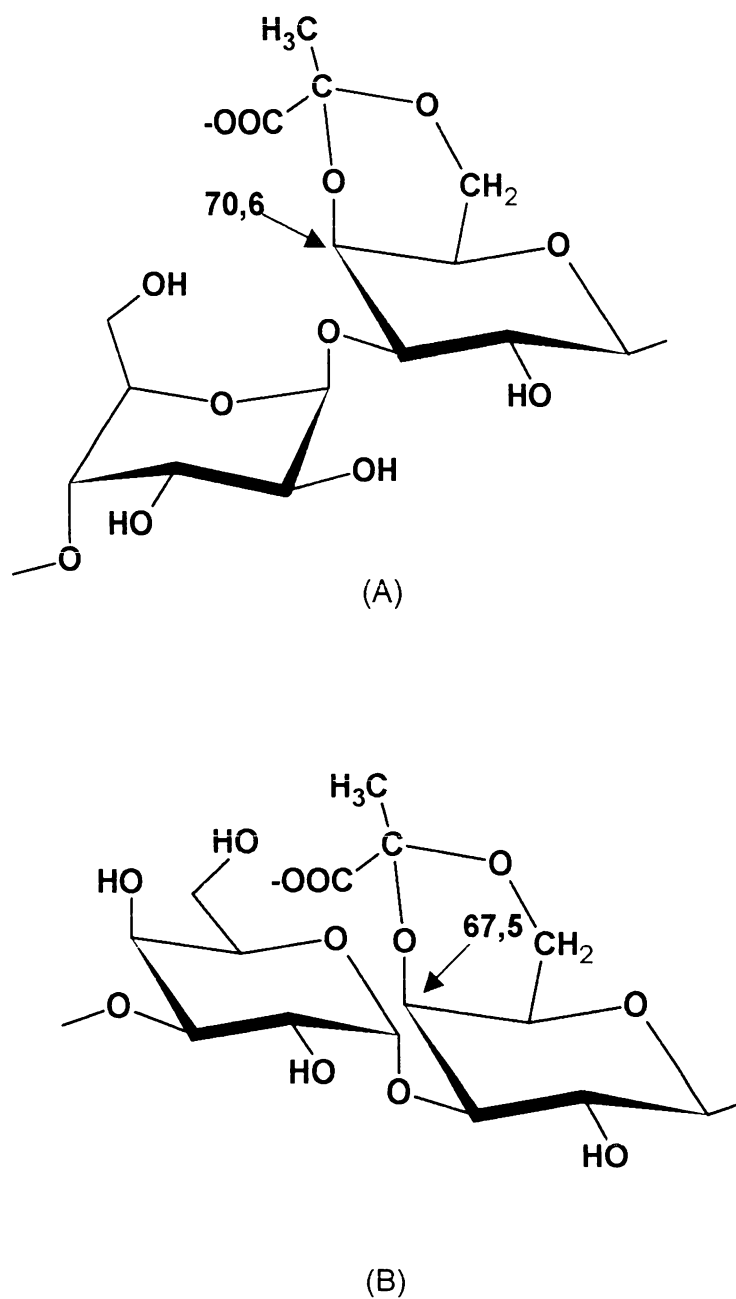
Assim os sinais em 104,4 ppm e 95,9 ppm, correspondem a unidades de β -D-galactopiranosose ligadas a α -D-galactopiranosose (USOV et al., 1980).

De acordo com FALSHAW et al. (2003), nas galactanas que apresentam a díade de β -galactopiranosose piruvatada ligada a α -D-galactopiranosose há um deslocamento para campo mais alto do sinal de C-1 da unidade B de aproximadamente 1,0 ppm. Assim o espectro da fração H2D também apresenta sinais correspondentes a unidades de 4,6-O-(1'-carboxietilideno)- β -D-galactopiranosose (C-1 em 104,1 ppm) ligadas a α -D-galactopiranosose (C-1 em 95,0 ppm). Portanto a galactana HS apresenta unidades de α -D-galactose ligadas tanto a unidades de β -D-galactopiranosose quanto a unidade de β -D-galactopiranosose piruvatada.

Os sinais em 67,3, 66,4 e 65,4 ppm (C-4 - C6, respectivamente) confirmam a presença de unidades 4,6-O-(1'-carboxietilideno)- β -D-galactopiranosose. O sinal em 67,3 ppm (presente no espectro de HS-D, Figura-40) confirma que as unidades piruvatadas estão ligadas a α -galactose pertencente a série D-, pois quando ligadas a α -L-galactose este sinal aparece em 70,6 ppm (FALSHAW et al., 2003b). Portanto, em *H. floridana*, unidades piruvatadas estão ligadas a α -D-galactose. Como pode ser observado na Figura-41, o sinal em 67,3 ppm (presente no espectro de HS-D) é correspondente ao C-4 de 4,6-O-(1'-carboxietilideno)- β -D-galactopiranosose quando esta unidade está ligada a α -D-galactose.

Na galactana S2S-3 de *C. seminervis*, pelo menos em parte as unidades piruvatadas estão ligadas a 3,6-anidro- α -L-galactose, e na galactana C2S-3 de *C. crenulata* as unidades piruvatadas podem estar ligadas a unidades de α -L-galactose ou a 3,6-anidro- α -L-galactose. Portanto nestas duas galactanas as unidades piruvatadas se encontram ligadas a unidades pertencentes a série L-.

FIGURA-41 DESLOCAMENTO QUÍMICO DO CARBONO 4 DAS UNIDADES DE 4,6-O-(1'-carboxietilideno)- β -D-galactopiranoose EM (A) α -L-galactopiranoose LIGADA A 4,6-O-(1'-carboxietilideno)- β -D-galactopiranoose E EM (B) α -D-galactopiranoose LIGADA A 4,6-O-(1'-carboxietilideno)- β -D-galactopiranoose (FALSHAW et al., 2003b).



Outros sinais na região anomérica do espectro de RMN de ^{13}C da fração HS-D (Figura-40), também podem ser observados, em 103,3 e 100,8 ppm, correspondentes a unidades de β -D-galactopiranosose ligada a α -L-galactopiranosose. É importante ressaltar que a diminuição da intensidade do sinal em 100,8 ppm, comparando as Figuras-39 e -40, comprova a presença de unidades de β -galactose 2-sulfato na fração original. Com relação a esta última unidade podemos observar ainda que, no polímero dessulfatado, houve também o desaparecimento do sinal em 78,1 ppm, o qual é correspondente a C-2 sulfatado.

Os sinais em 102,1 e 97,8 ppm, também são observados na Figura-40, são atribuídos aos C-1 das unidades que compõem a díade de β -D-galactopiranosose ligada a 3,6-anidro- α -L-galactopiranosose (LAHAYE et al., 1989).

Com os dados espectroscópicos obtidos a partir da galactana dessulfatada, podemos concluir que a galactana homogênea HS apresenta principalmente, unidades A compostas por β -D-galactopiranosose 2-sulfato e 4,6-O-(1'-carboxietilideno)- β -D-galactopiranosose ligadas a unidades de α -galactopiranosose pertencentes tanto a série L- como D-. Esta última característica estrutural determina que *H. floridana* sintetiza uma galactana do tipo DL-híbrida.

Desta forma a galactana HS foi parcialmente caracterizada no presente trabalho, e para a determinação da sua estrutura química fina serão necessários estudos mais aprofundados.

TABELA - 45 SINAIS ANOMÉRICOS (ppm) PRESENTES NOS ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DA FRAÇÃO HS-D.

Díades	Unidade - A	Unidade - B
G $\rightarrow$ D	104,4	95,9
GP $\rightarrow$ D	104,1	95,0
G $\rightarrow$ L	103,3	100,8
G $\rightarrow$ LA	102,1	97,8

4.4- COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS DE ANÁLISES ESTRUTURAIS DAS GALACTANAS HOMOGÊNEAS C1S-3, C2S-3, S2S-3 E HS.

As galactanas C1S-3 e C2S-3 de *C. crenulata*, S2S-3 de *C. seminervis* e HS de *H. floridana*, foram obtidas a partir da extração aquosa, seguido de tratamento com KCl, onde a maior proporção do material submetido a este fracionamento permaneceu solúvel em KCl 2M.

Estas frações, homogêneas por análise de HPSEC-MALLS, apresentam alto teor de sulfato (16,0 - 30,3%), e também acetal de ácido pirúvico, sendo que a galactana C2S-3 apresenta uma proporção menor deste último substituinte (0,5 %) que as galactanas S2S-3 (5,1%) e HS (4,5%), extraídas também a 80°C (Tabela-46).

TABELA-46 ANÁLISE QUÍMICA E COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS GALACTANAS C2S-3, S2S-3 E HS.

Fração	Sulfato ^a (%)	Ác. Pirúvico (%)	proporção ^b	$[\alpha]^{20}_D$
C1S-3	16,0	0,7	1:15	+12,0
C2S-3	28,3	0,5	1:20	+23,5
S2S-3	27,2	5,1	1:06	-8,0
HS	30,3	4,5	-	+12,0

^aExpresso como Na SO₃.

^bUnidades piruvatadas pelo número de díades.

Pode ser observado ainda na Tabela-46, que estas galactana homogêneas apresentam rotações ópticas positiva (C2S-3, C1S-3 e HS) e negativa (S2S-3), com um valor absoluto baixo quando comparados aos valores de rotação óptica específica em torno de +70°, para galactanas do tipo carragenana e -80° para as galactanas do tipo agarana (ESTEVEZ et al. 2001). Estes resultados são

condizentes com estruturas intermediárias entre agarana e carragenana, indicando a presença de unidades B pertencentes tanto a série L- como D-.

Com relação à composição monossacarídica destas frações polissacarídicas (Tabela-47) é possível observar que as galactanas do gênero *Cryptonemia*, estudadas no presente trabalho, (C2S-3 e S2S-3) apresentaram maior porcentagem de unidades anidrogalactosídicas, porém C2S-3 apresentou maior proporção de 3,6-anidro-2-O-metilgalactose que a galactana S2S-3. Unidades de xilose estão presentes apenas nas galactanas do gênero *Cryptonemia*, das quais a fração C1S-3 apresenta 9,0 mol% deste monossacarídeo. É importante ressaltar, que estas unidades de xilose em uma baixa proporção são encontradas amplamente distribuídas nas galactanas de algas vermelhas incluindo as provenientes de algas da ordem Halymeniales.

TABELA-41 COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS GALACTANAS C1S-3, C2S-3, S2S-3 E HS.

Fração	Composição monossacarídica (mol%)						
	Gal ^{a,b}	AG ^c	2AG ^c	2Gal ^b	4Gal ^d	6Gal ^b	Xil
	D - L	D - L	D - L	D - L		D - L	
C1S-3	61,9	8,5	5,4	7,3	-	7,9	9,0
C2S-3	62,5 - 5,9	4,7 - 11,1	- - 8,6	3,2 - 1,3	-	-	2,7
S2S-3	55,6 - 9,7	tr. - 16,7	tr. - 3,5	2,5 - 1,5	3,5	2,0 - tr.	5,0
HS	81,6	7,8	1,2	2,3	-	5,3	-

^a Abreviatura dos monossacarídeos (Gal = galactose; AG = 3,6-anidrogalactose; 2AG = 3,6-anidro-2-O-metilgalactose; 2Gal = 2-O-metilgalactose; 4Gal = 4-O-metilgalactose; 6Gal = 6-O-metilgalactose; Xil = Xilose).

^{b, c} As análises enantioméricas das unidades de galactose e de seus derivados monometilados foram realizados pelo método de CASES et al. (1995), e das unidades anidrogalactosídicas pelo método de ERREA et al.(1998), respectivamente.

^d Determinado por hidrólise ácida total após redução com borodeutereto sódio.

tr. = traços quantidades menores que 1.

Ainda com relação a composição monossacarídica, podemos observar (Tabela-47) que as galactanas (C2S-3, S2S-3 e HS) apresentam baixas proporções de galactose naturalmente metiladas. A galactana S2S-3 apresenta unidades de galactose metiladas em C-2, C-4 e C-6, HS apresenta unidades de galactose metiladas em C-2 e C-6 e a galactana C2S-3 apresenta somente unidades de galactose metiladas em C-2. Estes resultados mostram que há um padrão de metilação característico para cada uma das galactanas, porém não é possível somente com a análise das galactanas destas espécies determinar se estas unidades metiladas podem ser usadas como um caráter taxonômico.

Na Tabela-47 observa-se, através da análise enantiomérica das unidades monossacarídicas constituintes de C2S-3 e S2S-3, que estas galactanas apresentam unidades B pertencentes a série L- e D-, o que as caracteriza como galactanas do tipo DL-híbrida. Embora não tenha sido realizada a análise enantiomérica das unidades monossacarídicas, que compõem as galactanas C1S-3 e HS, a análise de RMN de ^{13}C destas frações possibilitou claramente a observação de díades de carragenana e de díades de agarana. Desta forma estas galactanas C1S-3 e HS também são classificadas como galactanas do tipo DL-híbrida.

As análises espectroscópicas das frações C2S-3, S2S-3 e HS e de seus respectivos polímeros dessulfatados, junto as análises de metilação de C2S-3 e S2S-3, mostraram que estas três galactanas apresentam majoritariamente unidades A sulfatadas em C-2 (91% e 77% para C2S-3 e S2S-3, respectivamente). Já a galactana C1S-3 apresenta suas unidades A principalmente não substituídas, porém unidades de β -D-galactose 2- sulfato também são encontradas. Unidades de 4,6-O-(1'-carboxietilideno)- β -D-galactopiranosose também foram observadas em todas as galactanas, porém em C2S-3 e S2S-3, os resultados de metilação indicaram que estas unidades piruvatadas encontram-se substituídas por sulfato em C-2. Em S2S-3 há um maior grau de substituição por acetal de ácido pirúvico em relação as demais galactanas estudadas no presente trabalho, bem como em relação a outras espécies da ordem Halymeniales relatadas na literatura.

Na galactana HS as unidades de 4,6-O-(1'-carboxietilideno)- β -D-galactopiranosose estão ligadas a unidades de α -D-galactopiranosose. Em S2S-3 pelo menos uma parte destas unidades estão ligadas a unidades de 3,6-anidro- α -L-galactopiranosose, enquanto em C2S-3 estas unidades piruvatadas podem estar ligadas a α -L-galactopiranosose como a 3,6-anidro- α -L-galactopiranosose.

Com relação as unidades B, das galactanas (C1S-3, C2S-3, S2S-3 e HS) é possível observar uma maior heterogeneidade quando comparado as unidades A. Como já foi mencionado as unidades B destas galactanas são pertencentes a série enantiomérica D- como a série L-.

Com relação as unidades de α -galactose, em C2S-3 foi observado a presença de unidades de α -galactose 6-sulfato (7,6 mol% pertencente a série D- e 3,3 mol% pertencente a série L-), α -galactose 2,6-dissulfato (2,4 mol%), 2-O-metil- α -galactose 6-sulfato (2,3 mol%) além de unidades de α -galactose não substituídas (4,5 mol %). A galactana S2S-3 apresentou unidades α -L-galactose 6-sulfato (5,2 mol%), α -galactose 2,6-dissulfato (3,6 mol%), 2-O-metil- α -galactose 6-sulfato (1,2 mol%) além de unidades de α -galactose não substituídas (3,9 mol %).

Estas unidades B são encontradas também na forma ciclizada de 3,6-anidrogallactose nas três galactanas. Em S2S-3 são pertencentes a série enantiomérica L-, e em C2S-3 são pertencentes tanto a série L- (majoritariamente), como da série D- (4,7 mol%). Estas galactanas C2S-3, S2S-3 HS mostram a presença de unidades de 3,6-anidro-galactose naturalmente metilada em C-2 em diferentes proporções (Tabela-41). As galactanas C2S-3 e S2S-3 apresentam ainda, unidades de 3,6-anidro-galactose substituídas por sulfato em C-2, numa proporção de aproximadamente 20 e 13% das suas unidades anidrogallactosídicas, respectivamente. A presença de unidades de 3,6-anidro- α -L-galactose 2-sulfato, tanto na galactana C2S-3 como em S2S-3, foram comprovadas pelas análises espectroscópicas e de metilação inclusive das respectivas frações parcialmente despolimerizadas. Destaca-se que até o presente não há relatos da presença de uma quantidade apreciável de 3,6-anidro-

α -L-galactose 2-sulfato em galactanas naturais. MILLER e BLUNT (2000b) identificaram este derivado apenas após modificação alcalina e análise por RMN de ^{13}C .

Embora cada galactana (C2S-3, S2S-3 e HS) apresente padrões estruturais próprios, características comuns de grande relevância podem ser destacadas, como:

- (1) a galactana majoritária biossintetizada pelas três espécies estudadas no presente trabalho são do tipo DL-híbrida,
- (2) as unidades A destas galactanas são constituídas por alta porcentagem de unidades de β -galactopiranosose 2-sulfato,
- (3) estas galactanas DL-híbridas apresentam unidades A na forma de 4,6-O-(1'-carboxietilideno)- β -D-galactopiranosose em diferentes proporções,
- (4) as unidades B embora sejam comparativamente mais heterogêneas, há a presença de unidades de 3,6-anidrogalactose (e/ou seus derivados metilados ou sulfatados), bem como de suas unidades precursoras,
- (5) galactose naturalmente metilada em diferentes posições está presente em baixas proporções.

Estas características citadas acima são também observadas em algumas galactanas extraídas de algas da ordem Halymeniales como pode ser observada na Tabela-2. Destaca-se, porém que muitos estudos de caracterização química destas galactanas biossintetizadas por algas pertencentes a ordem Halymeniales foram muitas vezes realizados apenas por análise do espectro de FT-IR da fração polissacarídica bruta.

Desta forma os resultados da caracterização da estrutura química fina das galactanas (principalmente C2S-3 e S2S-3), proporcionam maior credibilidade para delinear um padrão estrutural para as galactanas biossintetizadas por algas da ordem Halymeniales.

5-CONCLUSÃO

5.0- CONCLUSÕES

1- As análises químicas e espectroscópicas demonstraram que as galactanas C1S-3, C2S-3, S2S-3 e HS são do tipo DL-híbrida; ou seja apresentam unidades B pertencentes tanto a série D- quanto L-.

2- Estas galactanas sulfatadas são piruvatadas (em diferentes proporções) e apresentam ainda em comum sulfatação em C-2 das unidades de β -D-galactose.

3- Na galactana C2S-3 unidades anidrogalactosídicas bem como as suas unidades precursoras são pertencentes tanto a série D- quanto L-, enquanto que na galactana S2S-3 são pertencentes a série L-.

4- O estudo da cinética da reação de ciclização alcalina, juntamente com a análise enantiomérica demonstraram que na galactana C2S-3 as unidades precursoras de 3,6-anidrogalactose estão ligadas tanto a β -galactose 2-sulfato quanto a β -galactose. Já os resultados obtidos para a galactana S2S-3 demonstraram que unidades precursoras de 3,6-anidrogalactose estão ligadas a β -galactose. Estes resultados permitiram a identificação de uma díade incomum (G2S-D6S) na galactana C2S-3.

5- Nas galactanas C2S-3 e S2S-3 foram encontradas quantidades apreciáveis de unidades incomuns de 3,6-anidro- α -L-galactose 2-sulfato.

6- As galactanas de *C. crenulata* apresentaram atividade antiherpética contra diferentes cepas de HSV, *in vitro* e/ou *in vivo*. Esta atividade foi correlacionada com a presença das díades G2S-D6S e G2S-L6S.

7- A despolimerização parcial de galactanas sulfatadas do tipo DL-híbrida por hidrólise redutiva parcial mantém o caráter DL-híbrido da molécula. Adicionalmente o espectro de RMN de ^{13}C apresenta sinais referentes a unidades

não observadas no espectro do polímero de origem, confirmando assim os resultados de metilação e/ou de análise enantioméricas da galactana original.

8- A análise comparativa das galactanas estudadas no presente trabalho apresentam características comuns de grande relevância, como: a galactana majoritária biossintetizada pelas três espécies são do tipo DL-híbrida, as unidades A destas galactanas são constituídas por uma alta porcentagem de unidades de β -galactopiranosose 2-sulfato, unidades A na forma de 4,6-O-(1'-carboxietilideno)- β -D-galactopiranosose em diferentes proporções também são observadas nessas galactanas, as unidades B embora sejam comparativamente mais heterogêneas, há a presença de unidades de 3,6-anidrogactose (e/ou seus derivados metilados ou sulfatados), bem como de suas unidades precursoras. Unidades de galactose naturalmente metilada em diferentes posições está presente em baixas proporções. Estes resultados aliados aos encontrados na literatura podem ser utilizados para delinear um padrão estrutural genérico para as galactanas biossintetizadas por algas da ordem Halymeniales.

6-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6.0- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLSOBROOK, A.J.R.; NUNN, J.R.; PAROLIS, H. Sulphated polysaccharides of the Grateloupiaceae family. Part V. A polysaccharide from *Aeodes ulvoidea*. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 16, p. 71-78, 1971.

ALLSOBROOK, A.J.R.; NUNN, J.R.; PAROLIS, H. The linkage of 4-O-methyl-L-galactose in the sulphated polysaccharide of *Aeodes ulvoidea*. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 36, p. 139-145, 1974.

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

ARAKI, C.; HIRASE, S. Studies on the chemical constitution of agar-agar. XXI. Re-investigation of methylated agarose of *Gelidium amansii*. **Bull. Chem. Soc. Jap.**, [S.I.], v. 33, p. 291-295, 1960.

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

BAEZA, P.; MATSUHIRO, B. Polysaccharides from Chilean seaweeds. IV. A sulphated galactan from *Grateloupia lanceola*. **Bot. Mar.**, Berlin, v. 20, p. 355-357, 1977.

BARBAKADZE, V.V.; USOV, A.I. Polysaccharides of algae. XXVI. Methylation and periodate oxidation of polysaccharide from the red seaweed *Grateloupia divaricata* Okam. **Bioorgan. Khim.**, v. 4, p. 1100-1106, 1978.

BOWKER, D.M.; TURVEY, J.R. Water-soluble polysaccharides of the red alga *Laurencia pinnatifida*. Part I. Constituent units. **J. Chem. Soc. C.**, p. 983-988, 1968.

CANDEIAS, J.A.N. **Laboratório de Virologia**, Edusp, p. 452-46, 1996.

CÁRCERES, P.J.; CARLUCCI, M.J.; DAMONTE, E.B.; MATSUHIRO, B.; ZÚÑIGA, E.A. Carrageenans from Chilean samples of *Stenogramme interrupta* (Phyllophoraceae): structural analysis and biological activity. **Phytochemistry**, v. 53, p. 81-86, 2000.

CARLUCCI, M.J.; PUJOL, C.A.; CIANCIA, M.; NOSEDA, M.D.; MATULEWICZ, M.C.; DAMONTE, E.B.; CERREZO, 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.; CERREZO, 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 simplex 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.

CARPITA, N.C.; SHEA, E.M. Linkage structure of carbohydrates by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) of partially methylated alditol acetates. **In C. J. Biermann, and G. D. McGinnis (ed.), Analysis of carbohydrates by gas-liquid chromatography and mass spectrometry.** CRC Press, Boca Raton, p. 157-216, 1989.

CASES, M.R.; CERESO, A.S.; STORTZ, C.A. Separation and quantitation of enantiomeric galactoses and their mono-O-methylethers as their diastereomeric acetylated 1-deoxy-1-(2-hydroxy-propylamino) alditols. **Carbohydr. Res.**, v. 269, p. 333-341, 1995.

CERESO, A.S. The carrageenan system of *Gigartina skottsbergii* S. et G. Part I. Studies on a fraction of kappa-carrageenan. **J. Chem. Soc.**, (C), p. 992-997, 1967.

CHIOVITTI, A.; LIAO, -L.M.; KRAFT, G.T.; MUNRO, S.L.A.; CRAIK, D.J.; 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. 39, 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; FALSHAW, R.; FURNEAUX, R.H. A pyruvated carrageenan from Australian specimens of the red algae *Sarconema filiforme*. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 310, p. 77-83, 1998.

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 *Clavicornium 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.

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. **Estudio de los carragenanos de plantas cistocarpicas del alga roja *Gigartina skottsbergii***. Tesis de doutorado. Departamento de Química Orgánica, Universidad de Buenos Aires, 307 p., 1994.

CIUCANU, I.; KEREK, F. A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 131, p. 209-217, 1984.

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.; PUJOL, C.A.; NOSEDA, M.D.; CIANCIA, M.; MATULEWICZ, M.C.; CEREZO, A.S. Potent and selective inhibition of dengue virus by carrageenans. **15th International Conference on Antiviral Research**, Praga-República Checa, p. 17-21, 2002.

DE PAULA, E.J.; PEREIRA, R.T.L.; OHNO, M. Growth rate of the carrageenophyte *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Gigartinales) introduced in subtropical waters of São Paulo State, Brazil. **Phycolog. Res.**, v. 50(1), p. 1-10, 2002.

DE RUITER, G.A.; RUDOLPH, B. Carrageenan biotechnology. **Trends in Food Science & Technology**, 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. Determinaton 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.; SANTOS, G.A. Carrageenans from tetrasporic and cystocarpic *Eucheuma* species. **Aquat. Bot.**; v. 4, p. 143-149, 1978.

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 mantagnei* on herpes simplex virus replication in vitro. **Phytomedecine**, 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.

DUCKWORTH, M.; YAPHE, W. The structure of agar. Part I. Fractionation of a complex mixture of polysaccharides. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 16, p. 189-197, 1971.

ERREA, M.; CIANCIA, M.; MATULEWICZ, M.; CEREZO, A. Separation and quantitation of enantiomeric 3,6-anhydrogalactoses by conversion to the corresponding diastereomeric acetylated sec-butyl 3,6-anhydrogalactonates. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 311, p. 235-238, 1998.

ESTEVEZ, J.M.; CIANCIA, M.; CEREZO, A.S. The system of low-molecular-weight carrageenans and agaroids from the room-temperature-extracted fractions 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.

FALSHAW, R.; FURNEAUX, R.H.; MILLER, I.J. The backbone structure of the sulfated galactan from *Plocamium costatum* (C. Agardh) Hook. F. Harv. (Plocamiaceae, Rhodophyta). **Bot. Mar.**, Berlin, v. 42, p. 431-436, 1999.

FALSHAW, R.; BIXLER, H.J.; JOHNDRO, K. Structure and performance of commercial κ -carrageenan extracts. Part III. Structure analysis and performance in two dairy applications of extracts from New Zealand red seaweed, *Gigartina arthropurpurea*. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 17, p. 129-139, 2003a.

FALSHAW, R.; FURNEAUX, R.H.; WONG, H. Analysis of pyruvylated β -carrageenan by 2D NMR spectroscopy and reductive partial hydrolysis. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 338, p. 1403-1414, 2003b.

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.

FARRANT, A.J.; NUNN, J.R., PAROLIS, H. Sulphated polysaccharide of the Grateloupiaceae family. Part VI. A polysaccharide from *Pachymenia carnos*. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 19, p. 161-168, 1971.

FARRANT, A.J.; NUNN, J.R. and PAROLIS, H. Sulphated polysaccharide of the Grateloupiaceae family. PartVII. Investigation of the acetolysis products of a partially desulphated sample of the polysaccharide of *Pachymenia carnos*. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 25, p. 283-292, 1972.

FERNÁNDEZ, L.E.; VALIENTE, O.G.; GARCIA, R.; CASTRO, H.V.; MACHYTKA, D.; ZSOLDOS-MADY, V.; NESZMELYI, A. ^1H - and ^{13}C -n.m.r. study of an agar polysaccharide from *Bryothamnion triquetrum*. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 163, p. 143-147, 1987.

FERNÁNDEZ, L.E.; VALIENTE, O.G.; MAINARDI, V.; BELLO, J.L. Isolation and characterization of an antitumor active agar-type polysaccharide of *Gracilaria domingensis*. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 190, p. 77-83, 1989.

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.

GAREGG, P.J.; LINDBERG, B.; KVARNSTROM, I. Preparation and N.M.R. studies of pyruvic acid and related acetals of pyranosides: configuration at the acetal carbon atoms. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 77, p. 71-78, 1979.

GONÇALVES, A.G. Oligossacarídeos piruvatados e sulfatados obtidos a partir de galactanas de algas vermelhas (Rhodophyta). **Tese de mestrado** Departamento de Bioquímica da UFPR, 100 pp., 2001.

GONÇALVES, A.G.; DUCATTI, D.R.B.; DUARTE, M.R.E.; NOSEDA, M.D., Sulfated and pyruvylated disaccharide alditols obtained from a red seaweed galactan: ESIMS and NMR approaches. **Carbohydr. Res.**, v. 337, p. 2443-2453, 2002.

GORIN, P.A.J.; ISHIKAWA, T. Configuration of pyruvic acid ketal, 4,6-O-linked to D-galactose units, in bacterial and algal polysaccharides. **Can. J. Chem.**, v. 45, p. 521-532, 1967.

GORIN, P.A.J.; MAZUREK, M.; DUARTE, H. S.; IACOMINI, M.; DUARTE, J.H. Properties of ¹³C-N.M.R. spectra of O-(1'-carboxyethylidene) derivatives of methyl β-D-galactopyranoside: models for determination of pyruvic acid acetal structures in polysaccharides. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 100, p. 1-15, 1982.

HEROLD, B. C.; GERBER, S. I.; POLONSKI, T.; BELVAL, B.J.; SHAKLEE, P. N.; HOME, K. Identification of structural features of heparin required for inhibition of herpes simplex virus type 1 binding. **Virology**, v. 206, p. 1108-1116, 1995.

HIRASE, S. Studies on the chemical constitution of agar-agar. 19. Pyruvic acid as a constituent of agar-agar. (1). Identification and estimation of pyruvic acid in the hydrolysate of agar. **Bull. Chem. Soc. Jpn.**, Tokyo, v. 30, p. 68-79, 1957.

HIRASE, S.; ARAKI, C.; WATANABE, K. Component sugars of the polysaccharide of the red seaweed *Grateloupia elliptica*. **Bull. Chem. Soc. Jpn.**, Tokyo, v. 40, p. 1445-1448, 1967.

HIRASE, S.; WATANABE, K. The presence of pyruvate residues in λ -carrageenan and a similar polysaccharide. **Bull. Inst. Chem. Res., Kyoto Univ.**, v. 50, p. 332-336, 1972.

IZUMI, K. Chemical heterogeneity of the agar from *Gelidium amansii*. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 17, p. 227-230, 1971.

JANSSON, P.E.; KENNE, L.; LIEDRGREN, H.; LINDEBERG, B.; LÖNNGREN, J. A practical guide to the methylation analysis of carbohydrates. **Chem. Commun.**, London, v. 8, p. 1-71, 1976.

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.

KOEPSSELL, H.J.; SHARPE, E.S. Microdetermination of pyruvic and α -ketoglutaric acids. **Arch. Biochem. Biophys.**, Orlando, v. 38, p. 443-449, 1952.

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.

KRAFT, G.T.; ROBINS, P.A. Is the order Cryptonemiales (Rhodophyta) defensible? **Phycol.**, v. 24, p. 67-77, 1985.

KYLIN, H. Die Gattungen der Rhodophyceen. **Gleerups**, Lund, p. 669, 1956.

LAHAYE, M.; YAPHE, W.; VIET, M.T.P.; ROCHAS, C. ^{13}C -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. **Hydrobiol.**, Bucharest, 221, 137-148, 1991.

LAI, M.-F.; LI, C.-F.; LI, C.-Y. Characterization and thermal behavior of six sulphated polysaccharides from seaweeds. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 8, p. 215-232, 1994.

LAWSON, C.J.; REES, D.A. An Enzyme for the metabolic control of polysaccharide conformation and function. **Nature**, v. 227, p. 392-393, 1970.

LEE, R.E. **Phycology**, Second edition. Cambridge University Press, Cambridge. 645 pp, 1989.

LEMUS, A.; BIRD, K.; KAPRAUN, D.F.; KOEHN, F. Agar yield, quality and standing crop biomass of *Gelidium serrulatum*, *Gelidium floridanum* and *Pterocladia capillacea*, in Venezuela. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 5, p. 469-479, 1991.

LENZ, R.W. Distribution of methoxyl groups in the methylation of the monosodio derivatives of methyl α -D-glucopyranoside and cellulose. **J. Chem. Soc.**, v. 82, p. 182-186, 1960.

LOBBAN, C.S.; HARRISON, P.J. **Seaweed ecology and physiology**. First edition. Cambridge University Press, Cambridge. 366 pp, 1994.

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.

McCANDLESS, E.L.; CRAIGIE, J.S. Sulfated polysaccharides in red and brown algae. **Annu. Ver. Plant Physiol.**, **30**: 41-53, 1979.

McCANDLESS, E.L.; WEST, J.A.; GUIRY, M.D. Carrageenan patterns in Phyllophoraceae. **Biochem. Syst. Ecol.**, Oxon, v. 10, p. 275-284, 1982.

MILLER, I.J.; FALSHAW, R.; FURNEAUX, R.H. The chemical structure of polysaccharides from New Zealand members of the Rhodomelaceae. **Bot. Mar.**, Berlin, v. 36, p. 153-208, 1993.

MILLER, I.J.; FALSHAW, R.; FURNEAUX, R.H. Structural analysis of the polysaccharides from *Pachymenia lusoria* (Cryptonemiaceae, Rhodophyta). **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 268, p. 219-232, 1995.

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.; FALSHAW, R.; FURNEAUX, R.H.; HEMMINGSON, J. A variation constituent sugars of the polysaccharides from New Zealand species of *Pachymenia* (Halymeniaceae). **Bot. Mar.**, Berlin, v. 40, p. 119-127, 1997.

MILLER, I.J. The structure of pyruvylated carrageenan extracted from *Stenogramme interrupta* as determined by ^{13}C NMR spectroscopy. **Bot. Mar.**, Berlin, v. 41, p. 305-315, 1998.

MILLER, I. J.; BLUNT, J. W. New ^{13}C NMR methods for determining the structure of algal polysaccharides. Part 2. Galactans consisting of mixed diads. **Bot. Mar.**, Berlin, v. 43, p. 251-261, 2000a.

MILLER, I. J.; BLUNT, J. W. New ^{13}C NMR methods for determining the structure of algal polysaccharides. Part 3. The structure of the polysaccharide from *Cladhymania oblongifolia*. **Bot. Mar.**, Berlin, v. 43, p. 263-271, 2000b.

MILLER, I.J. Evaluation of the structures of polysaccharides from two New Zealand members of the Rhodomelaceae by ^{13}C NMR spectroscopy. **Bot. Mar.**, Berlin, v. 46, p. 386-391, 2003.

MURANO, E.; TOFFANIN, R.; ZANETTI, F.; KNUTSEN, S.H.; PAOLETTI, S.; RIZZO, R. Chemical and macromolecular characterisation of agar polymers from *Gracilaria dura* (C. Agardh) J. Agardh (Gracilariaceae, Rhodophyta). **Carbohydr. Polym.**, v. 18, p. 171-178, 1992.

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.

NELSON, W.A.; KNIGHT, G.A.; FALSHAW, R.; FURNEAUX, R.H.; FALSHAW, A.; LYNDSEY, S.M. Characterisation of the enigmatic, endemic red alga *Gelidium allanii* (Gelidiales) from northern New Zealand-morphology, distribution, agar chemistry. **J. Appl. Phycol.**, v. 6, p. 497-507, 1994.

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.; CERREZO, 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.

NOSEDA, M.D.; VIANA, A.G.; DUARTE, M.E.R.; CERREZO, A.S. Alkali modification of carrageenans. Part IV. Porphyrans as model compounds. **Carbohydr. Polym.**, Essex, v. 42, p. 301-305, 2000.

NUNN, J.R.; PAROLIS, H. A polysaccharide from *Aeodes orbitosa*. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 8, p.1-11, 1968.

NUNN, J.R.; PAROLIS, H. Sulphated polysaccharides of the Grateloupiaceae family. Methylation analysis of Phyllymenan and desulphated Phyllymenan. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 14, p. 145-150, 1970.

PAINTER, T.J. Algal Polysaccharides. In: ASPINALL, G. **The polysaccharides**, v. 2, p. 195-285, 1983.

PAREKH, R. G.; DOSHI, Y. A.; RAO, A. V.; CHAUHAN, V. D. Studies on a phycocolloid from red alga *Halymenia venusta* Boergesen. **Indian J. Mar. Sci.**, v. 16, p. 274-276, 1987.

PAREKH, R. G.; DOSHI, Y. A.; CHAUHAN, V. D. Polysaccharides from marine red algae *Acanthophora spicifera*, *Grateluopia indica* and *Halymenia porphyroides*. **Indian J. Mar. Sci.**, v. 18, p. 139-140, 1989.

PARK, Y.H; PYEUN, H.K.; KANG, Y.J. Utilization of unexploited algae for food or other industrial uses. Part 2. Carrageenan content and its chemical characteristics in several species of Rhodophyceae. **Bull. Korean Fish. Soc.**, v. 9(3), p. 163-168, 1976.

PAROLIS, H. The structure of polysaccharide of *Pachymenia carnosa*. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 62, p. 313-320, 1978.

PAROLIS, H. The polysaccharides of *Phyllymenia hieroglyphica* (*P. belangeri*) and *Pachymenia hymantophora*. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 93, p. 261-267, 1981.

PENMAN, A.; REES, D.A. Carrageenans. Part IX. Methylation analysis of galactan sulphates from *Furcellaria fastigata*, *Gigartina caniculata*, *G. chamissoi*, *Pachymenia hymantophora*, 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.

PUJOL, C.A.; ERREA, M.I.; MATULEWICZ, M.C.; DAMONTE, E.B. Antiherpetic activity of S1, an algal derived sulfated galactan. **Phytotherapy Research**, v. 10, p. 410-413, 1996.

SAITO, R.M.; OLIVEIRA, E.C. Chemical screening of Brazilian marine algae producing carrageenans, **Hydrobiol.**, Bucharest, v. 204/205, p. 585-588, 1990.

SANTELICES, B. Old and new problems in the taxonomy of the Gelidiales (Rhodophyta). **Hydrobiol.**, Bucharest, v. 204/205, p. 125-135, 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.

SEN, S.A.K.; DAS, A.K.; BANERJI, N.; SIDDHANTA, K.H.; MODY, B.K.; RAMAVAT, V.D.; CHAUHAN, J.R.; VEDASIROMONI, J.R.; GANGULY, D.K. A new sulfated polysaccharide with potent anti-coagulant activity from the red seaweed *Grateloupia indica*. **Int. J. Biol. Macromol.**; v. 16, p. 279-280, 1994.

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.

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.

SLONEKER, J.H. Gas-liquid chromatography of alditol acetates. **Methods Carbohydr. Chem.**, San Diego, v. 6, p. 20-24, 1972.

STANCIOFF; D.J.; STANLEY, N.F. Infrared and chemical studies on algal polysaccharides. **Proc. Int. Seaweed Symp.**, 6, p. 595-609, 1969.

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.; 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. Polym.**, Essex, v. 34 (1-2), 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.

SUGIHARA, M.J. Relative reactivities of hydroxyl groups in carbohydrates. **Adv. Carbohydr. Chem.**, v. 8, p. 1-44, 1953.

TAKANO, R.; NOSE, Y.; HAYASHI, K.; HARA, S.; HIRASE, S. Agarose-carrageenan hybrid polysaccharide from *Lomentaria catenata*. **Phytochemistry**, v. 37, p. 1615-1619, 1994.

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. Desulfation of Sulfated Carbohydrates. **Trends in Glycoscience and Glycotechnology**, v.14 (80), p. 343–351, 2002.

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.**, 2004.

TURVEY, J.R.; WILLIAMS, E.L. The agar-type polysaccharide from the red alga *Ceramium rubrum*. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 49, p. 419-425, 1976.

USOV, A.I.; MIROSHNIKOVA, L. I.; BARBAKADZE, V.V. Polysaccharides of algae. XVII. Water-soluble polysaccharide of the red algae *Grateloupia divaricata* Okamura and *Grateloupia turuturu* Yamada. **Zhurnal Obshchei Khim.**, v. 45, p. 1618-1624, 1975.

USOV, A.I.; BARBAKADZE, V.V. Polysaccharides of algae. XXVII. Partial acetolysis of the sulphated galactan from the red seaweed *Grateloupia divaricata*. **Bioorgan. Khim.**, v. 4, p. 1107-1115, 1978.

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. NMR spectroscopy of red seaweed polysaccharides: agars, carrageenans and xylans. **Bot. Mar.**, Berlin, v. 27, p. 189-202, 1984.

USOV, A.I.; IVANOVA, E.G.; ELASHVILI, M.Y. Polysaccharides of the algae 41. Characterization of water-soluble polysaccharides from several representatives of the genus *Laurencia* (Ceramiales, Rhodophyta). **Bioorg. Khim.**, v. 15, p. 1259-1267, 1989.

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. Sulfated polysaccharides of the red seaweeds. **Food Hydrocolloids**, 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 (Northwestern 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 sulfated xylogalactan from the calcereous red alga *Corallina pilulifera* P. et R. (Rhodophyta, Corallinaceae). **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 210, p. 277-298, 1997.

USOV, A. I. Structural analysis of red seaweed galactans of agar and carrageenan groups. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 12, p. 301-308, 1998.

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

VAN DEN HOEK, C.; MANN, D.G.; JAHNS, H.M. **ALGAE, An introduction to phycology**, First edition. Cambridge University Press, Cambridge. 627 pp, 1989.

VIANA, A.G.; NOSEDA, M.D.; DUARTE, M.E.R.; CEREZO, A.S. Alkali modification of carrageenanas. 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.

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.

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.

WHYTE, J.N.C.; HOSFORD, S.P.C.; ENGLAR, J.R. Assignment of agar and carrageenan structures to red algal polysaccharides. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 140, p. 336-341, 1985.

WONG, K.F.; CRAIGIE, J.C. Sulfohydrolase activity and carrageenan biosynthesis in *Chondrus crispus* (Rhodophyceae). **Plant. Physiol.**, v. 61, p. 663-666, 1978.

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.

YAPHE, W. Colorimetric determination of 3,6-anhydrogalactose and galactose in marine algae polysaccharides. **Anal. Chem.**, v. 32, p. 1327-1330, 1960.

ZABACKIS, E.; SANTOS, G.A. The carrageenan of *Catenella nipae* Zanard., A marine red alga. **Bot. Mar.**, Berlin, v. 29, p. 319-322, 1986.

ZABACKIS, E.; PEREZ, J. A partially pyruvated carrageenan from Hawaiian *Grateloupia filicina*. **Bot. Mar.**, Berlin, v. 33, p. 273-276, 1990.

ZIBETTI, R.G.M. Determinação da estrutura química de galactanas híbridas-D/L isoladas da alga vermelha *Cryptonemia crenulata* (Cryptonemiales, Rhodophyta). **Tese de mestrado** Departamento de Bioquímica da UFPR, 68 pp., 2001.

ZIBETTI, R.G.M.; NOSEDA, M.D.; CEREZO, A.S.; DUARTE, M.E.R. The system of galactans from *Cryptonemia crenulata* (Halymeniaceae, Halymeniales) and structure of two major fractions. Kinetic studies on the alkaline cyclization of the unusual diad G2S → D(L)6S. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, *in press*, 2005.

ZINOUN, M.; DIOURIS, M.; POTIN, P.; FLOCH, J.Y.; DESLANDES, E. Evidence of sulfohydrolase activity in the red alga *Calliblepharis jubata*. **Bot. Mar.**, Berlin, v. 40, p. 49-53, 1997.

7-ANEXO

The system of galactans from *Cryptonemia crenulata* (Halymeniaceae, Halymeniales) and the structure of two major fractions. Kinetic studies on the alkaline cyclization of the unusual diad G2S→D(L)6S

Rosiane G. M. Zibetti,^a Miguel D. Nosedá,^a Alberto S. Cerezo^b and Maria E. R. Duarte^{a,*}

^aDepartamento de Bioquímica e Biologia, Molecular, Universidade Federal do Paraná, PO Box 19046,
CEP: 81531-990 Curitiba-Paraná, Brazil

^bDepartamento de Química Orgánica, CIHIDECAR-CONICET, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales,
Universidad de Buenos Aires, Ciudad Universitaria, Pabellón 2, (1428) Buenos Aires, Argentina

Received 26 August 2004; accepted 12 January 2005

Abstract—*Cryptonemia crenulata* biosynthesizes a family of DL-hybrid galactans that are based on the classical 3-linked β-D-galactopyranosyl→4-linked α-galactopyranosyl alternating sequence (A-units→B-units). The dispersion of structures in these galactans is based on four factors, namely: (a) the amount and position of substituent groups as sulfate (major), pyruvic acid ketals, methoxyl and side substituents of β-D-xylose and/or β-D-galactose; (b) the ratio galactose/3,6-anhydrogalactose in the B-units; (c) the ratio D-/L-galactoses and 3,6-anhydrogalactoses also in the B-units and (d) the sequence of the diads in the linear backbone. Alkali treatment carried out on the major fraction produced a nearly quantitative formation of 3,6-anhydrogalactose units from precursor units (α-galactose 6-sulfate (major) and α-galactose 2,6-sulfate, minor). Kinetic studies show a rate constant, for the diad G2S-D(L) 6-S, of $1.7 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$ indicating a reaction faster than in λ-carrageenans but slower than in porphyrans.

© 2005 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Sulfated galactans; Chemical structure; Methylation analysis; NMR spectroscopy; Kinetic studies; Seaweed; *Cryptonemia crenulata*; Halymeniales

1. Introduction

Most of the polysaccharides in red seaweeds are sulfated galactans. Their backbone is composed of alternating 3-linked β-D-galactopyranosyl residues (A-units) and 4-linked α-galactopyranosyl (or 3,6-anhydrogalactopyranosyl) residues (B-units). This backbone is further modified by different substitutions. ‘Ideal’ carrageenans are substituted only with sulfate groups, while agarans carry sulfate, pyruvic acid acetals and methyl and glycosyl groups. The B residues are from the D-series in carrageenans or belong to the L-series in agarans.¹ Intermediate structures due to the interchange of substituent

groups or to the presence of D- and L-galactose residues in the B-units [DL-hybrids]² or both have been found in members of different genera of the order Halymeniales as *Grateloupia*^{3–11}, *Halymenia*^{8,12,13}, *Pachymenia*,^{14–19} *Phyllymenia*^{14,15,20} and *Aeodes*.^{21–23} Algae from the Halymeniales biosynthesize complex sulfated galactans. Most of them carry sulfate at C-2 of the β-D-galactose unit and then would formally belong to the carrageenan λ-family. They differ from the λ-carrageenans (repeating disaccharide constituted by 3-linked β-D-galactopyranosyl 2-sulfate and 4-linked α-D-galactopyranosyl 2,6-sulfate) in having variable amounts of 3,6-anhydrogalactose and from the carrageenan group in having significant amounts of L-galactose, 3,6-anhydro-2-O-methylgalactose and glycosyl lateral substituents. The presence of carrageenan and agaran components is consistent with its classification as DL-hybrid galactans.

* Corresponding author. Tel.: +55 41 361 1663; fax: +55 41 266 2042;
e-mail: nosedaeu@ufpr.br

Cryptonemia crenulata (Halymeniaceae, Halymeniales) has been referred to as producing ι-carrageenans.²⁴ Nevertheless, preliminary results of later research suggest highly complex polysaccharides.²⁵ The compositions and the in vitro and in vivo antiherpetic properties of crude extracts and main fractions obtained from them by ion-exchange chromatography were determined.²⁶ We report now an analytical study of the system of galactans biosynthesized by the seaweed, the structural elucidation and DL-hybrid character of two major fractions, and the kinetic analysis of the alkaline modification of one of them.

2. Results

The milled seaweed was extracted with water at room temperature giving C1 (4.0% w/w of the dry and milled seaweed). Sequentially the algal residue was extracted twice with phosphate buffer (pH 6.5) at 80 °C yielding C2 (6.8% w/w) and C3 (1.1% w/w) as previously reported.²⁶ The three fractions contained galactose as the major sugar (65.0–70.7 mol %), together with small

amounts of 3,6-anhydrogalactose (7.3–10.8 mol %) and its 2-*O*-methyl derivative (5.9–8.3 mol %), 2-*O*-methylgalactose (5.9–8.9 mol %) and pyruvic acid (2.9–7.2% w/w). Small-to-trace quantities of 4-*O*- and 6-*O*-methylgalactose were also found. Glucose was detected in similar amounts (5.8–7.5 mol %) in the cold and hot extracts (Table 1). The major counter ion in C1 and C3 was sodium, but in C2 calcium and magnesium predominate (Table 2).

Fractions C1 and C2 were purified by precipitation with 2 M KCl, in which 94% of C1 and 97% of C2 remained soluble (C1S and C2S, respectively),²⁶ (fraction C3 was discarded due to the low yield). Yields, analysis and rotations as well as the monosaccharide and enantiomeric compositions are reported in Table 1. The compositional schemes of C1S and C2S are similar to those of the raw extracts with substantial amounts of pyruvic acetal groups and xylose, and the enantiomeric determinations showed both D-(major) and L-(minor) forms for the galactose, 3,6-anhydrogalactose and 2-*O*-methylgalactose.

C1S and C2S were fractionated on a DEAE-Sephacel column to give subfractions C1S-1–C1S-3 and C2S-1–

Table 1. Yield, analyses, optical rotation and monosaccharide composition of the galactans obtained from *Cryptonemia crenulata*

Fraction	Yield (%)	SO ₃ Na (%)	Pyruvic acid (%)	[α] _D	Monosaccharide units ^a (molar ratio)								
					G+D:L ^{b,c}	DA:LA ^c	LA2M	D2M:L2M ^c	G4M ^{c,d}	G6M ^c	XyF	Glc ^c	SO ₃ Na
C1 ^c	4.0	22.0	6.3	+49.3	1	0.12	0.09	0.12	0.02	—	—	0.08	1.10
C2 ^c	6.8	28.0	2.9	+40.5	1	0.16	0.12	0.08	0.02	0.02	—	0.11	1.12
C3 ^c	1.1	42.0	1.4	+32.0	1	0.19	0.13	0.07:0.02	—	0.04	—	0.11	2.07
C1S ^f	94.0	26.0	7.9	+25.5	1:0.17	0.18:0.04	0.14	0.10:0.02	0.03	0.02	0.17	0.05	1.19
C1S-1 ^g	9.6	22.3	n.d.	+14.0	1	0.21	0.04	0.08	—	0.02	0.16	—	0.89
C1S-2 ^g	18.0	26.5	2.2	+12.0	1	0.02	—	0.07	0.04	—	0.05	—	0.71
C1S-3 ^g	56.0	16.0	0.7	+12.0	1	0.15	0.09	0.11	—	0.12	0.18	—	0.64
C1S-3D ^h	48.0	2.1	n.d.	n.d.	1	0.05	0.03	0.13	—	0.03	0.02	—	0.06
C2S ^f	97.5	27.7	3.7	+27.0	1:0.17	0.04:0.14	0.11	0.07:0.02	0.02	—	0.06	—	1.12
C2S-1 ⁱ	3.2	20.1	n.d.	+11.0	1	0.12:0.01	0.10	0.10	—	0.01	0.05	—	1.16
C2S-2 ⁱ	24.0	25.1	1.9	+6.5	1	0.06:0.04	0.10	0.08	—	—	0.14	0.02	0.80
C2S-3 ⁱ	54.2	28.3	0.5	+23.5	1:0.09	0.09:0.20	0.14	0.05:0.02	—	—	0.05	—	1.17
C2S-4 ⁱ	3.3	17.5	n.d.	+4.0	1	0.09:0.06	0.13	0.03	—	0.06	—	—	0.54
C2S-3D ^h	96.0	7.1	n.d.	n.d.	1	0.19	0.09	0.05	—	—	0.03	—	0.21
C2S-3T ^j	60.0	n.d.	n.d.	n.d.	1:0.02	0.29:0.25	0.17	0.05	—	—	0.06	—	n.d.
CC ^k	5.0	25.3	n.d.	n.d.	1	0.27	0.28	0.06	—	—	—	—	0.93
C2S-2b ^l	13.5	17.3	n.d.	n.d.	1	0.03	—	0.07	—	—	—	0.28	0.62
C2S-2c ^l	25.0	14.0	4.5	n.d.	1	0.14	0.15	0.09	—	—	—	0.03	0.60
C2S-2d ^l	55.0	20.4	0.4	n.d.	1:0.11	0.01	0.09	0.05:0.03	—	—	—	0.03	0.84

(—) = not detected, n.d. = not determined.

^a Knutsen's nomenclature.²⁹

^b G+D = β-D- plus α-D-galactose and L = α-L-galactose.

^c Only one number when the enantiomeric analyses were not carried out.

^d The GC-MS analyses showed after acid hydrolysis, reduction with NaBD₄ and acetylation *m/z* 129, 158, 189 and 218 corresponding to 4-*O*-methylgalactosyl residues.

^e Crude extracts.

^f Soluble fractions in 2 M KCl.

^g Subfractions of C1S and C2S, respectively.

^h Partially de-ulfated fractions from C1S-3 and C2S-3.

ⁱ Subfractions of C1S and C2S, respectively.

^j Alkali-treated fraction from C2S-3.

^k Partially depolymerized fraction from C2S-3.

^l Subfractions of C2S-2.

Table 2. Cation composition of the raw extracts from *Cryptonemia crenulata*

Fraction	M equiv/g			
	Na ⁺	K ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺
C1	2.96	0.25	0.15	0.04
C2	0.35	0.25	1.25	0.42
C3	2.60	0.10	0.07	0.17

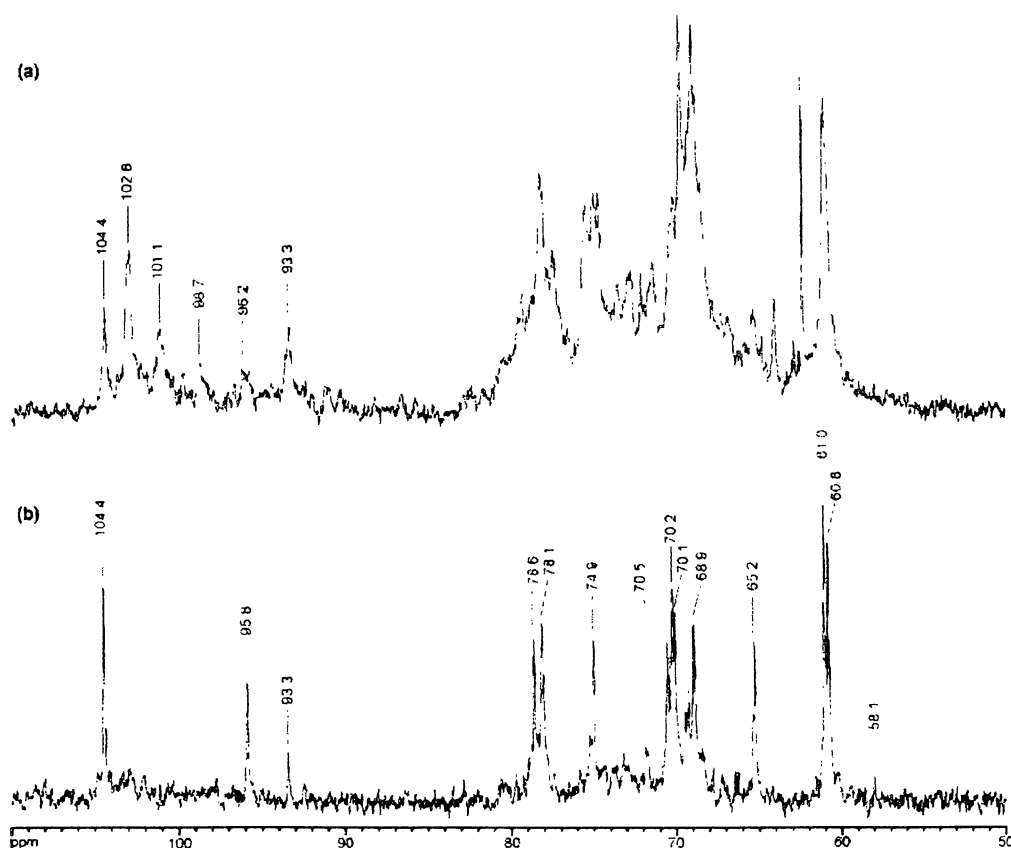
C2S-4, respectively (Table 1). C2S-2 was refractionated on the same column giving four fractions (C2S-2a–C2S-2d) (fraction C2S-2a was discarded due to the low yield) (Table 1). The subfractions C2S-2c–C2S-2d showed the same compositional scheme as above and, when enantiomeric analysis was carried out, the D- and L-forms of galactose, 3,6-anhydrogalactose and 2-O-methylgalactose were determined (Table 1). The major subfractions (C1S-3 and C2S-3) were homogeneous by HPSEC–MALLS analysis and showed M_w of 315,000 and 236,200, respectively.

The FTIR spectra of C1S-3 and C2S-3 were qualitatively similar, but the bands showed different intensities. The intensity of the 1250–1260 cm⁻¹ peak was higher in C2S-3 than in C1S-3, as well as the total absorption of the diagnostic region (940–800 cm⁻¹) in agreement with their sulfate content. In C2S-3 a major band at 832 cm⁻¹,

together with a shoulder at 820–805 cm⁻¹, indicates major amounts of equatorial secondary sulfate groups together with minor quantities of these groups on C-6 of the galactose residues and on C-2 of the 3,6-anhydrogalactose units. In C1S-3 the major peak was found at 820–800 cm⁻¹ with a less intense band at 832 cm⁻¹ in consistency with the small percentage of β-D-galactose 2-sulfate (Table 4). A medium band at 932 cm⁻¹ indicated the presence of the 3,6-anhydro ring in both cases.^{27,28}

The ¹³C NMR spectra of both subfractions (Figs. 1a and 2a) have common absorptions (Table 3) corresponding to the diads [Knutsen's nomenclature].²⁹ G (102.4–102.8 ppm)→LA2M (98.7 ppm)³⁰ and G2S (101.1 ppm, C-2 at 78.0 ppm)→D(6S) (96.1 ppm, C-6 sulfated at 67.7 ppm) and/or LA2S (96.1 ppm, C-2 at 75.6 ppm and C-3 at 78.3 or 78.1 ppm).³¹ C1S-3 shows G (104.4 ppm)→D2M (93.3 ppm)³² or D(6S) (96.2 ppm).⁷ The spectra also showed absorptions at 25.0 and 175.0 ppm attributed to the methyl and carboxyl groups of pyruvic acid acetal.³³

Methylation analyses of C1S-3 and C-2S-3 are shown in Table 4, while trideuteromethylation of C2S-3 is shown in Table 5. The pattern of methylation is qualitatively similar but differs from the quantitative point of view. The major 3-linked unit in C1S-3 is the

**Figure 1.** ¹³C NMR spectra of (a) fraction C1S-3, (b) desulfated C1S-3 (C1S-3D).

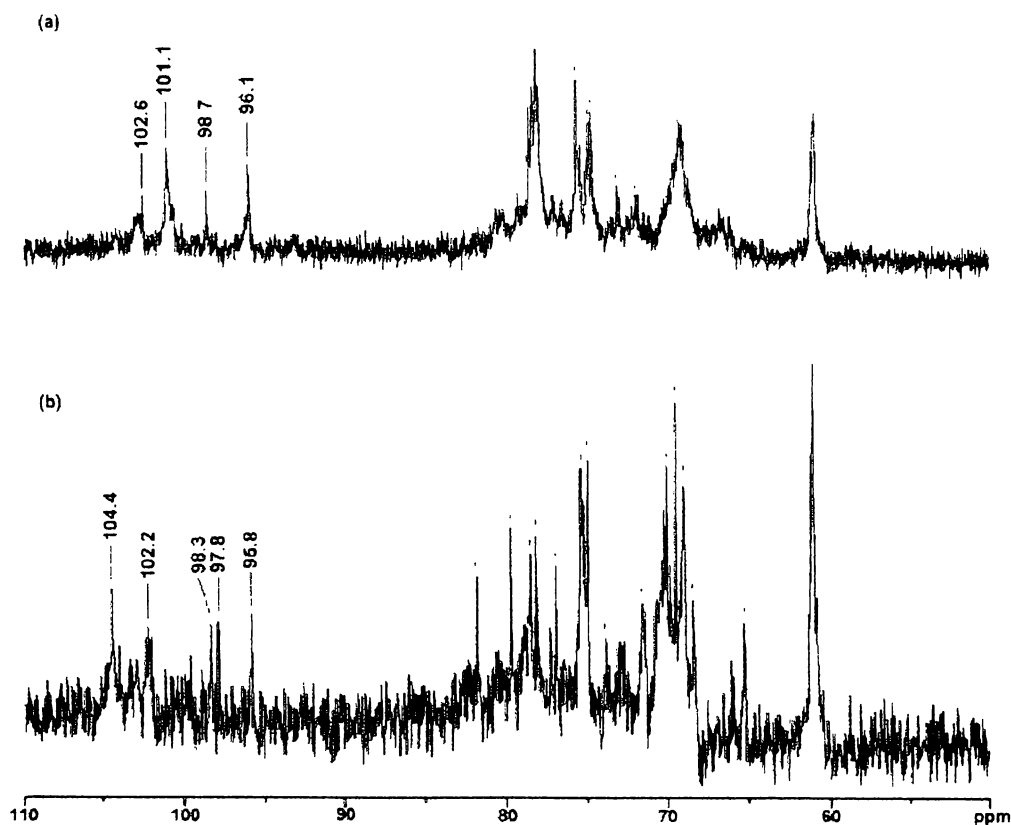


Figure 2. ^{13}C NMR spectra of (a) fraction C2S-3, (b) desulfated C2S-3 (C2S-3D)

Table 3. Chemical shifts (ppm) of various diads present in the ^{13}C NMR spectra of *C. crenulata* galactans

Diads	A-unit	B-unit
G→LA2M ^a	102.4–102.8	98.7
G2S→D(6S) and/or LA2S ^a	101.1	96.1
G→D(6S) ^b	104.4	96.2
G→D2M ^{b,c,d}	104.4	93.3
G→D(6S) ^d	104.3	96.1
G(P)→L(6S) ^d	103.1	100.7
G(P)→LA2M ^d	102.1–102.5	98.7
G(P)→LA2S ^d	102.1–102.5	96.1–96.7
G→LA ^e	102.2	97.8
G→LA2M ^e	102.2	98.3
G→D ^{e,c}	104.4	95.8

^a Common diads in C1S-3 and C2S-3 spectra.

^b Diads in C1S-3 spectrum.

^c Diads in C1S-3D spectrum.

^d Diads in CC spectrum.

^e Diads in C2S-3D spectrum.

unsubstituted one, while in C2S-3 it is the 2-sulfated residue. The original 2-*O*-methyl D- or L-galactoses in the subfractions are always found as 4-linked units. In C2S-3 the 3,6-anhydro residues are composed by the 2-sulfated, 2-methylated or non-substituted units. The main difference between the 4-linked units in both subfractions is that in the first one there are only small amounts of 'precursor units', while in the latter they amounted to 15.6%. Also that all the 3,6-anhydrogalac-

tose (16.7 mol %) was 2-*O*-methylated or/and non-methylated but not 2-sulfated in C1S-3, while in C2S-3 half of the 3,6-anhydro residues (D: 2 mol % and L: 11.6 mol %) were sulfated and the other half were C-2 methylated (8.6 mol %) or unsubstituted (3.5 mol %). The presence of Gal (Table 4) among the products of methylation for both fractions was attributed to 4,6-*O*-(1-carboxyethylidene)-galactopyranosyl 2-sulfate units. Thus, C1S-3 and C2S-3 show 1 pyruvate acetal group every 30 and 40 units, respectively. The degrees of pyruvylation are in agreement with the pyruvate percentages obtained by the Koepsell and Sharpe³⁴ method, corrected for the interference of 3,6-anhydrogalactose³⁵ (Table 1).

Alkali treatment of C2S-3 (60% yield) (C1S-3 contained only small amounts of 'precursor units') at 80 °C for 5 h produced a nearly quantitative cyclization of the precursor units (Table 4) without modification of the carbohydrate backbone (Table 1). Enantiomeric analysis of C2S-3T showed a major increase of the 3,6-anhydro- α -D-galactose (4.8→12.4 mol %) and only a minor increase of the L-form (11.0→14.3 mol %) in agreement with the total amount of (1→4) linked α -galactose 6-sulfate units in the parent compound and showing the proportions of the D- (7.6 mol %) and L- (3.3 mol %) forms in this residue. The small increase in 3,6-anhydrogalactose 2-sulfate agrees with the percentage (2.4 mol %) of the (1→4)-linked α -galactose 2,6-disulfate in the parent compound. Methylation analysis

Table 4. Methylation analysis of the native galactans (C1S-3, C2S-3) and their partially desulfated (C1S-3D, C2S-3D), alkali-treated (C2S-3T) and partially hydrolyzed (CC) subfractions

Derivative ^a	C1S-3	C1S-3D	C2S-3	C2S-3D	C2S-3T	CC
<i>3-Linked residues</i>						
2,4,6-Gal	24.0	40.0	3.0	42.6	4.0	17.8
4,6-Gal	6.5	3.1	31.4	2.0	33.7	9.2
2,4-Gal	7.6	3.0	—	2.0	—	—
4-Gal ^b	2.3	—	9.8	—	9.0	4.7
Gal	3.3	—	2.5	—	2.5	7.5
<i>4-Linked residues</i>						
2,3,6-Gal	11.5	42.6	7.5 ^c	23.4 ^c	7.7	13.3
2,3-Gal	3.7	—	13.2 ^c	—	—	9.2
3-Gal ^b	—	—	2.4	—	—	—
2AG	16.7	2.0	12.1 ^c	23.6 ^c	24.2	10.8
AG	—	—	13.6	2.0	16.0	19.2
<i>Undefined residues</i>						
2,6-Gal	7.1	—	2.2	—	—	—
2-Gal	8.2	3.4	—	2.4	—	3.2
<i>Terminal residues</i>						
2,3,4-Xyl	3.7	2.4	2.3	2.0	2.9	2.4
2,3,4,6-Gal	5.4	3.5	—	—	—	2.7

^a Mol % of monosaccharide having methyl or trideuteromethyl groups at the positions indicated.^b Determined after acid hydrolysis, reduction with NaBD₄ and acetylation. The relative proportion of the 4- and 3-Gal was determined using fragment ions, *m/z* 132 and 133, respectively.^c GC-MS analysis showed natural methoxyl on C-2.**Table 5.** Trideuteromethylation of the native (N) and partially desulfated (D) galactan C2S-3

Derivative	Composed by	Corresponding units		Mol %		Mass fragments (<i>m/z</i>) ^a
		N	D	N	D	
2,4,6-Gal	2,4,6-CD ₃ Gal	G	G + G2S + G2,6S	3.0	42.6	
4,6-Gal	4,6-CD ₃ Gal	G2S	G2S ^b	31.4	2.0	
2,4-Gal	2,4-CD ₃ Gal		G2S6X ^c	—	2.0	
4-Gal ^d	4-CD ₃ Gal	G2,6S + G2S6X		9.8	—	132, 192
2-Gal	2-CD ₃ Gal		GP2S	—	2.4	
Gal	Gal	GP2S		2.5	—	
2,3,6-Gal	2,3,6-CD ₃ Gal	DL	D/L + D6S + L6S + D2,6S/L2,6S	4.5 ^e	17.8 ^e	107, 120, 167
	2Me-3,6-CD ₃ Gal	D2M/L2M	D2M/L2M + L2M6S/D2M6S	3.0 ^e	5.6 ^e	104, 117, 164
2,3-Gal	2,3-CD ₃ Gal	D6S ^f		7.6 ^g	—	107, 120, 167
		L6S ^f		3.3 ^g	—	107, 120, 167
	2Me-3-CD ₃ Gal	L2M6S/D2M6S		2.3 ^g	—	104, 117, 164
3-Gal ^d	3-CD ₃ Gal	D2,6S/L2,6S		2.4	—	133, 193
2AG	2-CD ₃ AnGal	DA	DA + LA2S/DA2S	3.5 ^h	14.9 ^h	120
	2Me-3-CD ₃ AnGal	LA2M	LA2M	8.6 ^h	8.7 ^h	117
AG	AG	LA2S/DA2S	LA2S/DA2S ^b	13.6	2.0	
2,6-Gal	2,6-CD ₃ Gal	G4S/D3S/L3S		2.2	—	
2,3,4-Xyl	2,3,4-CD ₃ Xyl	X	X	2.3	2.0	

CD₃ = Trideuteromethyl.

/ = and/or, — = not detected.

^a Fragment ions used to determine the relative proportions of the various partially methylated, partially trideuteromethylated alditol acetates.^b Alternatively could represent 2-*O*-glycosylated units.^c Single stubs of xylose (X) at the indicated position.^d Determined after acid hydrolysis, reduction with NaBD₄, acetylation and GC-MS analyses of the native polysaccharide.^e Values calculated using the relative abundance of mass fragments [*m/z* (%)] of the derivative 2,3,6-Gal.^f The enantiomeric indications were based in enantiomeric analyses of the content of 3,6-anhydrogalactose in the native and alkali-treated galactans.^g Values calculated using the relative abundance of mass fragments [*m/z* (%)] of the derivative 2,3-Gal.^h Values calculated using the relative abundance of mass fragments [*m/z* (%)] of the derivative 2AG.

of the derivative (C2S-3T) confirms these results (Table 4). Although the percentage of 3,6-anhydro-2-*O*-methyl- α -galactose remained practically constant through the

treatment (Table 1), the trideuteromethylation of the native galactans (Table 5) showed the presence of small amounts of (1→4) linked 2-*O*-methylgalactose 6-sulfate

in C2S-3. In the ^{13}C spectrum of the polysaccharide C2S-3T (not shown), there was one new signal, of low intensity, at 95.3 ppm. This signal was attributed to the C-1 of 3,6-anhydro- α -D-galactosyl residues (formed in the alkali treatment) linked to G(P)2S.

The cyclization reaction of C2S-3 follows a pseudo first-order kinetics (similar determination on C1S-3 was not possible due to the small amounts of 'precursor units'). At 80 °C the cyclization showed a rate constant, in M sodium hydroxide, of $1.7 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$ and a half-life of 68.6 min. These values are intermediate between those of the disaccharide α -D-galactopyranosyl 2,6-disulfate-(1 $\rightarrow$ 3)-D-galactose³⁶ and λ -carrageenan³⁷ (Table 6).

Solvolytic desulfation of both fractions C1S-3 and C2S-3 removed most of the sulfate (87% in C1S-3 and 75% in C2S-3), giving C1S-3D and C2S-3D in yields of 48% and 96%, respectively. Compositional analysis of the desulfated derivatives indicates that the solvolytic treatment had not significantly modified the composition of C2S-3, with only a small decrease of the anhydro sugars (Table 1). On the other hand, the desulfated derivative of C1S-3 showed degradation with significant decrease of anhydrogalactosyl units (Table 1). The ^{13}C NMR spectrum of C1S-3D (Fig. 1b) shows, in agreement with the above results, two diads [Knutzen's nomenclature],²⁹ namely:

G (C-1–C-6: 104.4, 70.2, 78.6, 65.2, 74.9, 60.8 ppm) linked to D (C-1–C-6: 95.8, 68.9, 70.5, 78.1, 70.1, 61.0 ppm)⁷ or its 2-O-methyl derivative (C-1 at 93.3 ppm and methyl group at 58.1 ppm).³² The signal at 104.4 ppm would also correspond to single stubs of β -D-xylopyranose (C-5 at 65.4 ppm) and β -D-galactopyranose linked to C-6 of β -D-galactopyranose units³⁸ (methylation analysis). In contrast with the spectrum of the native polysaccharide (Fig. 1a and Table 3), the signal attributed to the L-sugar, LA2M (98.7 ppm), as well as the signal corresponding to methyl (25.1 ppm, not shown) of the pyruvate acetal, are not observed. Therefore, the remaining block resembles a partially desulfated ' λ -carrageenan' with β -D-xylose and β -D-

galactose single stubs on C-6 of some A-units and C-2 methoxyls on part of the B-units.

Methylation analysis (Table 4) of both desulfated fractions shows the removal of most of the sulfate groups. Trideuteromethylation of C2S-3D (Table 5) confirmed the results obtained with the respective native polysaccharide. Therefore the A-units are 93% 2-sulfated with some of these bearing sulfate groups or xylosyl units at O-6 or acetal of pyruvic acid at O-4 and O-6. B-units are also heavily substituted on C-2 by sulfate groups (33%, anhydrogalactosyl 2-sulfate plus galactosyl 2,6-sulfate) and by methoxyl groups (28%) on the anhydrogalactosyl and galactosyl units. The last units are also, in part, 6-sulfated.

The ^{13}C NMR spectrum of C2S-3D (Fig. 2b) shows, in agreement with the above results, three diads [Knutzen's nomenclature],²⁹ namely:

G (C-1–C-6: 102.2, 70.0, 81.8, 68.4, 74.9, 60.9 ppm)–LA (C-1–C-6: 97.8, 69.4, 79.7, 77.3, 75.3, 69.0 ppm);³⁰
G (C-1–C-6: 102.2, 70.0, 82.3, 68.4, 74.9, 60.9 ppm)–LA2M (C-1–C-6: 98.3, 78.5, 78.1, 77.3, 75.3, 69.0 ppm, methyl group at 58.8 ppm)³⁰ and
G (C-1–C-6: 104.4, 70.0, 78.5, 65.2, 74.9, 60.9 ppm)–D (C-1–C-2 and C-4–C-6: 95.8, 69.0 ppm and 78.1, 70.0, 60.9 ppm).⁷ Signals at 25.0, 65.2 and 66.4 ppm were attributed to the methyl carbon of the pyruvate acetal and the C-6 and C-5 of the pyruvated β -D-galactopyranose units.^{30,39,40}

Fraction C2S-3 was partially depolymerized with 0.375 M TFA at 65 °C for 6 h in a reducing medium to preserve the anhydro sugars.⁴¹ The mixture obtained was submitted to anion-exchange chromatography (Sephadex A-50). The subfractions CC and CD were further submitted to gel filtration on Bio-Gel P-2. The main subfraction (CC) proved to be homogeneous on HPSEC–MALLS and Bio-Gel P-30 with a molecular weight of 25,000 kDa. Monosaccharide composition is given in Table 1. The oligosaccharide contains major amounts of galactose, 3,6-anhydro- α -galactose and

Table 6. Rate constants and half-lives of the alkaline cyclization reactions in carrageenan and agar diads^{a,b}

Temp (°C)	Diads						
	G4S→D2,6S	G4S→D6S ^c	G→L6S ^d	G→D2,6S ^e	G→D2,6S ^f	G2S→D(L)6S ^g	G2S→D2,6S ^h
70	13.0 (9.0)		1.5 (77.0)	—	—	—	0.35 (320)
80	26.0 (4.5)		4.9 (23.0)	4.8 (24.7)	3.2 (38.3)	1.7 (68.6)	0.67 (170)

^a For experimental details, see Experimental.

^b Rate constants are given in $\times 10^4 \text{ s}^{-1}$ and half-lives (in parenthesis) in minutes.

^c The partially cyclized μ /v-carrageenan sample (1C₃)³⁷ contained about 80% of G4S→D2,6S and 20% of G4S→D6S of cyclizable diads.

^d From *Porphyra columbina*.⁶⁴

^e Average values from degraded λ -carrageenan T₂₍₂₆₎ and T₂₍₃₅₎ containing this diad.³⁶

^f Average values from a di- and a trisaccharide containing this diad from the partial acid hydrolysis of a λ -carrageenan.¹²

^g Fraction C2S-3 from galactan of *C. crenulata* containing about 70% of G2S→D6S and 30% of G2S→L6S.

^h Lambda-carrageenan (1T₂)³⁷ with 100% of G2S→D2,6S cyclizable diad.

3,6-anhydro-2-*O*-methyl- α -galactose, with a small amount of 2-*O*-methylgalactose and 25.3% of sulfate (as SO_3Na).

Methylation analysis (Table 4) showed a pattern of partially methylated galactoses as complex as that of the parent compound, the main difference being in the increase of 2,4,6-tri-*O*-methylgalactose concomitant with the decrease of the 4,6-di-*O*-methylgalactose. The loss of the sulfate group at C-2 of the A-units is in agreement with the desulfation and with previous results in the autohydrolysis of λ -carrageenans.⁴² Methylation shows major quantities of 2,3,6-tri-*O*-methylgalactose together with 3,6-anhydrogalactose and 3,6-anhydro-2-*O*-methylgalactose. Lesser, but significant, amounts of 2- and 4-*O*-methylgalactoses, 2,3- and 4,6-di-*O*-methylgalactoses and galactose were also found. The high percentages of single stubs of galactose (Table 4) are noteworthy.

The ^{13}C NMR spectra of CC (Fig. 3) and CD (the small amount of sample preclude any other determination) were visually very different, as in CC the peaks were sharp and well resolved, while those of the spectrum of CD were broad and not neat. Analysis of the peaks in the anomeric zone required data from the methylation analysis. Peaks at 24.9 and 175.3 ppm and at 101.1 ppm correspond to methyl and carboxyl³³ and acetal carbon⁴³ of the pyruvate acetal, while those at 104.2–104.3 ppm would, in part, correspond to β -D-xyl-ose³⁸ and/or β -D-galactose linked to C-6 of the A-units. The following diads were also determined:

G (104.3 ppm)→D(6S) (96.1 ppm)⁷ or D2M (93.3 ppm),³²
G(P) (103.1 ppm)→L(6S) (100.7 ppm),⁴⁴

G(P) (102.1–102.5 ppm)→LA2M (98.7 ppm),³⁰ or LA2S (96.1–96.7 ppm).³¹

In addition, the signal at 101.1 ppm was attributed to C-1 of G(P)2S.

There were also evident absorptions at 66.8 ppm (C-6 sulfate), 65.0–64.8 and 63.6 ppm (C-6 and C-5 of a β -D-galactose 4,6-acetal). Signals corresponding to methyl groups of 3,6-anhydro-2-*O*-methylgalactose (59.9 ppm)³⁰ and 2-*O*-methylgalactose (58.1 ppm)³⁸ were also observed. The anomeric signal at 93.3 ppm would be attributed to both D2M and/or DA2S.

Both spectra (CC and CD) show absorptions corresponding to 3,6-anhydrogalactitol units (C-1 at 62.8 ppm, C-3 and C-4 at 83.0 and 86.2 ppm, respectively),⁴¹ indicating the cleavage of a part of anhydrogalactosidic bonds. Previous results (not shown) demonstrated that oligosaccharides with a low-degree of polymerization (di- and tetrasaccharides) were obtained only after 14 h of partial hydrolysis using the original conditions.⁴¹ Milder partial reductive hydrolysis conditions, in comparison with those of the original method,⁴¹ used in this work, together with the sulfate group on C-2 of 3,6-anhydrogalactosyl units, could explain the resistance of some of the anhydrogalactosidic linkages giving rise to high-molecular mass oligosaccharides.

3. Discussion

The only structural information on the polysaccharides of *C. crenulata* reported the seaweed as an ι -carrageenan producer.²⁴ However further studies on these products

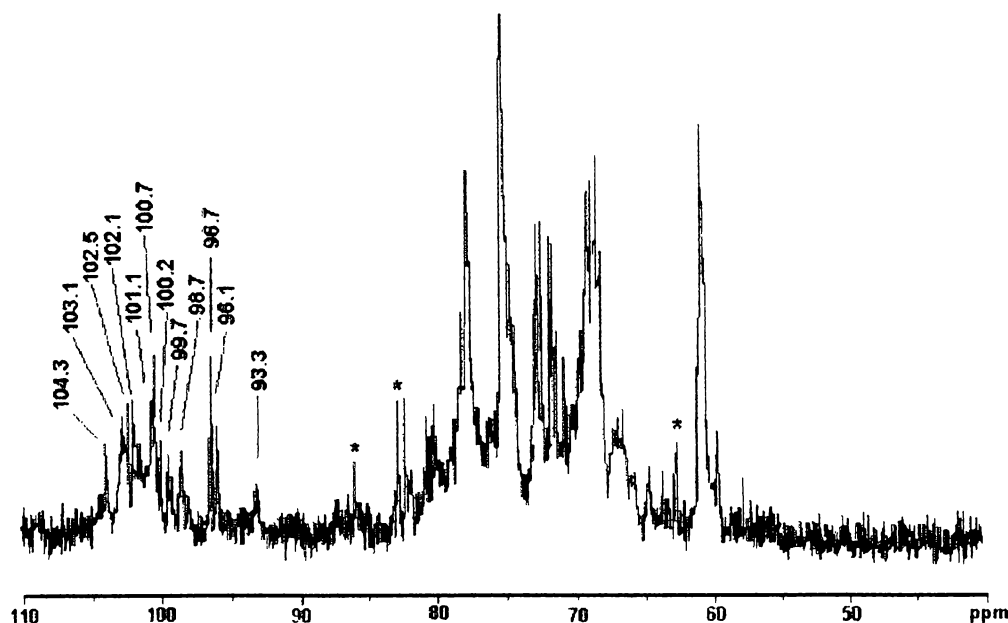


Figure 3. ^{13}C NMR spectra of fraction CC. *Anhydrogalactitol signals (see text).

did not agree with this structure, indicating more complex ones.²⁵

3.1. The structure of the major fractions of the matrix polysaccharides from *C. crenulata*

Both major fractions (C1S-3 and C2S-3) contain qualitatively similar A-units constituted by non-sulfated and 2-sulfated residues. These residues can also have minor substitution on C-2 and C-6 (sulfate) and C-4,6 (pyruvic acid acetal). Non-sulfated units predominate in C1S-3, but 2- and 2,6-sulfated residues are the major ones in C2S-3. B-units are rather different in both fractions: C1S-3 is characterized by the small amounts of 'precursor units' and 3,6-anhydro-2-*O*-methyl- α -L-galactose, the lack of 3,6-anhydrogalactose 2-sulfate and substitution in C-6 with single stubs of β -D-galactose and β -D-xylose. In C2S-3 the α -galactose 6-sulfate and the 3,6-anhydrogalactose and 3,6-anhydro-2-*O*-methylgalactose units are predominant, together with a small amount of 2-*O*-methyl α -L- and α -D-galactose, and substitution at C-6 with single stubs of β -D-xylose. The pattern of naturally methylated galactoses is slightly different from those obtained with *Pachymenia carnosus*^{14,16} and *Aeodes ulvoidea*^{22,23} where all the methylation occurs on 4-linked galactosyl or 3,6-anhydrogalactosyl residues. In *Pachymenia lusoria* all the *O*-methyl galactosyl units are in the D-configuration, even when 4-linked. The 4-linked galactosyl units may be either in the D- or L-configuration, but the 3,6-anhydro units are all in the L-configuration.¹⁸ The glycosyl substituents are β -linked to C-6 of a (1 $\rightarrow$ 3) linked β -D-galactopyranose (2-sulfate) as in the DL-hybrid galactan from *P. lusoria*¹⁸ (Halymeniaceae, Halymeniales) and from gametophytes of *Gymnogongrus torulosus*⁴⁵ (Phylloporaceae, Gigartinales). In an agar from *Joculatus maximus*,⁴⁶ (Corallinales), β -D-xylosylation is at *O*-6 of ca. 50% of the A-units. Similar xylosylation has been demonstrated in a xylogalactan sulfate from *Corallina officinalis*⁴⁷ (Corallinales). Side branches of β -D-xylose residues were found at *O*-3 of the B-units in a galactan sulfate from *Chondria macrocarpa*⁴⁸ (Ceramiales) and in *Laurencia nipponica*⁴¹ (Ceramiales).

Carrageenans are linear molecules, and the presence of these branches of β -D-xylose and/or β -D-galactose, as well as those of unusual major diads (see later), suggest that the structure of carrageenan blocks in DL-hybrids may be somewhat different to that of classical carrageenans.

3.2. The family of matrix galactans synthesized by *C. crenulata*

The compositional and enantiomeric analyses of all the fractions and subfractions (Table 1), as well as the structural units of CS1-3 and CS2-3, indicate that *C. crenu-*

lata biosynthesizes a family of galactans based on the classical 3-linked β -D-Gal $\rightarrow$ 4-linked α -Gal alternating sequence. The dispersion of structures is based on four factors, namely: (a) the amount and position of substituent groups as sulfate, pyruvic acid acetals, methoxyl and lateral chains of β -D-xylose and/or β -D-galactose; (b) the ratio galactose/3,6-anhydrogalactose in the B-units; (c) the ratio D-/L-galactoses and 3,6-anhydrogalactoses also in the B-units and (d) the sequence of the diads in the linear backbone. Details of the major and minor A- and B-units are given in Tables 3 and 4 and in the preceding section.

The structural units can be organized as diads according to the ¹³C NMR spectral data (Table 3). The arrangements of different amounts of these diads in sequences would build up the polysaccharide chains, but the emerging complexities make it impossible, at this stage, to construct a model of the polysaccharide. These possible arrangements would be severely restricted if the hybrid is a block copolymer of carrageenan and agaran structures as previously supposed² (or a mixture of carrageenans and agarans). Both hypotheses are consistent with the degradation of C1S-3 to a 'carrageenan' during the desulfation. With this view in mind, the carrageenan blocks (or molecules) could be grossly described by the major G2S $\rightarrow$ D6S and G $\rightarrow$ D6S diads and its 3,6-anhydro and substituted derivatives.

These parent diads have not been found as major components in natural carrageenans. The agaran blocks would consist in A-units similar to those of the carrageenan and B-units as non-substituted or 6-sulfated L-galactose and 3,6-anhydro- α -L-galactose. The G2S $\rightarrow$ L6S diad was found in agarans from *Acanthophora spicifera*.⁴⁹ These diads G2S $\rightarrow$ D(L)6S are structurally analogous to the minimal binding sequence necessary for the interaction of heparan sulfate with the glycoprotein gC of the herpes virus HSV-1⁵⁰ and are considered responsible for the high-antitherpetic activity of these type of polysaccharides.^{26,49}

It is not actually known whether the above 'block DL-hybrid' hypothesis is correct or whether the polysaccharide extracts constitute a mixture of carrageenan-type and agaran-type molecules. Attempts at fractionation of the raw extracts or of different fractions and subfractions by KCl differential precipitation or ion-exchange chromatography, as well as by several similar fractionations used for other similar products^{5,7,11,22} always failed, and to the best of our knowledge, there is no evidence that any seaweed of the Halymeniaceae (Halymeniales) contain more than one type of galactan. Whether this is a proof of the existence of DL-hybrid galactan molecules or only shows the failure of present-day techniques to fractionate mixtures of 'diastereoisomeric' polysaccharides it is not known, but if we apply the classical definition of homogeneity, these products should be considered as DL-hybrid galactan until a

successful fractionation demonstrates the contrary. On the other hand, it must be kept in mind that the seaweeds concentrate calcium and magnesium, and that these divalent cations should contribute to the complexation of the sulfated polysaccharides making their separation extremely difficult.⁵¹ It is worth noting that the concentration of Ca^{2+} and Mg^{2+} increased about 10 times in the extract (C2) obtained under the harshest conditions (Table 2).

Present evidence suggests that the presence of both carrageenan and agaran structures in red seaweeds is not exceptional but a general fact^{5,7,11,18,22,23,25,52–63} and that the traditional division of the red seaweeds in carrageenophytes and agarophytes can be maintained only if it refers to the major type (and not the only one) of polysaccharides biosynthesized by the seaweed.

3.3. Kinetic studies on the alkaline 3,6-anhydro cyclization in C2S-3 diads

According to the methylation and ^{13}C NMR spectroscopic data of C2S-3, there are several structural possibilities (diads) for 3,6-anhydrogalactose formation. The rate constant of the cyclization reaction would be determined by the presence of two different A-units and two different B-units (four possible cyclizable diads). Nevertheless, previous kinetics indicated that the enantiomeric character of the B-units,⁶⁴ as well as the presence of a C-2 sulfate in them (when the A-unit carries a sulfate at C-4),^{37,65} would not influence that rate. Non-sulfated and C-2 sulfated residues are present in percentages of 9% and 91%, respectively, in the A-units (Tables 4 and 5), while 2,6-disulfated and 6-sulfated α -galactoses accounted for 30% and 70% of the cyclizable B-residues (Tables 4 and 5). The lesser units would produce opposite effects, that non-sulfated A-units (porphyrans) would increase the reaction rates³⁶ (Table 6) while 2-sulfated B-units (λ -carrageenans) could slow them³⁷ (Table 6). It is expected then, that the system of parallel reactions would be undetected and that the rate constant value would be in between those of porphyrans and λ -carrageenans. Actually, the rate constant ($1.7 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$) shows a reaction that is about two times faster than in λ -carrageenans,³⁷ but slower than in porphyrans.⁶⁴ The driving force of the cyclization is the ionization of the C-3 hydroxyl group in the B-unit. In diads, which carry a sulfate group on C-2 of the A-unit (*C. crenulata*) or sulfate groups on C-2 of the A- and B-units (λ -carrageenans), an interaction of these groups with the C-3 hydroxyl group (B-unit) is expected, shielding the C-3 hydroxyl from ionization, and, therefore, reducing the cyclization rate.³⁶ Molecular models suggest an appropriate geometry for this interaction, which has also been reported for heparin sulfates.⁶⁶

The destabilization of the $^4\text{C}_1$ chair conformation of the B-unit and its change to a $^1\text{C}_4$ chair conformation is due to the repulsion between the negative charges on the C-2 and C-3 hydroxide ions (G2S→D(L)6S diad, *C. crenulata*) or on the C-2 sulfate and C-3 hydroxide ion (λ diad, G2S→D2,6S). The negative charge on the C-2 is preexistent in the λ diad (sulfate group) and is formed firstly on C-2 of the *C. crenulata* diad due to the higher acidity of this hydroxyl group.^{67,68} It is expected that the interaction of the closer hydroxide ions of rigid geometry would destabilize the B-unit $^4\text{C}_1$ conformation to a $^1\text{C}_4$ one, easier than that of the hydroxide and sulfate ions producing, in the first case, a faster cyclization. As in the κ -family (with the sulfate group on C-4 of the A-unit),^{37,65} it is suggested that the change of the C-2 sulfate in the B-unit from the equatorial to the axial position during the conversion of the $^4\text{C}_1 \rightarrow ^1\text{C}_4$ chair conformation does influence the cyclization rate. This lack of influence was attributed to the low 1,3-axial repulsion of the axial group, which is further relieved by the distortion of the chair caused by the 3,6-anhydro bridge.⁶⁹

4. Experimental

4.1. Extraction and purification

The samples of *C. crenulata* were collected and worked up as previously reported.²⁶ Briefly, the seaweed was extracted with water at 25 °C for 5 h yielding C1. Sequentially the algal residue was extracted twice with hydrogen/dihydrogen phosphate buffer (pH 6.5) at 80 °C yielding C2 and C3. The polysaccharides (C1, C2 and C3) were obtained by precipitation with EtOH. C1 and C2 were submitted to KCl fractionation²⁶ giving the soluble (2 M KCl) fractions C1S and C2S, respectively. The insoluble fractions were discarded. C1S and C2S were submitted to anion-exchange chromatography (DEAE-Sephacel) using water and an aqueous solution of NaCl of increasing concentration. From C1S were obtained the following fractions: C1S-1 (0.3 M), C1S-2 (0.4 M) and C1S-3 (0.7 M), whereas from C2S were obtained the fractions C2S-1 (water), C2S-2 (0.5 M), C2S-3 (M) and C2S-4 (1.5 M) (Table 1).

C2S-2 was refractionated using the same column of DEAE-Sephacel. Elution was performed with water, then with a solution of NaCl to give four fractions, C2S-2a (0.3M), C2S-2b (0.35 M), C2S-2c (0.45 M) and C2S-2d (M) (Table 1).

4.2. Analytical methods

Total carbohydrate was determined by the phenol-sulfuric acid method,⁷⁰ using D-galactose as the standard. Sulfate content and protein were determined by the

turbidimetric method of Dodgson and Price⁷¹ and Lowry et al.,⁷² respectively. Pyruvic acid and protein were determined by the method of Koepsell and Sharpe.³⁴ The results of this determination were corrected for the presence of 3,6-anhydrogalactose.³⁵ The cation composition was determined by flame atomic absorption spectrometry. The ratio of D- and L-galactose was estimated after reductive amination with chiral 1-amino-2-propanol, followed by acetylation and GC analysis (Ultra-2 column, Hewlett–Packard), whereas the configuration of 2-O-methylgalactose was determined using α -methylbenzylamine, as the amine.⁷³ Derivatization of 3,6-anhydrogalactonates, following GC analysis (SP2330 column) of the corresponding diastereomeric *sec*-butyl esters, was used to estimate the ratio of D- to L-3,6-anhydrogalactose.⁷⁴ The determination of monosaccharide composition and analysis of the methylation products were carried out by reductive hydrolysis⁷⁵ using extra reducing agent (4-methylmorpholine-borane) before and after prehydrolysis steps.⁷⁶ The reactions were followed by GC and GC–MS of the alditol acetates. To distinguish between co-eluting derivatives by GC–MS, partially methylated alditol acetates were also generated by hydrolysis in aqueous formic acid (45% for 16 h at 100 °C), followed by NaBD₄ reduction and acetylation. These GC analyses were carried out on an HP-5890 gas-liquid chromatograph equipped with a flame-ionization detector (FID), using a fused silica capillary column (30 m $\times$ 0.25 mm) coated with DB-225 (Durowax) eluted isothermally at 210 °C. Nitrogen was used as carrier gas at flow rate of 1 mL min⁻¹ and a split ratio of 100:1. GC–MS analysis was performed using a Varian 3300 chromatograph and a Finnigan Mat ITD spectrometer equipped with two different columns. DB-225 or a DB-23. Helium was used as carrier gas at 1 mL min⁻¹.

Optical rotations of aqueous solution of the polysaccharide samples (0.2%) were measured at 20 °C using a 10-cm cell and the sodium D line (589.3 nm) on a Rudolph Autopol III automatic polarimeter.

4.3. Alkali modification

The sample of polysaccharide C2S-3 (200 mg) was dissolved in water (100 mL) and NaBH₄ (10 mg) was added. After 12 h at 4 °C the NaOH concentration was adjusted to M, using 3 M NaOH (50 mL). The cyclization reaction was carried out at 80 °C for 5 h to give C2S-3T. The increase of 3,6-anhydrogalactose was determined by the resorcinol method.⁷⁷ To determine the reaction rate and half-life. C2S-3 was submitted to alkaline cyclization at 80 °C as previously described.³⁷

4.4. Desulfation

Partial solvolytic desulfation followed the method of Nagasawa et al.⁷⁸ The native galactans (C1S-3 and

C2S-3) in the pyridinium salt form, were treated with 89:10:1 dimethyl sulfoxide-methanol-pyridine at 100 °C for 4 h to afford C1S-3D and C2S-3D, respectively.

4.5. Methylation

Methylation (C1S-3, C1S-3D and C2S-3T) or trideutero-methylation (C2S-3 and C2S-3D) analysis was carried out by the method of Ciucanu and Kerek⁷⁹ with the polysaccharides in the corresponding triethylammonium salt form.⁸⁰ Briefly, the samples (15 mg) were dissolved in dimethyl sulfoxide (1 mL), and powdered NaOH (30 mg) was added as base. After 30 min at 25 °C with vigorously stirring, iodomethane or trideuteroiodomethane (CH₃I or CD₃I) (0.1 mL) was added, and the reaction was allowed to proceed as described above. The addition of NaOH and CH₃I or CD₃I was repeated twice. The reaction was interrupted by addition of water, neutralized with HOAc, dialyzed against distilled water and freeze-dried. The polysaccharides were submitted to more three steps of methylation or trideutero-methylation in the same way as described above.

4.6. HPSEC–MALLS analysis

The determination of the homogeneity was performed on a waters high-performance size-exclusion chromatography (HPSEC) apparatus coupled to a differential refractometer (RI) and a Wyatt Technology Dawn-F Multi-Angle Laser Light Scattering detector (MALLS). Waters Ultrahydrogel columns (2000, 500, 250 and 120) were connected in series and coupled with multidetection equipment, using a NaNO₂ solution (0.1 M) as eluent, containing NaN₃ (200 ppm) as preservative. The samples (2 mg mL⁻¹) were dissolved in the same solvent under magnetic stirring for 2 h and filtered through a 0.45 and 0.22 μ m nitrocellulose membrane (GSWP, Millipore). HPSEC data were collected and analyzed by the Wyatt Technology ASTRA program. The light scattering signal was detected simultaneously at 11 scattering angles, θ , ranging from 35° to 132°. All experiments were carried out at 25 °C.

4.7. Partial depolymerization

The galactan C2S-3 (700 mg) was dissolved in water (52.5 mL), the solution was heated to 65 °C and 4.8 g an acid-stable reducing agent (borane-4-methylmorpholine complex)⁴¹ and TFA 1.5 M (17.5 mL) were then added. The solution was maintained at 65 °C for 6 h. Acid was removed (co-distillation with water), and the residue was freeze-dried and then submitted to anion-exchange chromatography on DEAE-Sephadex A-25 (column 5 $\times$ 22 cm) using a water and linear gradient of NaCl (0–0.5 M), 0.6 M NaCl and 0.7 M NaCl as eluent.

The fractions (CC and CD) were mixed with Me₂SO (100 mL) and submitted to mechanical stirring. After centrifugation, the supernatant was treated with CHCl₃ (3 vol.), and the precipitate was dried at room temperature. The oligosaccharide fractions were sequentially desalinated using a Bio-Gel P-2 column (2 × 60 cm). The homogeneity of CC was available on HPSEC–MALLS and Bio-Gel P-30 column (0.5 × 5.5 cm). The molecular weight was determined on Bio-Gel P-30 using standard dextrans (MW 9400 and 40.200 kDa).

4.8. Spectroscopic analysis

For NMR analysis the lyophilized samples were dissolved in D₂O (20–30 mg). The NMR spectra of the solutions were recorded at 70 °C using a Bruker Avance DRX400 NMR spectrometer. The spectra were obtained using a 5 mm multinuclear inverse detection probe. Fourier-transform infrared (FTIR) spectra of polysaccharide pellets were recorded on a Perkin–Elmer series 2000 FTIR spectrometer in transmittance mode (eight scans, collected at a resolution of 4 cm^{−1}).

Acknowledgements

The authors are indebted to Dr. Eurico Cabral de Oliveira (Universidade de São Paulo-Brasil) for sorting the algal material. This work was supported by grants from PRONEX-CARBOIDRATOS and CAPES (Brazil). The authors are indebted to Drs. Marina Cíncia and Jose M. Estevez (Universidad de Buenos Aires-Argentina) for enantiomeric analyses.

References

- Painter, T. J. In *The Polysaccharides*; Aspinall, G. O., Ed.; Academic: London, 1983; pp 195–285.
- Stortz, C. A.; Cerezo, A. S. *Curr. Top. Phytochem.* **2000**, *4*, 121–134.
- Hirase, S.; Araki, C.; Watanabe, K. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1967**, *40*, 1445–1448.
- Hirase, S.; Watanabe, K. *Bull. Inst. Chem. Res.* **1972**, *50*, 332–336.
- Usov, A. I.; Miroshnikova, L. I.; Barbakadze, V. V. *Zh. Obsh. Khim.* **1975**, *45*, 1618–1624.
- Baeza, P.; Matsuhira, B. *Bot. Mar.* **1977**, *20*, 355–357.
- Usov, A. I.; Yarotsky, S. V.; Shashkov, A. S. *Biopolymers* **1980**, *19*, 977–990.
- Parekh, R. G.; Doshi, Y. A.; Chauhan, V. D. *Indian J. Mar. Sci.* **1989**, *18*, 139–140.
- Zabackis, E.; Perez, J. *Bot. Mar.* **1990**, *33*, 273–276.
- Lai, M.-F.; Li, C. *Bot. Mar.* **1998**, *41*, 223–234.
- Sen Sr. A. K.; Das, A. K.; Sarka, K. K.; Siddhanta, A. K.; Takano, R.; Kamei, K.; Hara, S. *Bot. Mar.* **2002**, *45*, 331–338.
- Parekh, R. G.; Doshi, Y. A.; Chauhan, V. D. *Indian J. Mar. Sci.* **1987**, *16*, 274–276.
- Lai, M.-F.; Li, C.-F.; Li, C.-Y. *Food Hydrocoll.* **1994**, *8*, 215–232.
- Farrant, A. J.; Nunn, J. R.; Parolis, H. *Carbohydr. Res.* **1971**, *19*, 161–168.
- Farrant, A. J.; Nunn, J. R.; Parolis, H. *Carbohydr. Res.* **1972**, *25*, 283–292.
- Parolis, H. *Carbohydr. Res.* **1978**, *62*, 313–320.
- Parolis, H. *Carbohydr. Res.* **1981**, *93*, 261–267.
- Miller, I. J.; Falshaw, R.; Furneaux, R. H. *Carbohydr. Res.* **1995**, *268*, 219–232.
- Miller, I. J.; Falshaw, R.; Furneaux, R. H.; Hemmingson, J. A. *Bot. Mar.* **1997**, *40*, 119–127.
- Nunn, J. R.; Parolis, H. *Carbohydr. Res.* **1970**, *14*, 145–150.
- Nunn, J. R.; Parolis, H. *Carbohydr. Res.* **1968**, *6*, 1–11.
- Allsobrook, A. J. R.; Nunn, J. R.; Parolis, H. *Carbohydr. Res.* **1971**, *16*, 71–78.
- Allsobrook, A. J. R.; Nunn, J. R.; Parolis, H. *Carbohydr. Res.* **1974**, *36*, 139–145.
- Saito, R. M.; Oliveira, E. C. *Hydrobiologia* **1990**, *204/205*, 585–588.
- Chopin, T.; Kerin, B. F.; Mazerolle, R. *Phycol. Res.* **1999**, *47*, 167–188.
- Talarico, L. B.; Zibetti, R. G. M.; Faria, P. C. S.; Scolaro, L. A.; Duarte, M. E. R.; Nosedá, M. D.; Pujol, C. A.; Damonte, E. B. *Int. J. Biol. Macromol.* **2004**, *34*, 63–71.
- Stancioff, D. J.; Stanley, N. F. *Proc. Int. Seaweed Symp.* **1969**, *6*, 595–609.
- Craigie, J. S.; Leigh, C. In *Handbook of Phycological Methods: Physiological and Biochemical Methods*; Hellebust, J. A., Craigie, J. S., Eds.; Cambridge University Press: Cambridge, 1978; pp 109–131.
- Knutsen, S. H.; Myslabodski, D. E.; Larsen, B.; Usov, A. I. *Bot. Mar.* **1994**, *37*, 163–169.
- Lahaye, M.; Yaphe, W.; Viet, M. T. P.; Rochas, C. *Carbohydr. Res.* **1989**, *190*, 249–265.
- Miller, I. J.; Blunt, J. W. *Bot. Mar.* **2000**, *43*, 263–271.
- Miller, I. J.; Blunt, J. W. *Bot. Mar.* **2000**, *43*, 251–261.
- Garegg, P. J.; Lindberg, B.; Kvarnström, I. *Carbohydr. Res.* **1979**, *77*, 71–78.
- Koepsell, H. J.; Sharpe, E. S. *Arch. Biochem. Biophys.* **1952**, *38*, 443–449.
- Duckworth, M.; Yaphe, W. *Chem. Ind.* **1970**, *23*, 747–748.
- Nosedá, M. D.; Cerezo, A. S. *Carbohydr. Polym.* **1995**, *26*, 1–3.
- Cíncia, M.; Nosedá, M. D.; Matulewicz, M. C.; Cerezo, A. S. *Carbohydr. Polym.* **1993**, *20*, 95–98.
- Usov, A. I.; Bilan, M. I.; Shashkov, A. S. *Carbohydr. Res.* **1997**, *303*, 93–102.
- Lahaye, M.; Rochas, C. *Hydrobiologia* **1991**, *221*, 137–148.
- Chiovitti, A.; Bacic, A.; Craik, D. J.; Munro, S. L. A.; Kraft, G. T.; Liao, M.-L. *Carbohydr. Res.* **1997**, *299*, 229–243.
- Usov, A. I.; Elashvili, M. *Bot. Mar.* **1991**, *34*, 553–560.
- Nosedá, M. D.; Cerezo, A. S. *Int. J. Biol. Macromol.* **1993**, *15*, 177–181.
- Gorin, P. A. J.; Mazurek, M.; Duarte, H. S.; Iacomini, M.; Duarte, J. H. *Carbohydr. Res.* **1982**, *100*, 1–15.
- Lahaye, M.; Yaphe, W.; Rochas, C. *Carbohydr. Res.* **1985**, *143*, 240–245.
- Estevez, J. M.; Cíncia, M.; Cerezo, A. S. *Carbohydr. Res.* **2001**, *331*, 27–41.
- Takano, R.; Hayashi, J.; Hayashi, K.; Hara, S.; Hirase, S. *Bot. Mar.* **1996**, *39*, 95–102.
- Cases, M. R.; Stortz, C. A.; Cerezo, A. S. *Int. J. Biol. Macromol.* **1994**, *16*, 93–97.

48. Furneaux, R. H.; Stevenson, T. T. *Hydrobiologia* **1990**, 204/205, 615–620.
49. Duarte, M. E. R.; Cauduro, J. P.; Nosedá, D. G.; Nosedá, M. D.; Gonçalves, A. G.; Pujol, C. A.; Damonte, E. B.; Cerezo, A. S. *Carbohydr. Res.* **2004**, 339, 335–347.
50. Feyzi, E.; Trybala, E.; Bergström, T.; Lindahl, U.; Spillmann, D. *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 24850–24857.
51. Kloareg, B.; Quatrano, R. S. *Mar. Biol. Ann. Rev.* **1988**, 26, 259–315.
52. Craigie, J. S.; Rivero-Carro, H. *Abstr. Papers, XIVth Int. Seaweed Symp., Brest-St. Malo: France, August 1992*: p Abstr. 71.
53. Ciancia, M.; Matulewicz, M. C.; Cerezo, A. S. *Phytochemistry* **1993**, 34, 1541–1543.
54. Takano, R.; Nose, Y.; Hayashi, K.; Hara, S.; Hirase, S. *Phytochemistry* **1994**, 37, 1615–1619.
55. Miller, I. J.; Furneaux, R. H. *Bot. Mar.* **1996**, 39, 141–147.
56. Stortz, C. A.; Cases, M. R.; Cerezo, A. S. *Carbohydr. Polym.* **1997**, 34, 61–65.
57. Ciancia, M.; Matulewicz, M. C.; Cerezo, A. S. *Phytochemistry* **1997**, 45, 1009–1013.
58. Takano, R.; Iwane-Sakata, H.; Hayashi, K.; Hara, S.; Hirase, S. *Carbohydr. Polym.* **1998**, 35, 81–87.
59. Takano, R.; Yokoi, T.; Kamei, K.; Hara, S.; Hirase, S. *Bot. Mar.* **1999**, 42, 183–188.
60. Estevez, J. M.; Ciancia, M.; Cerezo, A. S. *Carbohydr. Res.* **2000**, 325, 287–299.
61. Takano, R.; Shiimoto, K.; Kamei, K.; Hara, S.; Hirase, S. *Bot. Mar.* **2003**, 46, 142–150.
62. Falshaw, R.; Furneaux, R. H.; Miller, I. J. *Bot. Mar.* **1999**, 42, 431–435.
63. Miller, I. J. *Bot. Mar.* **2001**, 44, 251–255.
64. Nosedá, M. D.; Viana, A. G.; Duarte, M. E. R.; Cerezo, A. S. *Carbohydr. Polym.* **2000**, 42, 301–305.
65. Viana, A. G.; Nosedá, M. D.; Duarte, M. E. R.; Cerezo, A. S. *Carbohydr. Polym.* **2004**, 58, 455–460.
66. Fransson, L.-A.; Maemström, A.; Sjöberg, I.; Huckerby, T. N. *Carbohydr. Res.* **1980**, 80, 131–145.
67. Sugihara, M. J. *Adv. Carbohydr. Chem.* **1953**, 8, 1–44.
68. Lenz, R. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1960**, 82, 182.
69. Eliel, E. L.; Allinger, N. L.; Angyal, S. J.; Morrison, G. A. *Conformational Analysis* **1981**.
70. Dubois, M.; Gilles, K. A.; Hamilton, J. K.; Rebers, P. A.; Smith, F. *Anal. Chem.* **1956**, 28, 350–356.
71. Dodgson, K. S.; Price, R. G. *Biochem. J.* **1962**, 84, 106–110.
72. Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L.; Randall, R. J. *J. Biol. Chem.* **1951**, 193, 265–275.
73. Cases, M.; Cerezo, A. S.; Stortz, C. A. *Carbohydr. Res.* **1995**, 269, 333–341.
74. Errea, M. I.; Ciancia, M.; Matulewicz, M. C.; Cerezo, A. S. *Carbohydr. Res.* **1998**, 311, 235–238.
75. Stevenson, T. T.; Furneaux, R. H. *Carbohydr. Res.* **1991**, 210, 277–298.
76. Falshaw, R.; Furneaux, R. *Carbohydr. Res.* **1994**, 252, 171–182.
77. Yaphe, W.; Arsenault, G. P. *Anal. Biochem.* **1965**, 13, 143–148.
78. Nagasawa, K.; Inoue, Y.; Kamaia, T. *Carbohydr. Res.* **1977**, 58, 47–55.
79. Ciucanu, I.; Kerek, F. *Carbohydr. Res.* **1984**, 131, 209–217.
80. Stortz, C. A.; Cerezo, A. S. *Carbohydr. Res.* **1993**, 242, 217–227.

Anti-herpes simplex virus activity of sulfated galactans from the red seaweeds *Gymnogongrus griffithsiae* and *Cryptonemia crenulata*

Laura B. Talarico^{a,†}, Rosiane G.M. Zibetti^{b,†}, Paula C.S. Faria^{b,†}, Luis A. Scolaro^a,
Maria E.R. Duarte^b, Miguel D. Nosedá^b, Carlos A. Pujol^a, Elsa B. Damonte^{a,*}

^a Laboratorio de Virología, Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales,
Universidad de Buenos Aires, Ciudad Universitaria, Pabellón 2, 1428 Buenos Aires, Argentina

^b Departamento de Bioquímica e Biología Molecular, Universidade Federal do Paraná,
P.O. Box 19046, CEP 81531-990 Curitiba, Paraná, Brazil

Abstract

This study presents the chemical composition and antiviral activity against herpes simplex virus type 1 (HSV-1) and 2 (HSV-2) of sulfated galactan crude extracts and main fractions obtained from two red seaweeds collected in Brazil, *Gymnogongrus griffithsiae* and *Cryptonemia crenulata*. Most of the eighteen tested products, including homogeneous kappa/iota/nu carrageenan and DL-galactan hybrid, exhibited antiherpetic activity with inhibitory concentration 50% (IC₅₀) values in the range 0.5–5.6 µg/ml, as determined in a virus plaque reduction assay in Vero cells. The galactans lacked cytotoxic effects and showed a broad spectrum of antiviral activity against HSV-1 and HSV-2. No direct virus inactivation was observed after virion treatment with the galactans. The mode of action of these compounds could be mainly ascribed to an inhibitory effect on virus adsorption. Most importantly, a significant protection against a murine vaginal infection with HSV-2 was afforded by topical treatment with the sulfated galactans.

© 2004 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Herpes simplex virus; Antiviral activity; Sulfated polysaccharide; Kappa/iota/nu carrageenan; D,L-Galactan hybrid; Red seaweed

1. Introduction

Sulfated polysaccharides are known to present a broad range of biological activities comprising antiviral and antitumoral action, variable effects on the immune system and anticoagulant activity. In particular, the antiviral effect of naturally occurring and chemically synthesized polysulfates against a variety of enveloped viruses, such as herpes simplex virus type 1 (HSV-1) and 2 (HSV-2), human immunodeficiency virus (HIV), human cytomegalovirus, respiratory syncytial virus and influenza virus, has been reported [1,2].

At present, the availability of safe and potent antiviral agents against herpesviruses is far from ideal. Acyclovir (ACV) is the compound of choice for clinical use against HSV-1 and HSV-2, in systemic or topical therapy [3]. Other ACV-related nucleoside analogs, all targeted against viral DNA synthesis, have been more recently licensed for human use [4]. However, the emergence of viral resistant variants

after prolonged treatment in immunocompromised patients is one of the main reasons for the continuous search of novel antiherpetic agents. In this context, the mentioned sulfated polysaccharides represent an interesting type of compounds to pursue as promising virus inhibitors.

Red seaweeds contain large amounts of polysaccharides, and sulfated galactans represent the main matrix polysaccharide. They consist of linear chains of alternating 3-linked β-D-galactopyranosyl residues (A units) and 4-linked α-galactopyranosyl (or 3,6-anhydrogalactosyl) residues (B units). The latter residues are from the D-series in the case of carrageenans and L-series for agarans, and with D- and L-galactose interspersed on the same molecule in the DL-galactan hybrids [5,6]. These structures are usually substituted with sulfate esters, pyruvic acid ketals, methoxyl groups and may have different degrees and kinds of branching [5].

Previous reports have described the effective inhibitory action of this type of natural polysulfates against HSV-1, HSV-2 and HIV [7–14].

This study presents the chemical composition and in vitro and in vivo antiherpetic properties of sulfated galac-

* Corresponding author. Fax: +54-11-4576-3342.

E-mail address: edamonte@qb.fcen.uba.ar (E.B. Damonte).

† L.B.T., R.G.M.Z. and P.C.S.F. contributed equally to this paper.

tan crude extracts and main fractions obtained after exchange chromatography from two red seaweeds collected in Brazil, *Gymnogongrus griffithsiae* and *Cryptonemia crenulata*.

2. Materials and methods

2.1. Extraction and fractionation of polysaccharides

G. griffithsiae (Turner) Martius was collected in Caiobá, Paraná State, Brazil, and *C. crenulata* (J. Agardh) J. Agardh was obtained at Cupe's beach, Pernambuco State, Brazil. A voucher of each specimen has been deposited in the herbarium of Departamento de Botânica, Universidade Federal do Paraná, with the herbarium number UPCB-46433 and 46432, respectively. The samples were washed with running water, sun-dried and milled.

G. griffithsiae was extracted twice with water (3.0% w/v) at 25 °C with mechanical stirring for 16 h. After centrifugation the supernatant was dialyzed, concentrated and freeze-dried to give the crude extracts **G1** and **G2**. The algal residue was submitted to aqueous extraction at 100 °C with mechanical stirring for 2 h, and treated as described above to afford the crude extract **G3**. *C. crenulata* was extracted with water (1.5% w/v) at 25 °C for 5 h, with mechanical stirring, and then twice with phosphate buffer (NaH₂PO₄, 0.025 M, pH 6.5) at 80 °C for 6 h. The extracts obtained at each step were concentrated and lyophilized to produce **C1**, **C2** and **C3**.

G3, **C1** and **C2** were dissolved in water (0.25% w/v) and submitted to KCl fractionation according to Pujol et al. [14]. Solid KCl was added with constant agitation to increase the concentration in steps of 0.1 M to an upper limit of 2.0 M. The precipitates obtained by centrifugation, as well as the material soluble in 2.0 M KCl, were dialyzed sequentially against water, 2.0 M NaCl and water, and freeze-dried. **G3** rendered the fractions **G3a**, **G3b**, **G3c** and **G3d**, precipitated at 0.1, 0.3, 1.0 and 1.2 M KCl, respectively, and **G3s**, soluble in 2.0 M KCl. **C1** and **C2** were treated with KCl in the same way and 94.0% (**C1s**) and 97.5% (**C2s**) were recuperated in the supernatant after addition of 2.0 M KCl whereas the precipitated fractions were discarded.

2.2. Anion-exchange chromatography of **G3S** and **C2S**

A column (30 cm × 4.5 cm) was filled with DEAE-Sephacel and samples from **G3S** and **C2S** were dissolved in water. Fractions were first eluted with water (**G3S-1** and **C2S-1**) and then sequentially with increasing concentrations of NaCl: 0.25 M (**G3S-2**), 0.5 M (**G3S-3**, **C2S-2**), 0.75 M (**G3S-4**), 1.0 M (**G3S-5**, **C2S-3**), 1.5 M (**C2S-4**), 2.0 M (**G3S-6**) and 4.0 M (**G3S-7**). **C2S-2** was refractionated using the same column and elution system with water and increasing concentrations of NaCl: 0.3 M (**C2S-2a**), 0.35 M (**C2S-2b**), 0.45 M (**C2S-2c**), and 1.0 M (**C2S-2d**).

2.3. Analytical methods

Total carbohydrate was estimated by the phenol-sulfuric acid method [15] using D-galactose as standard. Sulfate content was determined by the turbidimetric method of Dodgson and Price [16]. Protein was determined by the method of Lowry et al. [17]. Optical rotations of 0.2% aqueous solution of the polysaccharide samples were measured at 20 °C, using a 10-cm cell and sodium D line (589.3 nm) with a Rudolph Autopol III automatic polarimeter.

2.4. Monosaccharide composition

Monosaccharide composition was determined by the reductive hydrolysis method [18]. Extra reducing agent (*N*-methylmorpholine borane) was used to quantify the sugar components of the galactans from *C. crenulata* [19]. The alditol products of the hydrolysis were acetylated and analysed by GC and GC-MS as alditol acetates. To distinguish between co-eluting derivatives by GC-MS, partially methylated alditol acetates were also generated by hydrolysis in aqueous formic acid (45%) followed by NaBD₄ reduction and acetylation. GC analyses were carried out on a HP-5890 gas-liquid chromatograph equipped with a flame ionization detector (FID), using a fused silica capillary column (30 m × 0.25 mm) coated with DB-225 (Durowax) and eluted isothermally at 210 °C. Nitrogen was used as carrier gas at flow rate of 1 ml/min and a split ratio of 100:1. GC-MS analysis was performed using a Varian 3300 chromatograph and a Finnigan Mat ITD spectrometer, equipped with two different columns, DB-225 or a DB-23. Helium was used as carrier gas at 1 ml/min.

2.5. Spectroscopic analysis

Fourier-transform infrared spectra (FTIR) of the fractions **C2S-3** and **G3d** in the form of KBr pellets were recorded in a Bommen, series MB-100 FTIR spectrophotometer.

For nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy analysis the freeze-dried sample was dissolved in D₂O (30 mg/ml). The NMR spectrum of **G3d** was recorded at 50 °C using a Bruker Avance DRX 400 NMR spectrometer. Chemical shifts are expressed in ppm using acetone as the internal standard at 30.2 ppm.

2.6. Cells and viruses

Vero (African green monkey kidney) cells were grown in Eagle's minimum essential medium (MEM) supplemented with 5% calf serum. For maintenance medium (MM), the serum concentration was reduced to 1.5%.

HSV-1 strain F and HSV-2 strain G were obtained from the American Type Culture Collection (Rockville, USA) and used as reference strains. B2006 was an HSV-1 TK⁻ ACV-resistant strain obtained from Prof. Dr. E. De Clercq (Rega Institute, Belgium). HSV-2 strain MS was provided by

Dr. F. Benencia (Immunochemistry Lab., UBA, Argentina). The syncytial variants of HSV-1 1C3-syn 13-8 and 1C3-syn 14-1 were obtained by serial passage in the presence of the *mu/nu*-carrageenan 1C3 as previously described [20]. Virus stocks were propagated and titrated by plaque formation in Vero cells.

2.7. Cytotoxicity assay

Vero cell viability was measured by the MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide; Sigma-Aldrich) method. Confluent cultures in 96-well plates were exposed to different concentrations of the polysaccharides, with three wells for each concentration, using incubation conditions equivalent to those used in the antiviral assays. Then 10 μ l of MM containing MTT (final concentration 0.5 mg/ml) was added to each well. After 2 h of incubation at 37 °C, the supernatant was removed and 200 μ l of ethanol was added to each well to solubilize the formazan crystals. After vigorous shaking, absorbance was measured in a microplate reader at 595 nm. The cytotoxic concentration 50% (CC₅₀) was calculated as the compound concentration required to reduce cell viability by 50%.

2.8. In vitro antiviral assays

Antiviral activity was evaluated by a virus plaque reduction assay. Vero cell monolayers grown in 24-well plates were infected with about 50 PFU per well in the absence or presence of various concentrations of the compounds. After 1 h of adsorption at 37 °C, residual inoculum was replaced by MM containing 0.7% methylcellulose and the corresponding dose of each compound. Plaques were counted after 2 days of incubation at 37 °C. The inhibitory concentration 50% (IC₅₀) was calculated as the compound concentration required to reduce virus plaques by 50%. All determinations were performed twice and each in duplicate.

To test the effect of the incubation time on the antiviral activity of the sulfated galactans, Vero cells grown in 24-well plates were infected with 50 PFU of HSV-1, strain F, in MM with or without various concentrations of each galactan. After 1 h adsorption at 4 °C, medium containing unadsorbed virus was removed and cell cultures were washed twice with PBS. Then, 0.5 ml of MM with or without compound, containing 0.7% methylcellulose, was added to each well. After 2 days of incubation at 37 °C, virus plaques were counted.

2.9. In vitro virucidal assay

A virus suspension containing 4×10^5 PFU of HSV-1, strain F, was incubated with an equal volume of MM with or without various concentrations of the compounds for 1.5 h at 37 °C. The samples were then diluted in cold MM to determine residual infectivity by plaque formation. The sample dilution effectively reduced the drug concentration to be incubated with the cells at least 100-fold to assess that

titer reduction was only due to cell-free virion inactivation. The virucidal concentration 50% (VC₅₀), defined as the concentration required to inactivate virions by 50%, was then calculated.

2.10. Protection assay in a mouse model of HSV-2 intravaginal infection

Fourty six- to eight-week-old female BALB/c mice were used for a protection assay against vaginal inoculation with HSV-2, strain MS. Prior to virus inoculation, animals were injected subcutaneously with 20 μ l of medroxyprogesterone acetate (Medrosterona; Gador, Argentina), prepared as 25 mg/ml solution in PBS, a treatment known to increase the susceptibility of mice to HSV-2 infection [21]. Five days later, animals were divided in four groups of 10 animals each one: 50 μ l of C2 (8 mg/ml in PBS) were instilled into the vagina of mice from groups 1 and 2, animals from group 3 received 50 μ l of C2 (0.8 mg/ml in PBS), and the group 4 was inoculated with PBS. One minute after receiving C2 or placebo, mice from groups 2–4 were inoculated intravaginally with 1×10^5 PFU of HSV-2, strain MS, whereas the animals in group 1 were inoculated with PBS, as polysaccharide toxicity control. A second dose of C2, at the corresponding concentration, was administered 2 h after PBS (group 1) or HSV-2 (groups 2 and 3) inoculation, whereas group 4 was treated with PBS. Animals were examined for morbidity and mortality during 20 days.

To study virus shedding, samples of vaginal secretions were collected at 3 days post-infection, by washing the vagina with 100 μ l of PBS, and frozen at –70 °C until titration of HSV-2 infectivity by plaque assay.

Data were analysed by using the chi-square method. A *P* value of 0.005 or less was considered significant.

3. Results and discussion

3.1. Extraction, fractionation and chemical characterization of the polysaccharides

Table 1 shows yield, chemical analysis and composition of crude extracts and fractions obtained from *G. griffithiae*. The extraction of water-soluble polysaccharides was carried out at 25 °C (G1–G2) and 100 °C (G3). G3, the major extract, was submitted to gradient KCl precipitation giving rise to four insoluble fractions (G3a–G3d) and the soluble G3S. The galactan G3d was homogeneous by HPSEC-MALLS (data not shown), and contained galactose, 3,6-anhydrogalactose and 6-*O*-methylgalactose. The FTIR spectrum of G3d had strong absorption at 846 and 803 cm^{–1} that are characteristic of 4-sulfated and 2-sulfated ester on galactosyl and 3,6-anhydrogalactosyl residues, respectively. The peak at 930 cm^{–1} confirmed the presence of 3,6-anhydrogalactosyl units [22,23]. The anomeric region of the ¹³C NMR spectrum of G3d showed two major sig-

Table 1

Yields, chemical analysis, specific rotation and monosaccharide composition of polysaccharide fractions obtained from *G. griffithsiae* (G)

Fraction ^a	Yield (%)	Carbohydrate (%)	Sulfate ^b (%)	Protein (%)	[α] _D ²⁰	Monosaccharides (mol %)					
						Gal ^c	AG	4Gal	6Gal	Xyl	Glc
G3	24.0 ^d	55.2	33.1	3.6	+29.2	67.5	25.4	3.7	–	2.1	1.3
G3a	1.5 ^e	39.2	16.1	31.0	n.d.	64.5	15.6	3.0	–	3.3	13.2
G3b	5.5 ^e	52.2	25.5	14.1	n.d.	47.4	13.3	3.2	–	3.4	12.8
G3c	7.0 ^e	54.0	28.3	6.5	n.d.	70.0	30.0	–	–	–	–
G3d	68.6 ^e	52.0	29.4	1.7	+53.0	57.0	41.0	–	2.0	–	–
G3S	17.4 ^e	73.5	9.1	8.7	–75.0	68.4	2.7	14.0	–	10.5	4.4
G3S-1	20.2 ^f	60.0	7.0	3.7	–60.0	66.3	9.1	13.6	–	9.6	1.4
G3S-2	26.9 ^f	47.4	4.2	6.5	–46.0	62.8	–	13.9	3.4	11.2	8.7
G3S-3	24.3 ^f	59.6	12.1	3.3	–50.0	72.9	–	14.0	–	10.8	2.3
G3S-4	8.2 ^f	47.4	10.5	5.3	–46.0	72.0	4.9	10.4	–	9.8	2.9
G3S-5	3.3 ^f	49.8	21.0	6.0	n.d.	88.7	7.3	–	–	4.0	–
G3S-6	9.5 ^f	36.6	35.0	5.3	+40.0	84.6	13.8	–	–	–	1.6
G3S-7	7.6 ^f	29.6	20.6	8.0	–52.0	67.6	13.7	6.8	–	4.6	7.3

(–) Not detected. n.d.: not determined.

^a Fractions are defined in text.^b Expressed as SO₃Na.^c Gal corresponds to galactosyl, AG to 3,6-anhydrogalactosyl, 4Gal to 4-*O*-methylgalactosyl, 6Gal to 6-*O*-methylgalactosyl, Xyl to xylosyl and Glc to glucosyl residues.^d Percentages based on mulled seaweed.^e Percentages based on material recovered from KCl fractionation (79.1%).^f Percentages based on material recovered from anion-exchange chromatography (89.2%).

nals at 101.7 and 91.6 ppm, corresponding to β -D-galactose 4-sulfate linked to 3,6-anhydro- α -D-galactose 2-sulfate. Additionally, the ¹³C NMR spectra showed C1 signals at 94.8 ppm (3,6-anhydro- α -D-galactose) and at 104.3 ppm, corresponding to β -D-galactose 4-sulfate linked to α -D-galactose 2,6-sulfate (97.7 ppm). These results together with the monosaccharide content and high positive specific rotation suggest that **G3d** has a carrageenan type backbone typical of the *kappa/iota/nu*-carrageenans (Fig. 1, la, lb,

llc) [24], which was also observed in other species of the genus *Gymnogongrus* [6,25,26].

Fraction **G3S** showed a negative specific rotation, suggesting principal agaran structures. Galactose, 4-*O*-methylgalactose and xylose were the principal monosaccharide components. **G3S** was fractionated by anion-exchange chromatography on DEAE-Sephacel to give seven fractions (**G3S-1**–**G3S-7**). The fractions **G3S-1**–**G3S-3** (71.4% of total recovery) were mainly composed of galactose, 4-*O*-

Table 2

Yields, chemical analysis, specific rotation and monosaccharide composition of polysaccharide fractions obtained from *C. crenulata* (C)

Fraction ^a	Yield (%)	Carbohydrate (%)	Sulfate ^b (%)	Protein (%)	[α] _D ²⁰	Monosaccharides (mol %)							
						Gal ^c	AG	2AG	4Gal	6Gal	2Gal	Xyl	Glc
C1	4.0 ^d	44.6	22.0	8.4	+71.5	70.7	7.3	5.9	1.4	–	8.9	–	5.8
C2	6.8 ^d	59.3	28.0	4.8	+42.5	66.4	9.5	7.9	1.1	1.6	6.0	–	7.5
C3	1.1 ^d	49.2	42.0	0.9	+32.0	65.0	10.8	8.3	–	2.6	5.9	–	7.4
C1S	94.0 ^e	63.8	26.0	4.5	+25.5	62.7	10.2	7.3	1.7	1.0	7.2	7.4	2.5
C2S	97.5 ^e	63.0	27.7	1.5	+27.0	72.6	9.9	6.4	1.6	–	6.4	3.1	–
C2S-1	3.2 ^f	67.3	20.1	4.8	+11.0	72.8	8.5	6.9	–	1.1	7.5	3.2	–
C2S-2	24.0 ^f	69.2	25.1	1.9	+6.5	71.5	6.3	6.7	–	–	6.2	8.2	1.1
C2S-3	54.2 ^f	61.0	28.3	0.5	+23.5	68.4	15.8	8.6	–	–	4.5	2.7	–
C2S-4	3.3 ^f	69.3	17.5	2.1	+4.0	73.9	9.6	9.5	–	4.6	2.4	–	–
C2S-2d	55.0 ^f	62.0	20.4	1.0	n.d.	76.7	9.0	6.2	–	–	6.2	–	1.9

(–) Not detected. n.d.: not determined.

^a Fractions are defined in text.^b Expressed as SO₃Na.^c Gal corresponds to galactosyl, AG to 3,6-anhydrogalactosyl, 2AG to 3,6-anhydro-2-*O*-methyl-L-galactosyl, 4Gal to 4-*O*-methylgalactosyl, 6Gal to 6-*O*-methylgalactosyl, 2Gal to 2-*O*-methylgalactosyl, Xyl to xylosyl and Glc to glucosyl residues.^d Percentages based on mulled seaweed.^e Percentage based on soluble material recovered using 2 M KCl.^f Percentage based on material recovered from anion-exchange chromatography.

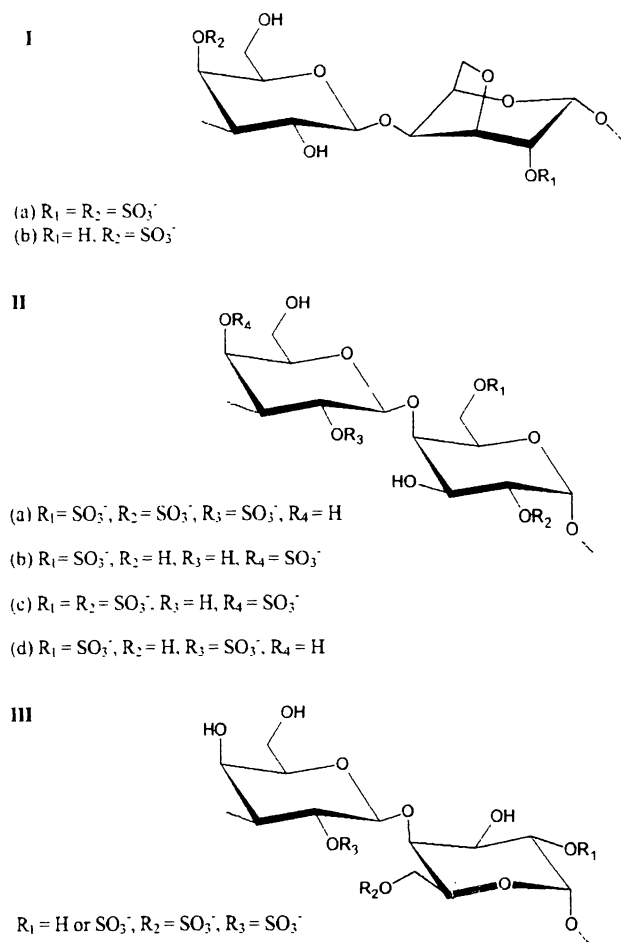


Fig. 1. Schematic representation of the different repeating units of carrageenans and agarans and disaccharide units of galactan sulfates isolated from *G. griffithsiae* and *C. crenulata*. Repeating unit of *iota*- (Ia), *kappa*- (Ib), *lambda*- (IIa), *mu*- (IIb) and *nu*- (IIc) carrageenans. The galactan from *G. griffithsiae* G3d consists of *iota*-, *kappa*- and *nu*-repeating units. The DL-galactan hybrid from *C. crenulata* C2S-3 contains the disaccharide units IIa, IIb and III. The last disaccharide unit is present in the agaran sulfate from *Acanthophora spicifera*.

methylgalactose, xylose and glucose. The major subfractions obtained from G3S had negative specific rotations, except G3S-6, in agreement with the presence of agaran structures (Table 1). Similarly, the soluble fraction isolated from *G. torulosus* was composed of various polysaccharides showing positive (“*kappa*/*iota*-carrageenan” DL-hybrids containing significant amounts of L-galactose) or negative (agaran and agaran DL-hybrids) specific rotations [6].

The yields and chemical properties of galactans isolated from *C. crenulata* are shown in Table 2. This seaweed was extracted with water at 25 °C (C1) and at 80 °C (C2 and C3). C1 and C2 were submitted to a KCl gradient precipitation giving the soluble fractions C1S and C2S. Both fractions showed positive specific rotations, suggesting major carrageenan structures. Fractionation of C2S on DEAE-Sephacel gave four fractions (C2S-1–C2S-4), mainly composed of galactose, 3,6-anhydrogalactose plus its 2-*O*-methyl derivative, and 2-*O*-methylgalactose. The FTIR

spectrum of the C2S-3 fraction showed a peak at 832 cm^{-1} which indicates the presence of equatorial sulfate groups on C-2 of galactosyl residues. A shoulder at $805\text{--}820\text{ cm}^{-1}$ suggests the presence of 3,6-anhydrogalactosyl residues 2-sulfated and sulfate group on C-6 of galactosyl residues. The characteristic absorption of 3,6-anhydrogalactosyl units (932 cm^{-1}) was also observed [22,23]. HPSEC-MALLS analysis (data not shown) demonstrated that C2S-3 is a homogeneous fraction. These results, together with the low positive value of the specific rotation ($+23^\circ$), are in agreement with the presence of both agaran (Fig. 1, III) and carrageenan (Fig. 1, IIa, IIb) chains, suggesting that C2S-3 is a DL-hybrid galactan [27] as observed in species of various families [26,28] including Halymeniaceae [29]. The results obtained for galactan C2S-3 are strikingly different from those previously presented [30].

Further purification of C2S-2 on DEAE-Sephacel yielded a major fraction C2S-2d composed of galactose, 3,6-anhydrogalactose, 3,6-anhydro-2-*O*-methylgalactose, 2-*O*-methylgalactose and glucose (Table 2). Xylose was not detected in this purified product.

3.2. Cytotoxicity and in vitro antiherpetic activity

The crude extracts as well as the *kappa*/*iota*/*nu*-carrageenan, DL-galactan hybrid and other main products, in yield, obtained from *G. griffithsiae* and *C. crenulata* were initially evaluated for cytotoxicity by assessing their effects on cell viability. No effect on cell viability was observed with any of these compounds at concentrations up to $1000\text{ }\mu\text{g/ml}$ (Table 3).

Thereafter, the compounds were screened for antiviral activity against HSV-1 strain F by a virus plaque reduction assay. Dextran sulfate and heparin were used as reference substances. As shown in Table 3, most tested products exhibited antiherpetic activity. The initial polysaccharide mixtures of the aqueous extracts of both seaweeds (G3, C1, C2 and C3) were very active against HSV-1 with IC_{50} values in the range $0.5\text{--}2.5\text{ }\mu\text{g/ml}$. After fractionation with KCl, a similar level of antiviral activity was retained in the heterogeneous soluble fractions (G3S, C1S and C2S) as well as in the pure insoluble *kappa*/*iota*/*nu*-carrageenan (G3d). In the last case, only the insoluble fraction of *G. griffithsiae* was tested for biological activity because the yield of the insoluble product obtained from *C. crenulata* was very low. By DEAE-Sephacel chromatography of the soluble fraction G3S of *G. griffithsiae*, four active galactans (G3S-1, G3S-4, G3S-5, and G3S-6) were obtained with antiviral efficacy at concentrations similar to G3S, whereas in the case of *C. crenulata* two active galactans (C2S-3 and C2S-2) were isolated. The compound C2S-2d, obtained by further purification of C2S-2, showed a lower IC_{50} than the precedent fraction.

In general, the most active galactans extracted from *C. crenulata* exhibited a more effective antiviral action and

Table 3

Anti-HSV-1 activity and cytotoxicity of the sulfated galactans isolated from *G. griffithsiae* (G) and *C. crenulata* (C)

Fractions	CC ₅₀ ^a (μg/ml)	IC ₅₀ ^b (μg/ml)	SI ^c	VC ₅₀ ^d (μg/ml)
G3	>1000	1.1	>909	8.5
G3S	>1000	4.3	>233	>20
G3d	>1000	1.0	>1000	>20
G3S-1	>1000	4.1	>244	n.d.
G3S-2	>1000	>200	Inactive	n.d.
G3S-3	>1000	100	>10	n.d.
G3S-4	>1000	2.4	>417	n.d.
G3S-5	>1000	5.6	>179	n.d.
G3S-6	>1000	2.2	>455	>20
G3S-7	>1000	>200	Inactive	n.d.
C1	>1000	2.5	>400	n.d.
C2	>1000	0.5	>2000	>20
C3	>1000	1.0	>962	n.d.
C1S	>1000	0.8	>1250	>20
C2S	>1000	0.9	>1111	n.d.
C2S-2	>1000	2.8	>357	n.d.
C2S-3	>1000	0.5	>2000	>20
C2S-2d	>1000	1.0	>1000	>20
Heparin	>1000	3.0	>333	>20
DS8000	>1000	2.8	>357	n.d.

Data are the average of duplicate assays, n.d.: not determined.

^a 50% Cytotoxic concentration, or concentration required to reduce by 50% the number of viable Vero cells after 48 h of incubation with the fractions.

^b 50% Inhibitory concentration, or concentration required to reduce plaque number in Vero cells by 50%.

^c Selectivity index or ratio CC₅₀/IC₅₀.

^d 50% Virucidal concentration, or concentration required to inactivate virions by 50% after 1.5 h of incubation with the fractions.

higher selectivity indices than the reference compounds heparin and dextran sulfate, whereas for *G. griffithsiae* the differences in effectiveness were not so notorious, with the exception of G3 and G3d.

It has been reported that an increasing antiviral activity of polysulfates is related to an increasing degree of sulfation [1,2]. In our case, although G3d and C2S-3 fractions have high content of sulfate groups (Tables 1 and 2) and high antiherpetic activity (Table 3), other galactans with similar degree of sulfation, as G3S-6 or C2S-2, are less active whereas the fractions G3S-1–G3S-4, with lower amount of sulfate groups, were inactive or with very low antiviral effect. Therefore, other structural factors, such as the degree of polymerization and the position of sulfate groups on the polymer backbone, could be also correlated with the antiviral activity.

Despite the differences in the position of the sulfate groups on β-D-galactose residues, C-4 in G3d and C-2 in C2S-3, in both fractions this unit is linked to α-D-galactose 2,6-sulfate (Fig. 1, IIc and IIa, respectively). Additionally, in C2S-3 there are links to α-D- and α-L-galactose 6-sulfate (Fig. 1, IId and III) and to α-L-galactose 2,6-sulfate (Fig. 1, III). Antiherpetic activity of *kappa/iota*, partially cyclized *mu/nu*- and *lambda*-carrageenans (Fig. 1, Ib/Ia, IIb/IIc and IIa, respectively) from *Gigartina skottsbergii* was directly correlated to the content of α-D-galactose 2,6-sulfate residues [11]. The

presence of β-D-galactose 2-sulfate linked to α-L-galactose 6-sulfate (Fig. 1, III) in agarans from *Acanthophora spicifera* [31] is structurally analog to the minimal binding sequence necessary for the interaction of heparan sulfate with the glycoprotein gC of HSV-1 [32], and therefore, it may be responsible for the antiherpetic activity of these polysaccharides. Considering that structurally different galactan sulfates from marine algae display similar antiherpetic activity, the derivation from the original polymers of oligosaccharides with variable degree of polymerization may be a useful tool to provide new information to fully elucidate the structure–activity relationship.

The most active galactans representative of each step of the extraction and purification procedure for both seaweeds (G3, G3S, G3d and G3S-6 from *G. griffithsiae* and C2, C1S, C2S-3 and C2S-2d from *C. crenulata*) were chosen for further characterization. The spectrum of antiherpetic activity of these galactans was evaluated (Table 4). All the compounds were effective inhibitors against B-2006, a TK[−] strain of HSV-1 resistant to ACV, with IC₅₀ values in a range similar to those observed against the reference F strain. Two strains of the other serotype, HSV-2, were also screened for susceptibility to the galactans by the plaque reduction assay. As can be seen in Table 4, IC₅₀ values found against HSV-2 strain G were comparable to those obtained against HSV-1, whereas the MS strain of HSV-2 was found to be significantly more susceptible to the inhibitory action of the galactans, and to a lesser extent, to dextran sulfate and heparin. The inhibitory effect of the galactans was also assayed against the syncytial variants of HSV-1 IC3-syn 13-8 and IC3-syn 14-1, isolated after serial passages in Vero cells of HSV-1 strain F in the presence of the antiviral carrageenan 1C3 [20]. These two variants acquired the syncytial phenotype with large plaque size after the continuous selective pressure exerted by the carrageenan but differed in their susceptibility to 1C3: IC3-syn 13-8 was as sensitive to 1C3 as the parental F strain, but IC3-syn 14-1 showed a partial level of resistance exhibiting an IC₅₀ 10-fold higher than the value obtained with the original virus [20]. As seen in Table 4, the behavior of the galactans isolated from *G. griffithsiae* and *C. crenulata* against these two syncytial variants was similar to that described for 1C3.

Polyanionic compounds might be expected to interact with the positively charged amino acids in the surface proteins of virus envelope [1]. In our system, the interaction between sulfated galactans and the external glycoprotein of HSV may lead to virus inactivation and/or blockade in virion binding to cell receptor during adsorption, the first step of the replicative cycle. To elucidate these two possibilities, a virucidal assay against HSV-1 was first carried out. Seven galactans were unable to inactivate HSV-1 virions at concentrations up to 20 μg/ml, and the remaining tested product, G3, showed a very weak virucidal effect with a VC₅₀ highly exceeding the corresponding antiviral IC₅₀, 8.5 μg/ml versus 1.1 μg/ml (Table 3). Thus, we can conclude that these sulfated compounds do not produce virion inactivation.

Table 4

Spectrum of antiherpetic activity of the sulfated galactans from *G. griffithsiae* (G) and *C. crenulata* (C)

Fractions	IC ₅₀ ^a (μg/ml)				
	HSV-1 B 2006	HSV-1 IC3-syn 13-8	HSV-1 IC3-syn 14-1	HSV-2 G	HSV-2 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
C2	0.5	1.0	5.2	1.1	0.3
C1S	1.7	1.1	18	0.9	0.2
C2S-3	1.1	0.7	11.7	1.9	0.2
C2S-2d	1.1	1.0	10	4.5	0.3
Heparin	1.6	1.1	12.3	1.8	0.6
DS8000	2.1	0.9	15	2.5	0.6

Data are the average of duplicate assays.

^a 50% Inhibitory concentration, or concentration required to reduce plaque number in Vero cells by 50%.

Next, the inhibitory effect of the galactans on virus adsorption was studied performing a virus plaque reduction assay under different treatment conditions. When the antiviral assay was performed omitting the presence of the galactans in the adsorption period and including the compounds only in the plaquing medium after adsorption, no significant reduction in the number of virus plaques was detected, even at a high concentration of 10 μg/ml (Table 5). By contrast, the presence of the galactans only at virus adsorption was as effective as the treatment throughout the whole incubation period, at and after adsorption (Table 5), indicating that HSV adsorption is the main target for the antiviral effect of these polysaccharides. Both serotypes of HSV use the heparan sulfate residues of cellular proteoglycans as the primary receptor for virion binding and adsorption [33,34], and thus, the sulfated galactans seem to mainly interfere with the interaction virion glycoprotein-heparan sulfate.

3.3. In vivo antiherpetic activity

The in vivo efficacy of these algal compounds was evaluated in a murine model of vaginal infection with HSV-2,

strain MS. To this end, the crude galactan preparation from *C. crenulata* C2 was chosen to be tested since it was very active in vitro and was available in considerable amount. Given the polymeric structure and the mode of antiviral action of the galactans above demonstrated, preventing HSV entry to the host cell, a topical prophylactic use of the compound was assayed, treating the animals with a dose of compound before infection and then a second dose after infection. Results obtained are shown in Table 6. No irritation or toxicity was observed in C2-treated animals (group 1). BALB/c mice inoculated with 10⁵ PFU of HSV-2 developed vulvovaginal lesions, starting at day 4–5 after infection with redness, then swelling and hair loss, some animals showed hind limb paralysis and, finally, all mice died between 7 and 14 days post-infection (group 4). All animals shed virus in vaginal secretions at high infectious titers, in the range 10³ to 10⁵ PFU/ml. When animals were treated with C2 at a concentration of 8 mg/ml, a highly significant level of protection was observed in comparison with infected untreated mice (30% mortality in group 2 versus 100% mortality in group 4, *P* < 0.005), associated to a lower virus shedding and a delay in the mean day of death. The level of protection was reduced when a 10-fold lower concentration of compound

Table 5

Influence of various drug treatment periods on the anti-HSV-1 activity of galactans from *G. griffithsiae* (G) and *C. crenulata* (C)

Fractions	IC ₅₀ ^a (μg/ml)		
	During virus adsorption	After virus adsorption	During and after virus adsorption
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
C2	1.0	>10	0.9
C1S	0.8	>10	1.3
C2S-3	0.5	>10	0.8
C2S-2d	1.0	>10	1.5

^a 50% Inhibitory concentration, or concentration required to reduce plaque number by 50%. Vero cells were infected with 50 PFU of HSV-1 in the absence or in the presence of the compounds. After 1 h of virus adsorption at 4°C, unadsorbed virus and the compounds were removed. The cells were overlaid with MM containing 0.7% methylcellulose with or without the compounds and further incubated at 37°C for 2 days. Each value represents the mean of duplicate assays.

Table 6

Effect of C2 treatment on vaginal mouse infection with HSV-2

Group	Treatment ^a	Mortality		Virus shedding ^b (PFU/ml)
		Number of dead mice/total (%)	Mean day of death $\pm$ S.D.	
1	C2 (8 mg/ml) (–1 min) PBS (0 min)	0/10 (0)	–	–
2	C2 (8 mg/ml) (+2 h) C2 (8 mg/ml) (–1 min) HSV-2 (0 min)	3/10 (30) ^c	12.3 $\pm$ 0.6	<10 ² to 6.6 $\times$ 10 ⁴
3	C2 (8 mg/ml) (+2 h) C2 (0.8 mg/ml) (–1 min) HSV-2 (0 min)	8/10 (80)	10.8 $\pm$ 2.3	1.4 $\times$ 10 ³ to 7.8 $\times$ 10 ⁴
4	C2 (0.8 mg/ml) (+2 h) PBS (–1 min) HSV-2 (0 min) PBS (+2 h)	10/10 (100)	9.7 $\pm$ 1.8	1.4 $\times$ 10 ³ to 1.2 $\times$ 10 ⁵

^a BALB/c mice were intravaginally inoculated with PBS (group 1) or 10⁵ PFU of HSV-2 (groups 2–4) at time 0. Doses of 50 μ l of PBS or C2 (8 or 0.8 mg/ml solution) were instilled into the vagina at the indicated times pre- (–) or post-infection (+). Animals were monitored daily for morbidity and mortality.

^b Vaginal lavages were collected at day 3 post-infection and titrated by plaque formation on Vero cells. Results are expressed as the range of virus titers for individual mice in each group.

^c $P < 0.005$.

was administered (group 3), confirming the dose-dependent in vivo antiviral activity of C2.

4. Conclusions

The results presented here allow to conclude that both *G. griffithsiae* and *C. crenulata* represent an interesting source of carrageenans and/or DL-hybrid galactans with selective and potent antiviral action against reference strains, syncytial variants and ACV-resistant strains of HSV-1 and HSV-2. Most of the eighteen tested products, including homogeneous *kappa/iota/nu* carrageenan and DL-galactan hybrid, exhibited in vitro antiherpetic activity with IC₅₀ values in the range 0.5–5.6 μ g/ml, and lacking cytotoxicity.

The crude galactan preparation C2, obtained from *C. crenulata*, showed also a significant protective effect in vivo against HSV-2 vaginal infection in a murine model, suggesting the potential use of this low cost product, easy to obtain in large quantities, for prophylaxis of virus infection. Considering the characteristic of herpetic infections as a sexually transmitted disease, there is a real need for safe topical agents to reduce the spread of infection [35–37]. These preliminary in vivo results are encouraging to further assay topical formulations of the algal extract in a gel vehicle to prolong the presence of the active agent in the vagina and improve its efficacy.

Acknowledgements

This work was supported by Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica, Universidad de Buenos Aires, (Argentina) and PRONEX-Carbohidratos (CNPq, Brasil). The authors are indebted to Dra. Silvia Maria Pita

de Beuclair Guimarães (Instituto de Botânica de São Paulo, Brasil) for sorting the seaweed material. LBT is fellow from CONICET (Argentina), EBD is member of Research Career from the same institution. RGMZ is fellow from CAPES, PCSF from CNPq and MDN is Research Member from CNPq (Brasil).

References

- [1] Witvrouw M, Desmyter J, De Clercq E. *Antiviral Chem Chemother* 1994;5:345.
- [2] Witvrouw M, De Clercq E. *Gen Pharmacol* 1997;29:497.
- [3] Whitley RJ, Roizman B. *Lancet* 2001;357:1513.
- [4] De Clercq E. *Nat Rev* 2002;11:13.
- [5] Painter TJ. In: Aspinall GO, editor. *The polysaccharides*. vol. 2. Academic Press; 1983. p. 195.
- [6] Estevez JM, Ciancia M, Cerezo AS. *Carbohydr Res* 2001;331:27.
- [7] Bourgognon N, Lahaye M, Chermann JC, Kornprobst JM. *Bioorg Med Chem Lett* 1993;3:1141.
- [8] Witvrouw M, Esté JA, Mateu MQ, Reyman D, Andrei G, Snoeck R, et al. *Antiviral Chem Chemother* 1994;5:297.
- [9] Damonte EB, Matulewicz MC, Cerezo AS, Coto CE. *Chemotherapy* 1996;42:57.
- [10] Pujol CA, Errea MI, Matulewicz MC, Damonte EB. *Phytother Res* 1996;10:410.
- [11] Carlucci MJ, Pujol CA, Ciancia M, Nosedá MD, Matulewicz MC, Damonte EB, et al. *Int J Biol Macromol* 1997;20:97.
- [12] Haslin C, Lahaye M, Pellegrini M, Chermann JC. *Planta Med* 2001;67:301.
- [13] Duarte MER, Nosedá DG, Nosedá MD, Tulio S, Pujol CA, Damonte EB. *Phytomedicine* 2001;8:53.
- [14] Pujol CA, Estévez J, Carlucci MJ, Ciancia M, Cerezo A, Damonte EB. *Antiviral Chem Chemother* 2002;13:83.
- [15] Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. *Anal Chem* 1956;28:350.
- [16] Dodgson KS, Price RG. *Biochem J* 1962;84:106.
- [17] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. *J Biol Chem* 1951;193:265.

- [18] Stevenson T, Furneaux R. *Carbohydr Res* 1991;210:277.
- [19] Falshaw R, Furneaux RH. *Carbohydr Res* 1994;252:171.
- [20] Carlucci MJ, Scolaro LA, Damonte EB. *J Med Virol* 2002;68:92.
- [21] Parr MB, Kepple L, McDermott MR, Drew MD, Bozzola JJ, Parr EL. *Lab Invest* 1994;70:369.
- [22] Stancioff DJ, Stanley NF. *Proc Int Symp* 1969;6:595.
- [23] Craige JS, Cole KM, Sheath RG. *Biology of the red algae*. Cambridge University Press; 1990. p. 221.
- [24] Faria PCS, Nosedá MD, Ciancia M, Duarte MER. *European Carbohydrate Symposium XI, Lisboa*; 2001. p. 321.
- [25] Furneaux RH, Miller IJ. *Bot Mar* 1985;28:419.
- [26] Chopin T, Kerin BF, Mazerolle R. *Phycol Res* 1999;46:167.
- [27] Duarte MER, Zibetti RGM, Ciancia M, Nosedá MD. *International Seaweed Symposium XVII, Cape Town*; 2001. p. 133.
- [28] Chopin T, Hanisak MD, Craigie JS. *Bot Mar* 1994;37:433.
- [29] Miller IJ, Falshaw R, Furneaux RH. *Carbohydr Res* 1995;268:219.
- [30] Saito RM, Oliveira EC. *Hydrobiologia* 1990;204(20):585.
- [31] Duarte MER, Cauduro JP, Nosedá DG, Nosedá MD, Gonçalves AG, Pujol CA, et al. *Carbohydr Res* 2004;339:335.
- [32] Feyzi E, Trybala E, Bergström T, Lindahl U, Spillmann D. *J Biol Chem* 1997;272:24850.
- [33] WuDunn D, Spear PG. *J Virol* 1989;63:52.
- [34] Tal-Singer R, Peng C, Ponce de León M, Abrams WR, Banfield BW, Tufar F, et al. *J Virol* 1995;69:4471.
- [35] Piret J, Lamontagne J, Bestman-Smith J, Roy S, Gourde P, Desormeaux A, et al. *J Clin Microbiol* 2000;38:110.
- [36] Bourne N, Stanberry LR, Kern ER, Holan G, Mathews B, Bernstein DI. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:2471.
- [37] Herold BC, Scordi-Bello I, Cheschenko N, Marcellino D, Dzuzelewski M, Francois F. *J Virol* 2002;76:11236.



The antiviral activity of sulfated polysaccharides against dengue virus is dependent on virus serotype and host cell

L.B. Talarico^a, C.A. Pujol^a, R.G.M. Zibetti^b, P.C.S. Faria^b, M.D. Nosedá^b,
M.E.R. Duarte^b, E.B. Damonte^{a,*}

^a *Laboratorio de Virología, Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina*

^b *Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad Federal de Paraná, Curitiba, Brazil*

Received 8 September 2004; accepted 2 February 2005

Abstract

Two homogeneous sulfated polysaccharides obtained from the red seaweeds *Gymnogongrus griffithsiae* and *Cryptonemia crenulata*, the kappa/iota/nu carrageenan *G3d* and the DL-galactan hybrid *C2S-3*, were assayed for their antiviral properties against the four serotypes of dengue virus (DENV) in different host cell types. Both seaweed derivatives were selective inhibitors of DENV-2 multiplication in Vero cells with inhibitory concentration 50% (IC₅₀) values around 1 µg/ml and selectivity indices >1000. The compounds had a lower antiviral effect against DENV-3 (IC₅₀ values in the range 13.9–14.2 µg/ml), an even lower effect against DENV-4 (IC₅₀ values in the range 29.3 to >50 µg/ml) and were totally inactive against DENV-1. With respect to the host cell, the polysulfates were inhibitors of DENV-2 and DENV-3 in the human hepatoma HepG2 and foreskin PH cells, with similar antiviral effectiveness as in Vero cells, but were totally inactive in mosquito C6/36 HT cells. Mechanistic studies demonstrated that *G3d* and *C2S-3* were active DENV-2 inhibitors only when added together with the virus or early after infection, and both initial processes of virus adsorption and internalization are the main targets of these compounds. Therefore, the variations in antiviral activity of the polysaccharides depending on the viral serotype and the host cell may be ascribed to differences in the virus-cell interaction leading to virus entry.

© 2005 Published by Elsevier B.V.

Keywords: Dengue virus; Flaviviruses; Antiviral activity; Sulfated polysaccharides; Viral entry

1. Introduction

Flavivirus is a genus of the family *Flaviviridae* composed by nearly 80 members. Many flaviviruses are arthropod-borne viruses that cause important human diseases, including yellow fever virus (YFV), dengue virus (DENV), West Nile virus (WNV) and Japanese encephalitis virus (JEV) (Lindenbach and Rice, 2001). In particular, DENV has re-emerged in recent years as an increasingly important public health threat affecting more than 100 countries worldwide, with nearly 50

million infections each year and over 2.5 billion people at risk (Gubler, 2002).

DENV circulates in nature as four serotypes (DENV-1 to DENV-4), which are transmitted to humans by two species of mosquitoes, *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. Infection with DENV produces a wide spectrum of clinical illness ranging from silent infection to either a mild febrile, self-limited acute syndrome known as dengue fever (DF) or the severe and often fatal dengue hemorrhagic disease (DHF) and dengue shock syndrome (DSS). Instead of the increasing global incidence of DF and DHF occurred in the last decades, there is neither specific chemotherapy nor vaccine for treatment and prevention of DENV infection. Supportive medical care and symptomatic treatment through hydration are the most important aids to patients and to improve survival in the severe forms of disease. Consequently, new

* Corresponding author. Present address: Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Ciudad Universitaria, Pabellón 2, Piso 4, 1428 Buenos Aires, Argentina. Tel.: +54 11 4576 3342; fax: +54 11 4576 3342.

E-mail address: edamonte@qb.fcen.uba.ar (E.B. Damonte).

approaches for the control of DENV infection are urgently needed.

The enveloped DENV virions contain a single-stranded, positive sense RNA that is translated as a single polypeptide and cleaved into three structural proteins, capsid (C), membrane (M) and envelope (E), and seven non-structural proteins. The viral replicative cycle starts with the attachment of virus to the surface of the host cell. The blockade of virus binding is a valuable antiviral strategy because it allows to establish a first barrier to suppress infection. Although the identity of the cellular receptor for DENV is at present controversial, several reports have shown that the glycosaminoglycan heparan sulfate (HS) is involved in the initial binding of glycoprotein E to host cells for DENV attachment (Chen et al., 1997; Hung et al., 1999; Hilgard and Stockert, 2000; Germi et al., 2002). Many diverse viruses have been shown to interact with HS for target cell binding (Spillmann, 2001), but the DENV interaction is unusual for its specificity for a highly sulfated form of HS (Chen et al., 1997).

Based on this putative receptor role of HS for DENV, other charged polyanions could be effective inhibitors of viral infectivity. We have previously reported that novel DL-galactan hybrids can inhibit DENV-2 replication in Vero cells (Pujol et al., 2002). In the present study, diverse natural sulfated polysaccharides isolated from the red seaweeds *Gymnogongrus griffithsiae* and *Cryptonemia crenulata* were assayed for their antiviral action against the four serotypes of DENV in Vero cells, and also their effectiveness in human and mosquito cells was comparatively evaluated.

2. Materials and methods

2.1. Compounds

The extraction and purification of the polysaccharides from *G. griffithsiae* and *C. crenulata*, two red seaweeds collected in Brazil, were previously described (Talarico et al., 2004). The crude polysaccharide extracts G3 and C2, obtained from *G. griffithsiae* and *C. crenulata*, respectively, and two homogeneous compounds, the kappa/iota/nu carrageenan G3d and the DL-galactan hybrid C2S-3, obtained by KCl fractionation and DEAE-Sephacell chromatography from G3 and C2, respectively, were assayed for anti-DENV activity.

Two commercial products, dextran sulfate with an average molecular weight of 8000 (DS8000) and heparin (Sigma–Aldrich Co.), were also tested for antiviral activity.

2.2. Cells and viruses

Vero (African green monkey kidney) (ATCC) cells were grown in Eagle's minimum essential medium (MEM) (GIBCO) supplemented with 5% calf serum. For maintenance medium (MM), the serum concentration was reduced to 1.5%. The human diploid foreskin fibroblast cell line PH

was obtained from Dr. G. Carballal (CEMIC, Buenos Aires, Argentina) and propagated in MEM supplemented with 10% fetal calf serum. The C6/36 HT mosquito cell line from *Aedes albopictus* (adapted to grow at 33 °C) was provided by the Instituto Nacional de Enfermedades Virales Humanas (INEVH) Dr. J. Maiztegui (Pergamino, Argentina) and cultured in L-15 Medium (Leibovitz) supplemented with 0.3% tryptose phosphate broth, 0.02% glutamine, 1% MEM non-essential amino acids solution and 5% fetal calf serum. The human hepatoma cell line HepG2 was obtained from Cátedra de Virología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires (Buenos Aires, Argentina) and propagated in MEM containing 0.03% glutamine, 0.01% sodium pyruvate and 10% fetal calf serum.

DENV-1 strain Hawaii was obtained from INEVH. DENV-2 strain NGC, DENV-3 strain H87 and DENV-4 strain 8124 were provided by Dr. A.S. Mistchenko (Hospital de Niños Dr. Ricardo Gutiérrez, Buenos Aires, Argentina). Virus stocks were prepared in C6/36 HT cells and titrated by plaque formation in Vero cells.

2.3. Cytotoxicity assay

Cell viability was measured by the MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide, Sigma–Aldrich) method. Confluent cultures in 96-well plates were exposed to different concentrations of the polysaccharides, with three wells for each concentration, using incubation conditions equivalent to those used in the antiviral assays. Then 10 µl of MM containing MTT (final concentration 0.5 mg/ml) was added to each well. After 2 h of incubation at 37 °C, the supernatant was removed and 200 µl of ethanol was added to each well to solubilize the formazan crystals. After vigorous shaking, absorbance was measured in a microplate reader at 595 nm. The cytotoxic concentration 50% (CC₅₀) was calculated as the compound concentration required to reduce cell viability by 50%.

2.4. Antiviral assays

Antiviral activity was evaluated by two methods: plaque reduction and virus yield inhibition assays. In the plaque reduction test, Vero cell monolayers grown in 24-well plates were infected with about 50 PFU/well in the absence or presence of various concentrations of the compounds. After 1 h of virus adsorption at 37 °C, residual inoculum was replaced by MM containing 1% methylcellulose and the corresponding dose of each compound. Plaques were counted after 6–12 days of incubation at 37 °C, according to virus serotype. The inhibitory concentration 50% (IC₅₀) was calculated as the compound concentration required to reduce virus plaques by 50%. All determinations were performed twice and each in duplicate.

In virus yield reduction assays, Vero, HepG2, PH, and C6/36 HT cells grown in 24-well plates were infected with DENV-2 or DENV-3 at a multiplicity of infection (moi) of 0.1

in the presence of different concentrations of the compounds, two wells per concentration. After 48 h of incubation at 37 °C (for Vero, HepG2 and PH cells) or 33 °C (for C6/36 HT cells), cell supernatants were collected and the virus yields were determined by plaque formation in Vero cells. The IC₅₀ values were calculated as indicated above.

2.5. Time of addition experiment

To test the effect of the time of addition of the compounds on their anti-DENV-2 activity, Vero cells grown in 24-well plates were infected with 100 PFU of DENV-2 in either MM containing 20 µg/ml of each compound (time 0) or MM without compound. After 1 h adsorption at 4 °C, medium containing unadsorbed virus was removed and cell cultures were washed twice with PBS. Then, MM with compound (20 µg/ml) was added immediately (time 0 and 1 h p.i.) or at various times post infection (from 2 to 10 h p.i.) and incubation was followed at 37 °C until 11 h p.i. At that time, supernatants were discarded, the monolayers were washed with PBS and overlaid with MM containing 1% methylcellulose. DENV-2 plaques were counted at 6 days after infection.

2.6. Assay for virus adsorption

Vero cells grown in 6-well plates were infected with 500 PFU of DENV-2 in the presence or absence of 20 µg/ml of the compounds and incubated for 0, 15, 30 or 60 min at 4 °C. Medium containing unadsorbed virus was then removed, cells were washed twice with PBS and covered with MM containing 1% methylcellulose. Virus plaques were counted after 6 days of incubation at 37 °C.

2.7. Assay for virus internalization

Vero cells grown in 6-well plates were infected with 500 PFU of DENV-2 at 4 °C. After 1 h of virus adsorption, unadsorbed virus was removed and cells were washed with PBS and incubated at 37 °C in the presence or absence of 20 µg/ml of the compounds. At different times post-adsorption (0, 30, 60 and 120 min) cells were washed with PBS and treated with 0.1 ml of citrate buffer (citric acid 40 mM, potassium chloride 10 mM, sodium chloride 135 mM, pH 3) for 1 min to inactivate adsorbed but not internalized virus. Cells were then washed with PBS and covered with MM containing 1%

methylcellulose. Plaques were counted after 6 days of incubation at 37 °C.

3. Results

3.1. Spectrum of anti-DENV activity of the polysaccharides

To study the inhibitory properties against DENV of the polysaccharides from *G. griffithsiae* and *C. crenulata*, the crude extracts *G3* and *C2* obtained from both seaweeds were evaluated as inhibitors of DENV-2 by a plaque reduction assay in Vero cells. As they were found active (data not shown), we then screened the two homogeneous compounds extracted from *G3* and *C2*, the carrageenan *G3d* and the DL-galactan hybrid *C2S-3*, respectively, for antiviral activity against the four DENV serotypes in Vero cells. The purified compounds were chosen to perform the more extensive characterization of anti-DENV activity because they are homogeneous and chemically characterized polysaccharides (Talarico et al., 2004), and consequently, they are more suitable to analyze the interaction with the viral target. Heparin and DS8000, two commercial polysaccharides known for their antiviral properties against several enveloped viruses, were simultaneously tested as reference substances.

As seen in Table 1, the antiviral activity of the sulfated polysaccharides was dependent on the viral serotype. Both natural compounds *G3d* and *C2S-3* inhibited DENV-2 multiplication in Vero cells, with IC₅₀ values in the range 0.9–1 µg/ml, whereas the IC₅₀ values for the reference polysaccharides heparin and DS8000 were 1.9 and 0.9 µg/ml, respectively. No cytotoxicity was observed with any of these polysulfates when cell viability was studied in Vero cell monolayers by MTT method, at concentrations up to 1000 µg/ml, allowing us to estimate the CC₅₀ for all compounds as >1000 µg/ml. Thus, the selectivity index (SI), defined as the CC₅₀/IC₅₀ ratio, was at least >1000 for both algal compounds. Based on these results, *G3d* and *C2S-3* can be considered effective and selective inhibitors of DENV-2.

When the compounds were evaluated against DENV-3, the IC₅₀s against this serotype were approximately 5–20-fold higher than the values corresponding for DENV-2, indicating a lower susceptibility of DENV-3 to the polysulfates. However, the SI of *G3d* and *C2S-3* against DENV-3 multiplication in Vero cells was >70, indicating also a selective

Table 1
Spectrum of anti-DENV activity of sulfated polysaccharides in Vero cells

Compound	IC ₅₀ ^a (µg/ml)			
	DENV-1 HW	DENV-2 NGC	DENV-3 H87	DENV-4 8124
<i>G3d</i>	>50	0.9 ± 0.4	13.9 ± 0.3	>50
<i>C2S-3</i>	>50	1.0 ± 0.3	14.2 ± 3.1	29.3 ± 5.3
Heparin	>50	1.9 ± 0.2	10.8 ± 2.5	>50
DS8000	>50	0.9 ± 0.1	18.3 ± 1.2	31.2 ± 2.4

^a 50% inhibitory concentration. concentration required to reduce plaque number in Vero cells by 50%. Each value represents the mean of duplicate assays ± S.D.

inhibition of this serotype by the compounds. An even lower antiviral effect was observed against DENV-4: the IC_{50} for C2S-3 was 29.3 $\mu\text{g/ml}$ (about 30-fold higher than the IC_{50} against DENV-2) and G3d inhibited DENV-4 replication only by 41% at the maximum concentration tested (50 $\mu\text{g/ml}$); thus, the IC_{50} was $>50 \mu\text{g/ml}$. The behavior of the two reference compounds was similar: DS8000 showed a weak activity (IC_{50} of 31.2 $\mu\text{g/ml}$, approximately 35-fold higher than the IC_{50} of DS8000 against DENV-2) and heparin was inactive. Finally, the compounds were inactive against DENV-1 at the highest concentration tested in the plaque reduction assay ($IC_{50} > 50 \mu\text{g/ml}$); only DS8000 inhibited DENV-1 infection by 46% at 50 $\mu\text{g/ml}$.

The variation in DENV serotype susceptibility to polysaccharides could be due to differences in their growth ability in Vero cells. To test this possibility, the multiplication curves of the four serotypes in Vero cells were studied during a period of 72 h after infection. As shown in Fig. 1, the four serotypes replicated with similar efficiency in Vero cells. Virus yields showed some differences among serotypes during the earliest times, but virus production at 72 h p.i. for the most susceptible serotype was similar to the yield of the polysulfate-resistant serotype, with titers of 3.7×10^6 and 4.0×10^6 PFU/ml for DENV-2 and DENV-1, respectively. Consequently, the differential susceptibility to sulfated polysaccharides could not be attributed to a differential growth ability in Vero cells.

3.2. Anti-DENV activity of polysaccharides in different host cells

It is known that DENV can infect a wide range of different cell types and cell tropism appears directly related to virus pathogenesis (McBride and Bielefeldt-Ohmann, 2000). Although Vero cells are widely used to propagate and detect DENV, they are not representative of the true target tissues in natural infection and consequently, are not totally appropriate for antiviral studies. Thus, the influence of the host

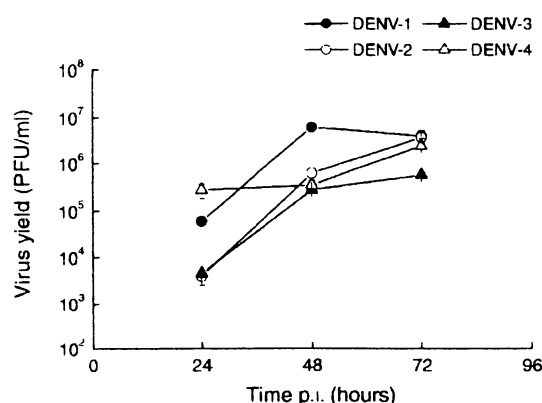


Fig. 1. Growth curves of DENV serotypes in Vero cells. Vero cells were infected with DENV serotypes at a moi of 0.1 and incubated at 37°C. At different times after infection virus yields were determined. Each value represents the mean of duplicate assays $\pm$ S.D.

cell on the inhibition of DENV infection by polysaccharides was analyzed by determining their antiviral action in two human cell lines, PH and HepG2, and in the mosquito cell line C6/36 HT. Due to the difficulties for DENV plaque assays in these cell lines, the antiviral activity was evaluated by a virus yield inhibition test. For these studies, the more susceptible serotypes DENV-2 and DENV-3 were assayed against G3d and C2S-3 as well as against heparin and DS8000.

In the virus yield reduction assay on Vero cells, both serotypes were as sensitive to the antiviral action of the compounds as in the plaque reduction assay, showing IC_{50} values in the range 1.0–3.8 and 4.1–14.7 $\mu\text{g/ml}$ against DENV-2 and DENV-3, respectively (Table 2). Given the higher multiplicity of infection employed in the virus yield reduction assay in comparison with the plaque reduction test (0.1 versus 0.0001), these results demonstrate that the antiviral activity of these polysulfates against DENV-2 and DENV-3 is independent of the input multiplicity of infection. The polysaccharides were effective inhibitors of DENV-2 and DENV-3 in the human HepG2 and PH cells, with an antiviral effect similar to that observed in Vero cells. Furthermore, no cytotoxicity was detected in both human cell lines after exposure to compound concentrations up to 1000 $\mu\text{g/ml}$. Thus, for the seaweed derivatives G3d and C2S-3, the values of SI in human cells against DENV-2 and DENV-3 were in the range >555 to >6250 and >70 to >277 , respectively. These data are indicative of a selective inhibition of both serotypes in human cells with higher antiviral effectiveness against the serotype DENV-2, as described in Vero cells. In contrast, the compounds did not affect the multiplication of both DENV serotypes in mosquito C6/36 HT cells, at concentrations up to 50 $\mu\text{g/ml}$ (Table 2). Again, we assessed that the differential susceptibility of vertebrate and invertebrate cells to the inhibitory action of polysulfates against DENV was not related to their ability to support virus growth, since DENV-2 and DENV-3 yields at 48 h p.i. were around 10^6 PFU/ml in Vero as well as in C6/36 cells (data not shown).

Table 2
Anti-DENV activity of sulfated polysaccharides in Vero, HepG2, PH and C6/36 HT cells

Compound	IC_{50}^a ($\mu\text{g/ml}$)			
	Vero	HepG2	PH	C6/36 HT
DENV-2				
G3d	1.0 ± 0.1	1.8 ± 0.3	0.31 ± 0.01	>50
C2S-3	3.8 ± 0.1	1.4 ± 0.1	0.16 ± 0.01	>50
Heparin	1.6 ± 0.6	6.0 ± 0.4	2.1 ± 0.1	>50
DS8000	1.8 ± 0.2	3.6 ± 0.2	2.4 ± 0.2	>50
DENV-3				
G3d	5.2 ± 0.1	10.4 ± 1.2	9.5 ± 0.7	>50
C2S-3	14.7 ± 2.8	12.6 ± 4.0	3.6 ± 0.3	>50
Heparin	9.7 ± 1.2	6.2 ± 0.3	3.2 ± 0.5	>50
DS8000	4.1 ± 0.5	13.9 ± 1.2	6.3 ± 0.5	>50

^a 50% inhibitory concentration, or concentration required to inhibit virus yield at 48 h p.i. by 50%. Each value represents the mean of duplicate assays $\pm$ S.D.

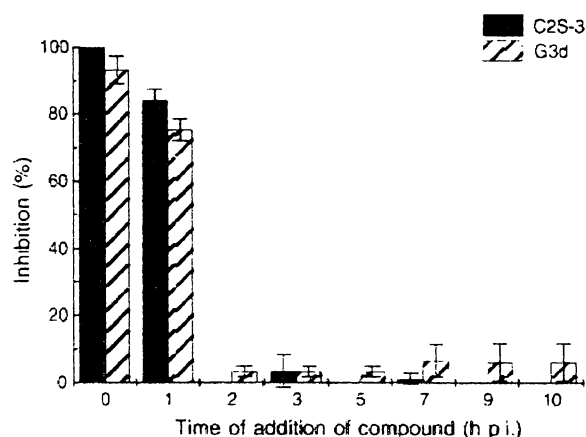


Fig. 2. Influence of time of addition of compounds on anti-DENV-2 activity. Vero cells were infected with 100 PFU of DENV-2 in the presence (0 h p.i.) or absence of 20 μ g/ml of each compound. After 1 h of virus adsorption at 4 °C, cell monolayers were washed, refed with maintenance medium in the presence or absence of compounds and incubated at 37 °C. The polysaccharides were added at different times p.i. (1, 2, 3, 5, 7, 9 and 10 h). At 11 h p.i. medium was discarded and replaced with maintenance medium containing 1% methylcellulose. Each value represents the mean of duplicate assays $\pm$ S.D.

3.3. Influence of time of addition of polysaccharides on anti-DENV-2 infectivity

As an initial approach to understand the differential inhibition of polysaccharides on DENV, according to virus serotype and host cell, the mode of action of these compounds was studied in the system Vero cells-DENV-2. To locate the antiviral target during the virus multiplication cycle, the influence of the time of addition of the compounds C2S-3 and G3d on DENV-2 plaque formation in Vero cells was determined. The polysaccharides were added simultaneously with virus or at 1-h intervals after exposure of cells to virus. As shown in Fig. 2, the highest inhibitory effect was observed when C2S-3 and G3d were added to cells together with the virus (time 0). When added immediately after adsorption at 1 h p.i., polysulfates were also effective inhibitors, reducing virus plaques by more than 80%. By contrast, both compounds were ineffective to produce a significant reduction in DENV-2 plaque formation at later times. These results suggest that virus adsorption is the main target of the polysulfates against DENV-2 in Vero cells, but a very early stage of the virus cycle occurring immediately after adsorption during the first hour of infection, probably virus internalization, seems also to be affected.

3.4. Effect of polysaccharides on virus adsorption and internalization

To ascertain the antiviral action on the early steps of DENV-2 multiplication cycle, the kinetics of virus adsorption in the presence of C2S-3 and G3d was evaluated. Vero cells were incubated with virus and compounds during different times at 4 °C, a condition to assess that virus attach-

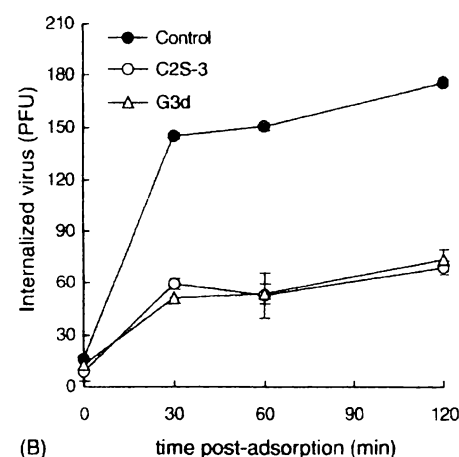
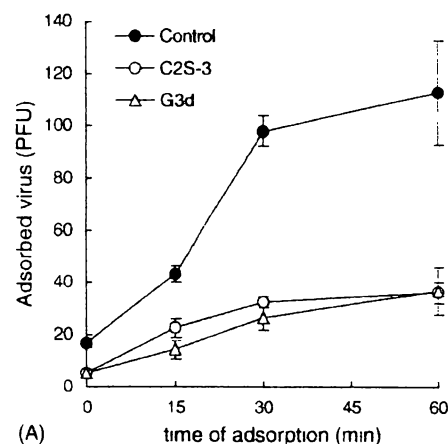


Fig. 3. Effect of compounds on DENV-2 adsorption and internalization kinetics. (A) Vero cells were incubated during 0, 15, 30 and 60 min at 4 °C with DENV-2 in the absence or presence of 20 μ g/ml of each compound. Cells were then washed and refed with MM containing 1% methylcellulose. (B) Vero cells were infected with DENV-2 at 4 °C. After 1 h of virus adsorption, cells were incubated at 37 °C in the absence or presence of 20 μ g/ml of each compound. At different times post-adsorption cells were washed, treated with citrate buffer and covered with MM containing 1% methylcellulose. Each value represents the mean of duplicate assays $\pm$ S.D.

ment to the cell receptor is the only event of the virus cycle that occurs. Results shown in Fig. 3A confirmed that both compounds inhibited virus adsorption since the amount of cell-bound infectious virus was highly diminished in treated cells in comparison to non-treated infected cells.

The inhibitory action of the polysulfates on a subsequent post-adsorption step of the virus cycle was next analyzed, thereby examining the effect of C2S-3 and G3d on the kinetics of virus internalization. To this end, Vero cells were infected with DENV-2 and incubated at 4 °C to allow virus adsorption. Then, the compounds were added to the cell cultures and temperature was raised to 37 °C to start virus penetration. Under these treatment conditions, the amount of internalized virus, measured by determining PFU number after inactivating the extracellular bound but non-penetrated virus with citrate buffer, was significantly reduced in the presence of the polysulfates (Fig. 3B).

Table 3
Influence of treatment period on the anti-DENV-2 activity of galactan C2S-3 in different cells

Period of C2S-3 treatment ^a	Inhibition ^b (%)		
	Vero	HepG2	PH
Virus adsorption	86.8 ± 0.6	82.7 ± 0.1	96.3 ± 1.7
Virus internalization	70.9 ± 4.1	81.8 ± 0.1	92.6 ± 0.1
Virus adsorption and internalization	95.2 ± 1.4	93.2 ± 1.1	100

^a Cells were infected with DENV-2 (moi 0.1) in MM with or without compound (10 µg/ml for PH cells and 20 µg/ml for Vero and HepG2 cells). After adsorption at 4 °C cells were washed, overlaid with MM with or without compound and incubated at 37 °C for 2 h. Cells were then washed, treated with citrate buffer and covered with MM. After 48 h of incubation at 37 °C, virus yields were determined by a plaque assay in Vero cells.

^b Results are expressed as the percent of inhibition in virus yield compared to the untreated control. Each value represents the mean of duplicate assays ± S.D.

The effect of the polysulfates on the events leading to entry of DENV into the host cell was also assessed in human cells. Both PH and HepG2 cells, as well as Vero cells as reference system, were infected with DENV-2 and treated with C2S-3 under different treatment conditions: (a) during the virus adsorption period (1 h at 4 °C) only; (b) during virus internalization (1 h at 37 °C) only; (c) both during virus adsorption and internalization. After each treatment, cell supernatants were discarded and replaced by MM without compound. In all cases, extracellular virus yields were measured at 48 h after infection. In the three cell systems tested, significant antiviral efficacy was obtained if C2S-3 was present either only during DENV-2 adsorption or internalization, and a slight increase of inhibition was observed when the treatment with C2S-3 was extended during the whole period of adsorption and internalization (Table 3).

4. Discussion

Seaweed sulfated polysaccharides have been proved to inhibit the replication of several enveloped DNA and RNA viruses, including severe human pathogens such as retroviruses and herpesviruses among the most susceptible agents (Witvrouw and De Clercq, 1997; Damonte et al., 2004a). The studies reported here have shown that two sulfated polysaccharides extracted from South American red seaweeds, the DL-galactan hybrid C2S-3 and the kappa/iota/nu carrageenan G3d, as well as the commercial compounds heparin and DS8000, were inhibitors of DENV replication, but their effectiveness was variable according to the viral serotype and the type of host cell.

The susceptibility of the four serotypes to the natural polysaccharides in Vero cells was in the order DENV-2 > DENV-3 > DENV-4 > DENV-1. DENV-2 was the most affected serotype, with SI values >1000 which are indicative of a highly selective virus inhibition by these compounds. It is interesting to remark that also a selective antiviral effect

was also exerted by G3d and C2S-3 against DENV-3, with SI values >70 (Table 1). In fact, this is the first report on a selective antiviral inhibition of DENV-3, a serotype which recently reappeared in the Americas, after a prolonged absence, particularly responsible of 2002–2003 dengue outbreaks in Brazil and Argentina (Miagostovich et al., 2002). In contrast, there was a very weak or lack of inhibition against the other two serotypes DENV-4 and DENV-1. In a recent brief communication, Lin et al. (2002) have reported a variable level of inhibition for DENV serotypes by heparin treatment in BHK-21 cells, and the authors suggested a correlation between the suppression effect of heparin on DENV and virus replication in the cells. However, we did not detect significant differences in virus production among DENV serotypes in Vero cells; thus, the variations observed in anti-DENV activity could not be attributed to differences in viral multiplication ability.

With respect to the type of host cell, the polysaccharides were active inhibitors of DENV-2 and DENV-3 multiplication in monkey Vero cells as well as in human hepatoma HepG2 and foreskin PH cells, but were inactive in mosquito C6/36 cells. There were no significant differences in the level of DENV multiplication in these vertebrate and invertebrate cell lines, confirming that differential susceptibility according to virus serotype or host cell is not due to virus growth ability.

Mechanistic studies performed in the three types of vertebrate cells indicated that the compounds were active DENV-2 inhibitors only during the first hour after infection, and the initial events of virus adsorption and internalization seemed to be the main target for these compounds during in vitro infection. When the inhibitory effect of C2S-3 and G3d was separately assayed on both steps of the virus cycle, a comparable level of suppression was observed either for DENV-2 adsorption or internalization (Fig. 3; Table 3). This is a surprising result about the mode of action of polysulfates, since most studies on enveloped viruses have established that polysulfates act by preventing predominantly the first stage of virion binding to cell receptor (Witvrouw and De Clercq, 1997; Damonte et al., 2004a). In fact, our previous study on the anti-herpetic activity of C2S-3 and G3d demonstrated that these compounds were inhibitors of HSV attachment and lacked any subsequent effect (Talarico et al., 2004). Probably, the dissimilar action of these compounds against DENV and HSV may be ascribed to differences in the internalization process between both viruses.

The mechanisms involved in DENV binding and internalization to the host cells are still not well understood. The E glycoprotein is certainly identified as the viral attachment protein (Anderson et al., 1992; Chen et al., 1996). However, the identity of the cellular receptor is at present controversial since both proteins and HS were implicated as candidate molecules. Studies reporting proteins as putative receptors in diverse types of vertebrate and invertebrate cells were described for DENV-2 (Daughaday et al., 1981; Ramos-Castañeda et al., 1997; Muñoz et al., 1998; Moreno-

Altamirano et al., 2002; Bielefeldt-Ohmann, 1998; Wei et al., 2003), DENV-1 (Marianneau et al., 1996) and DENV-4 (Salas-Benito and del Angel, 1997). In contrast, an involvement of HS was demonstrated for attachment of DENV-2 to human hepatocytes, Vero, BHK and CHO cells (Chen et al., 1997; Hung et al., 1999; Hilgard and Stockert, 2000; Germi et al., 2002). The mechanism of DENV internalization is also under discussion: electron-microscopic studies suggested that DENV-2 penetrated directly by fusion of the virion envelope with the plasma membrane (Hase et al., 1989; Lim and Ng, 1999), but it is most generally accepted that viral uptake for productive infection occurs through receptor mediated-endocytosis (Randolph and Stollar, 1990; Heinz et al., 1994; Lindenbach and Rice, 2001). Thus, a plausible mechanism emerging from these conflicting data is a multistep process for DENV entry consisting in the sequential interaction of the E protein with several target molecules on the cell membrane, where HS may be the primary receptor and then other molecules might participate as coreceptors for viral internalization, as suggested by Martínez-Barragán and del Angel (2001). In this context, the variations reported here in antiviral activity of the polysulfates *G3d* and *C2S-3* against DENV may be ascribed to differences in the virus-cell interaction leading to virus entry, as receptor usage or internalization process.

Although the life cycle of DENV presents a series of stages representing potential targets for antiviral drug discovery, the few attempts to find antiviral substances have been mainly focused on the screening of probable RNA synthesis inhibitors, such as ribavirin and other nucleoside analogues (Damonte et al., 2004b). But, the effectiveness of this type of compounds against DENV was very weak and non selective (Koff et al., 1982; Gabrielsen et al., 1992; Markland et al., 2000; Leyssen et al., 2000; Diamond et al., 2002; Crance et al., 2003). Only in recent years, a few studies about potential DENV attachment/entry inhibitors were reported. As mentioned above, heparin was the first polysaccharide shown to be effective to inhibit DENV-2 multiplication in Vero, BHK and human liver cells (Chen et al., 1997; Hung et al., 1999; Germi et al., 2002; Lin et al., 2002) and the minimum size required to occupy the E protein binding site was found to be a heparin-derived decasaccharide (Marks et al., 2001). Other polyanions such as sulfated galactans and polyoxometalates were recently described as inhibitors of DENV-2 multiplication in Vero cells (Pujol et al., 2002; Shigeta et al., 2003). The limitations of the available animal models of DENV infection have restricted the adequate in vivo evaluation of putative antiviral compounds (Charlier et al., 2004). However, two seed sulfated galactomannans with in vitro activity against DENV and YFV were able to protect mice against yellow fever by intraperitoneal inoculation of virus and compounds (Ono et al., 2003), demonstrating that polysulfates are an alternative for flavivirus chemotherapy.

Given their selectivity and antiviral effectiveness in human cells against DENV-2 and DENV-3, the seaweed polysulfates reported in this study deserve consideration as virus entry in-

hibitors. Due to their differential behavior, compounds like *G3d* and *C2S-3* may be useful tools to elucidate the mechanisms of binding and internalization of DENV serotypes to vertebrate and invertebrate cells, and to establish structure-activity relationships. Furthermore, our results illustrate the requirement to evaluate all viral serotypes when putative anti-DENV compounds are studied. DENV-2 is the better adapted virus to grow in vitro, and it is the most routinely used serotype in DENV studies, including antiviral tests.

The four serotypes cocirculate in epidemic regions and it is well known that the reinfection with a different serotype represents an important threat for human health due to the development of severe forms of DHF or DSS. For this reason, it should be required to assay the four serotypes for inhibitory activity, because responses similar to those here presented can be (re)produced with other antiviral substances.

Acknowledgements

This research was supported by grants from Agencia Nacional para la Promoción Científica and Tecnológica, Universidad de Buenos Aires (Argentina), and PRONEX-Carbohidratos (CNPq, Brazil). LBT is fellow from CONICET (Argentina), EBD is a member of Research Career from CONICET, RGMZ is fellow from CAPES, PCSF from CNPq and MDN is Research Member from CNPq (Brazil).

References

- Anderson, R., King, A.D., Innis, B.L., 1992. Correlation of E protein binding with cell susceptibility to dengue 4 virus infection. *J. Gen. Virol.* 73, 2155–2159.
- Bielefeldt-Ohmann, H., 1998. Analysis of antibody-independent binding of dengue viruses and dengue virus envelope protein to human myelomonocytic cells and B lymphocytes. *Virus Res.* 57, 63–79.
- Charlier, N., Leyssen, P., De Clercq, E., Neyts, J., 2004. Rodent models for the study of therapy against flavivirus infections. *Antivir. Res.* 63, 67–77.
- Chen, Y., Maguire, T., Marks, R.M., 1996. Demonstration of binding of dengue virus envelope protein to target cells. *J. Virol.* 70, 8765–8772.
- Chen, Y., Maguire, T., Hileman, R.E., Fromm, J.R., Esko, J.D., Linhardt, R.J., Marks, R.M., 1997. Dengue virus infectivity depends on envelope protein binding to target cell heparan sulfate. *Nat. Med.* 3, 866–871.
- Crance, J.M., Scaramozzino, N., Jouan, A., Garin, D., 2003. Interferon, ribavirin, 6-azauridine and glycyrrhizin: antiviral compounds active against pathogenic flaviviruses. *Antivir. Res.* 58, 73–79.
- Damonte, E.B., Matulewicz, M.C., Cerezo, A.S., 2004a. Sulfated seaweed polysaccharides as antiviral agents. *Curr. Med. Chem.* 11, 2399–2419.
- Damonte, E.B., Pujol, C.A., Coto, C.E., 2004b. Prospects for the therapy and prevention of dengue virus infections. *Adv. Virus Res.* 63, 239–285.
- Daughaday, C.C., Brandt, W.E., McCown, J.M., Russell, P.K., 1981. Evidence for two mechanisms of dengue virus infection of adherent human monocytes: trypsin-sensitive virus receptors and trypsin-resistant immune complex receptors. *Infect. Immun.* 32, 469–473.
- Diamond, M.S., Zachariah, M., Harris, E., 2002. Mycophenolic acid inhibits dengue virus infection by preventing replication of viral RNA. *Virology* 304, 211–221.

- Gabrielsen, B., Phelan, M.J., Barthel-Rosa, L., See, C., Huggins, J.W., Kefauver, D.F., Monath, T.P., Ussery, M.A., Clumurny, G.N., Schubert, E.M., Upadhyay, K., Kwong, C., Carter, D.A., Secrist III, J.A., Kirs, J.J., Shannon, W.M., Sidwell, R.W., Kini, G.D., Robins, R.K., 1992. Synthesis and antiviral evaluation of *N*-carboxamide-substituted analogues of 1- β -D-nbofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide hydrochloride. *J. Med. Chem.* 35, 3231–3238.
- Gernu, R., Crance, J.M., Garn, D., Guimet, J., Lortat-Jacob, H., Ruigrok, R.W.H., Zarski, J.P., Drouet, E., 2002. Heparan sulfate-mediated binding of infectious dengue virus type 2 and yellow fever virus. *Virology* 292, 162–168.
- Gubler, D.J., 2002. Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21st century. *Trends Microbiol.* 10, 100–103.
- Hase, T., Summers, P.L., Eckels, K.H., 1989. Flavivirus entry into cultured mosquito cells and human peripheral blood monocytes. *Arch. Virol.* 104, 129–143.
- Helmz, F.X., Auer, G., Stasny, K., Holzmann, H., Mandl, C., Guirakhoo, F., Kunz, C., 1994. The interactions of the flavivirus envelope proteins: implications for virus entry and release. *Arch. Virol.* 9 (Suppl.), 339–348.
- Hilgard, P., Stockert, R., 2000. Heparan sulfate proteoglycans initiate dengue virus infection of hepatocytes. *Hepatology* 32, 1069–1077.
- Hung, S.L., Lee, P.L., Chen, H.W., Chen, L.K., Kao, C.L., King, C.C., 1999. Analysis of the steps involved in dengue virus entry into host cells. *Virology* 257, 156–167.
- Koff, W.C., Elm Jr., J.L., Halstead, S.B., 1982. Antiviral effects of ribavirin and 6-mercapto-9-tetrahydro-2-furypurine against dengue viruses in vitro. *Antivir. Res.* 2, 69–79.
- Leyssen, P., De Clercq, E., Neyts, J., 2000. Perspectives for the treatment of infections with *Flaviviridae*. *Clin. Microbiol. Rev.* 13, 67–82.
- Lim, H.Y., Ng, M.L., 1999. A different mode of entry by dengue-2 neutralisation escape mutant virus. *Arch. Virol.* 144, 989–995.
- Lin, Y.-L., Lei, H.-Y., Lin, Y.-S., Yeh, T.-M., Chen, S.-H., Liu, H.-S., 2002. Heparin inhibits dengue-2 virus infection of five human liver cell lines. *Antivir. Res.* 56, 93–96.
- Lindenbach, B.D., Rice, C.M., 2001. *Flaviviridae*: the viruses and their replication. In: Knipe, D.M., Howley, P.M. (Eds.), *Fundamental Virology*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, pp. 589–639.
- Marianneau, P., Mégret, F., Olivier, R., Morens, D.M., Deubel, V., 1996. Dengue 1 virus binding to human hepatoma HepG2 and simian Vero cell surfaces differs. *J. Gen. Virol.* 77, 2547–2554.
- Markland, W., McQuaid, T.J., Jain, J., Kwong, A.D., 2000. Broad-spectrum antiviral activity of the IMP dehydrogenase inhibitor VX-497: a comparison with ribavirin and demonstration of antiviral additivity with alpha interferon. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44, 859–866.
- Marks, R.M., Lu, H., Sundaresan, R., Toida, T., Suzuki, A., Imanari, T., Hernáiz, M.J., Linhardt, R.J., 2001. Probing the interaction of dengue virus envelope protein with heparin: assessment of glycosaminoglycan-derived inhibitors. *J. Med. Chem.* 44, 2178–2187.
- Martínez-Barragán, J.J., del Angel, R.M., 2001. Identification of a putative coreceptor on Vero cells that participates in dengue 4 virus infection. *J. Virol.* 75, 7818–7827.
- McBride, W.J.H., Bielefeldt-Ohmann, H., 2000. Dengue viral infections pathogenesis and epidemiology. *Microbes Infect.* 2, 1041–1050.
- Miagostovich, M.P., dos Santos, F.B., de Simone, T.S., Costa, E.V., Filippis, A.M.B., Schatzmayr, H.G., Nogueira, R.M.R., 2002. Genetic characterization of dengue virus type 3 isolates in the State of Rio de Janeiro, 2001. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 35, 869–872.
- Moreno-Altamirano, M.M.B., Sánchez-García, F.J., Muñoz, M.L., 2002. Non Fc receptor-mediated infection of human macrophages by dengue virus serotype 2. *J. Gen. Virol.* 83, 1123–1130.
- Muñoz, M.L., Cisneros, A., Cruz, J., Das, P., Tovar, R., Ortega, A., 1998. Putative dengue virus receptors from mosquito cells. *FEMS Microbiol. Lett.* 168, 251–258.
- Ono, L., Wollinger, W., Rocco, I.M., Coimbra, T.L.M., Gorin, P.A.J., Sierakowski, M.R., 2003. In vitro and in vivo antiviral properties of sulphated galactomannans against yellow fever virus (BeH11 strain) and dengue 1 virus (Hawaii strain). *Antivir. Res.* 60, 201–208.
- Pujol, C.A., Estévez, J.M., Carlucci, M.J., Ciancia, M., Cerezo, A.S., Damonte, E.B., 2002. Novel DL-galactan hybrids from the red seaweed *Gymnogongrus torulosus* are potent inhibitors of herpes simplex virus and dengue virus. *Antivir. Chem. Chemother.* 13, 83–89.
- Ramos-Castañeda, J., Imbert, J.L., Barron, B.L., Ramos, C., 1997. A 65-kDa trypsin sensitive membrane cell protein as a possible receptor for dengue virus in cultured neuroblastoma cells. *J. Neurovirol.* 3, 435–440.
- Randolph, V.B., Stollar, V., 1990. Low pH-induced cell fusion in flavivirus-infected *Aedes albopictus* cell cultures. *J. Gen. Virol.* 71, 1845–1850.
- Salas-Benito, J.S., del Angel, R.M., 1997. Identification of two surface proteins from C6/36 cells that bind dengue type 4 virus. *J. Virol.* 71, 7246–7252.
- Shigetani, S., Mori, S., Kodama, E., Kodama, J., Takahashi, K., Yamase, T., 2003. Broad spectrum anti-RNA virus activities of titanium and vanadium substituted polyoxotungstates. *Antivir. Res.* 58, 265–271.
- Spillmann, D., 2001. Heparan sulfate: anchor for viral intruders? *Biochimie* 83, 811–817.
- Talarico, L.B., Zibetti, R.G.M., Faria, P.C.S., Scolari, L.A., Duarte, M.E.R., Nosedá, M.D., Pujol, C.A., Damonte, E.B., 2004. Anti-herpes simplex virus activity of sulfated galactans from the red seaweeds *Gymnogongrus griffithsiae* and *Cryptonemia crenulata*. *Int. J. Biol. Macromol.* 34, 63–71.
- Wei, H.-Y., Jiang, L.-F., Fang, D.-Y., Guo, H.-Y., 2003. Dengue virus type 2 infects human endothelial cells through binding of the viral envelope glycoprotein to cell surface polypeptides. *J. Gen. Virol.* 84, 3095–3098.
- Witvrouw, M., De Clercq, E., 1997. Sulfated polysaccharides extracted from sea algae as potential antiviral drugs. *Gen. Pharmacol.* 29, 497–511.